

Les applications de la transgénèse animale

Applications of animal transgenesis

Par Louis-Marie HOUDEBINE⁽¹⁾
(communication présentée le 6 octobre 2005)

RÉSUMÉ

La transgénèse offre la possibilité de replacer un gène dans son environnement complexe qu'est un organisme entier et de créer des lignées d'animaux portant des caractères génétiques nouveaux ou ayant perdu un gène. Ceci permet de mieux comprendre les mécanismes de la régulation de l'expression des gènes mais aussi leur fonction dans l'organisme. La transgénèse permet de créer des modèles pour l'étude de maladies humaines et de préparer des animaux qui sont potentiellement des sources d'organes et de cellules pour l'homme mais aussi de protéines thérapeutiques. Les animaux d'élevage peuvent être génétiquement modifiés et bénéficier ainsi d'un accroissement accéléré et ciblé de la diversité génétique. Les succès de la transgénèse animale se heurtent encore à divers problèmes notamment techniques et financiers. Le transfert de gène reste difficile chez les gros animaux même si de nouvelles techniques ont apporté des progrès décisifs. Un autre problème est celui de l'expression des transgènes qui est souvent mal contrôlée. Ceci oblige à multiplier le nombre des animaux fondateurs de lignées pour ne garder que les meilleurs et pour limiter les effets secondaires imprévisibles de la transgénèse. Les applications de la transgénèse aux animaux d'élevages sont également limitées par la disponibilité de gènes susceptibles d'apporter une amélioration significative des lignées préexistantes. Les applications de la transgénèse animale doivent également faire face à des problèmes de biosécurité et d'acceptabilité par les consommateurs. Cette revue se propose de faire le point sur les avancées de la transgénèse animale.

Mots-clés : transgénèse, animaux d'élevage, biosécurité, acceptabilité.

SUMMARY

Transgenesis is the introduction of a new gene in a whole organism to generate animal lines harbouring new genetic traits or having lost a gene. This procedure helps our understanding of the mechanisms regulating gene expression as well as the function of genes in the body. Transgenesis provides models to study human diseases and prepares animals as potential sources of organs and cells, as well as pharmaceutical proteins, to be used in man. Transgenesis creates genetically modified farm animals, thereby increasing and targeting biodiversity. However, the success of animal transgenesis is still restricted by several problems, particularly technical and financial. Gene transfer remains difficult in large animals even if new techniques have brought decisive improvements. Another problem is the often poorly controlled expression of transgenes. This requires the generation of multiple founders to keep only the best, and reduce the unpredictable side effects of transgenesis. The applications of transgenesis in farm animals are also limited by the availability of genes expected to bring a significant improvement over pre-existing lines. Animal transgenesis must also deal with issues of biosafety and acceptability by consumers. This article reviews the major advances in animal transgenesis.

Key words: transgenesis, farm animal, biosafety, acceptability.

(1) Unité de Biologie du Développement et Reproduction, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas CEDEX.
e-mail : louis.houdebine@jouy.inra.fr

• INTRODUCTION

La modification génétique des organismes vivants a commencé il y a 10 000 ans et elle se poursuit à un rythme accéléré. La sélection pratiquée jusqu'à une période récente ne reposait que sur une reproduction privilégiée des individus présentant les caractéristiques génétiques les plus intéressantes. Cette méthode empirique a permis de créer l'essentiel de nos aliments, de nos animaux de compagnie et de nos plantes ornementales.

Quelques exemples suffisent à illustrer ce fait. Les carottes et les vers à soie sont devenus incapables de survivre sans l'assistance de l'homme. La tomate moderne comprend jusqu'à 2000 gènes qui, apportés par des croisements forcés, proviennent d'espèces voisines. Le mulet est le résultat du transfert des 30 000 gènes de l'âne chez le cheval. Il en est de même pour le triticale, une céréale qui est un croisement artificiel entre le blé et le seigle. Cette nouvelle espèce n'a pu être stabilisée qu'après des remaniements chromosomiques divers, provoqués par des radiations mutagènes expérimentales.

La création de ces nouvelles variétés ou espèces a été réalisée en aveugle, puisque le sélectionneur classique ne sait pas quels gènes d'intérêt il privilégie, ni quels gènes, délétères ou non, sont co-sélectionnés *via* la redistribution aléatoire du matériel génétique lors de la reproduction sexuée (figure 1). Le mode de sélection induit donc des temps à autre des effets indésirables. À titre d'exemple, on peut citer les variétés de pommes de terre toxiques et les abeilles tueuses qui résultent de croisement de lignées connues et ne possédant pas ces propriétés.

Ces effets néfastes ont des chances de se reproduire, qui sont augmentées par le fait que les produits de sélection classique ne sont soumis qu'à des tests d'innocuité sommaires.

La sélection génétique classique comporte donc des inconvénients réels mais ses bienfaits l'emportent nettement sur les risques qu'elle engendre.

Le génie génétique offre depuis plusieurs décennies la possibilité d'isoler des gènes, de les modifier et de les réintroduire dans des cellules ou des organismes entiers (figure 2). Ceci per-

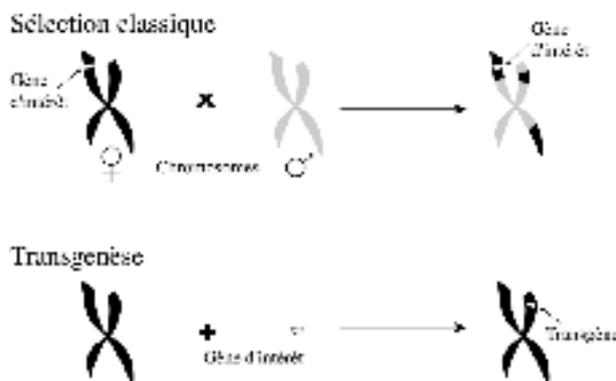


Figure 1 : Le principe de la sélection génétique et de la transgénèse. La sélection génétique privilégie des gènes d'intérêt non identifiés et des gènes collatéraux ayant des effets inconnus. La transgénèse ne provoque qu'une ou quelques modifications génétiques connues pour l'essentiel.

met de créer de nouvelles lignées d'animaux, tout en ne modifiant que très ponctuellement le patrimoine génétique d'un individu (figure 1). Les gènes utilisés sont alors connus ainsi que leurs propriétés biologiques. Il est par ailleurs important de considérer le fait que la transgénèse permet de franchir la barrière d'espèce si on le souhaite, ce qui augmente d'autant la possibilité d'enrichir la biodiversité des espèces concernées.

Le transfert de gènes étrangers et le contrôle de leur expression posent divers problèmes qui sont analysés dans cette revue. Les applications de la transgénèse animale sont multiples. Elles sont effectives dans les domaines fondamental et biomédical. Elles n'ont pas encore complètement abouti dans les élevages mais certains projets sont bien avancés et progressent. Les principaux résultats et ceux que l'on peut imaginer sont résumés dans la deuxième partie de cette revue, qui prend en compte également les problèmes incontournables de biosécurité, de bien-être animal et d'acceptabilité par les consommateurs. L'ensemble de ces questions a été traité dans un livre publié récemment (HOUDEBINE, 2001, 2003).

• LES TECHNIQUES DE TRANSFERT DE GÈNE

Les étapes les plus marquantes de la transgénèse animale font souvent référence à l'émergence d'une nouvelle technique permettant une obtention moins laborieuse d'animaux transgénétiques (figure 3 et 4).

La microinjection d'ADN

Les premiers animaux transgénétiques étaient des souris obtenues en 1980. Les gènes étaient transférés par microinjection directe de l'ADN dans les pronoyaux des embryons au stade une cellule. Cette technique est encore la plus utilisée chez la souris, le lapin et le porc.

Son rendement est de l'ordre de un transgénétique pour 100 embryons microinjectés.

Les gènes s'intègrent de manière incontrôlée, et souvent, dans des gènes de l'hôte qui se trouvent de ce fait inactivés. L'intégration en grande partie aléatoire se traduit par des extinctions fréquentes des transgènes et une expression influencée par les gènes voisins du site d'intégration.

Les pronuclei ne sont visibles que chez les mammifères. Chez les animaux ovipares, l'ADN ne peut être injecté que dans le cytoplasme, ce qui se traduit également par une intégration non contrôlée, avec des rendements très variables selon les espèces.

L'utilisation de vecteurs intégratifs

Pour augmenter le taux d'intégration, les gènes étrangers peuvent être insérés au préalable dans des transposons ou des vecteurs rétroviraux. Dans le premier cas, les transposons doivent être injectés dans le noyau des embryons en même temps que l'enzyme, une intégrase, qui complémente les transposons défectifs (DUPUY *et al.*, 2002). Dans le deuxième cas, les particules virales défectives sont préparées dans des cellules transcomplémentantes apportant les protéines virales

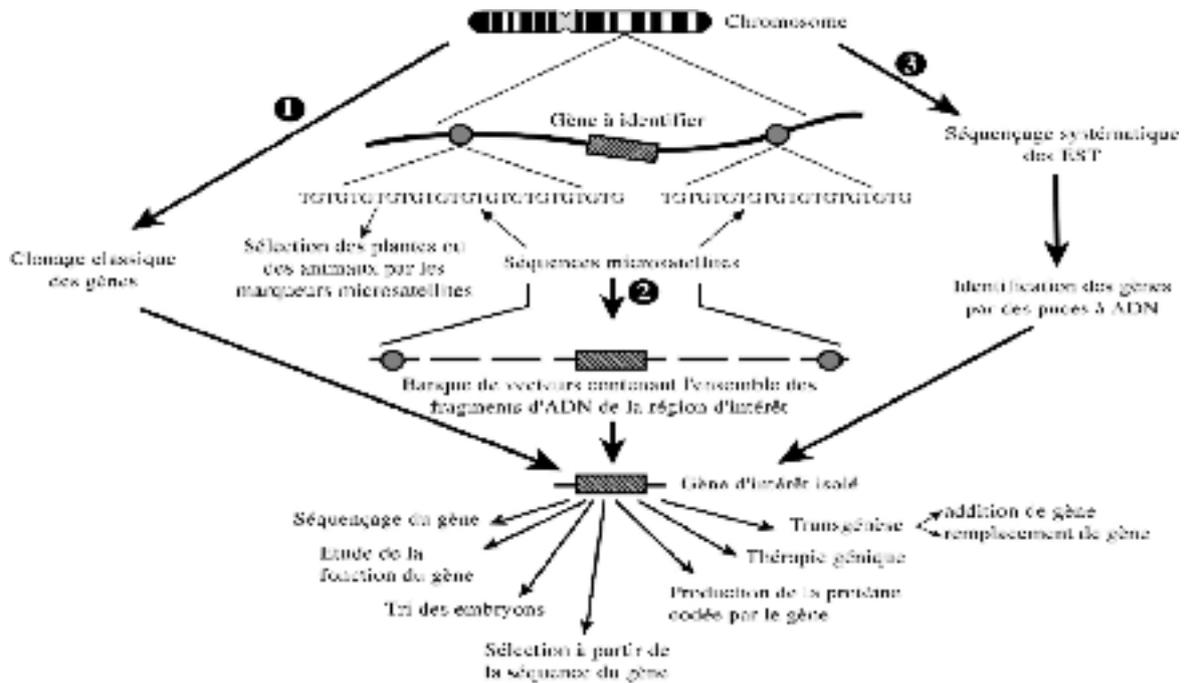


Figure 2 : Les différentes méthodes pour isoler les gènes et la contribution de la transgénèse pour l'étude et l'utilisation des gènes.

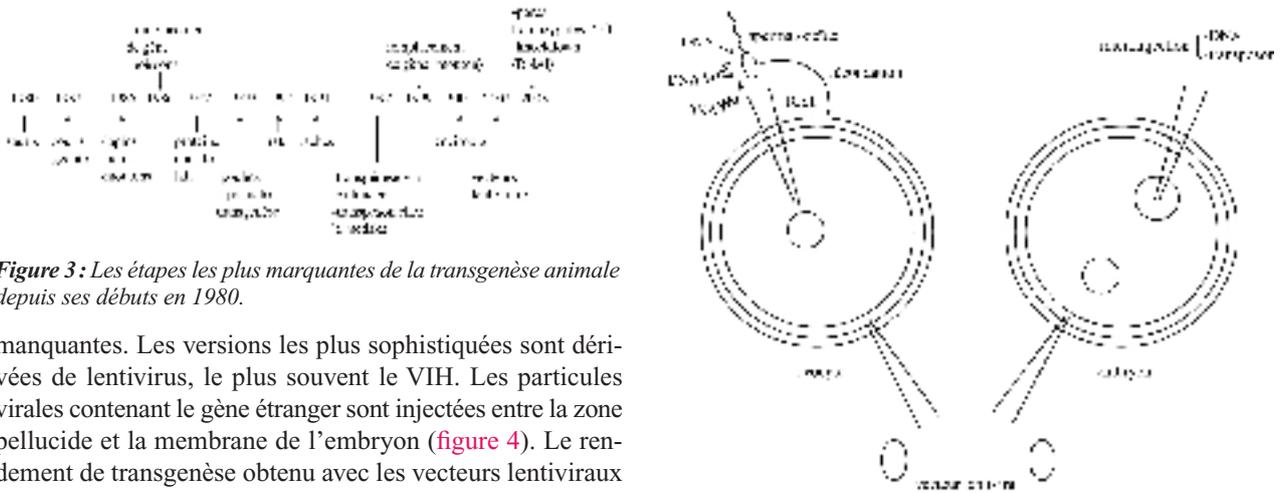


Figure 3 : Les étapes les plus marquantes de la transgénèse animale depuis ses débuts en 1980.

manquantes. Les versions les plus sophistiquées sont dérivées de lentivirus, le plus souvent le VIH. Les particules virales contenant le gène étranger sont injectées entre la zone pellucide et la membrane de l'embryon (figure 4). Le rendement de transgénèse obtenu avec les vecteurs lentiviraux peut être extrêmement élevé et atteindre 80 % des embryons manipulés (WHITELAW, 2004; WHITELAW *et al.*, 2004). Ces vecteurs sont utilisables chez diverses espèces animales, y compris les oiseaux.

Ces outils ne présentent pas de risque particulier, à condition d'être utilisés selon les règles de sécurité. Leur limite tient dans le fait que les transposons ne peuvent véhiculer plus de 2-3kb d'ADN étranger et les lentivirus plus de 8-9 kb. Les lentivirus permettent en général une bonne expression des transgènes mais leurs promoteurs propres peuvent gêner l'action spécifique des promoteurs spécifiques de tissus associés aux transgènes.

L'utilisation des spermatozoïdes comme porteurs d'ADN

L'incubation des spermatozoïdes isolés avec le gène étranger, suivie d'une fécondation *in vitro* ou *in vivo* conduit

Figure 4 : Les principales méthodes pour introduire les gènes étrangers dans des embryons, des spermatozoïdes ou des ovocytes.

dans certains cas à l'obtention d'animaux transgéniques avec un rendement très acceptable (LAVITRANO *et al.*, 2003). La destruction partielle de la membrane du spermatozoïde permet à l'ADN de mieux y pénétrer. Le spermatozoïde est alors inactivé et la fécondation doit alors être réalisée par ICSI (intracytoplasmic sperm injection) (figure 4).

Cette technique s'est améliorée depuis son utilisation initiale chez le xénope. Elle donne désormais de bons rendements chez les mammifères, en permettant tout aussi bien à des longs fragments d'ADN qu'à des fragments courts, d'être transférés dans l'ovocyte, puis intégrés dans le génome de l'embryon (MOREIRA *et al.*, 2004).

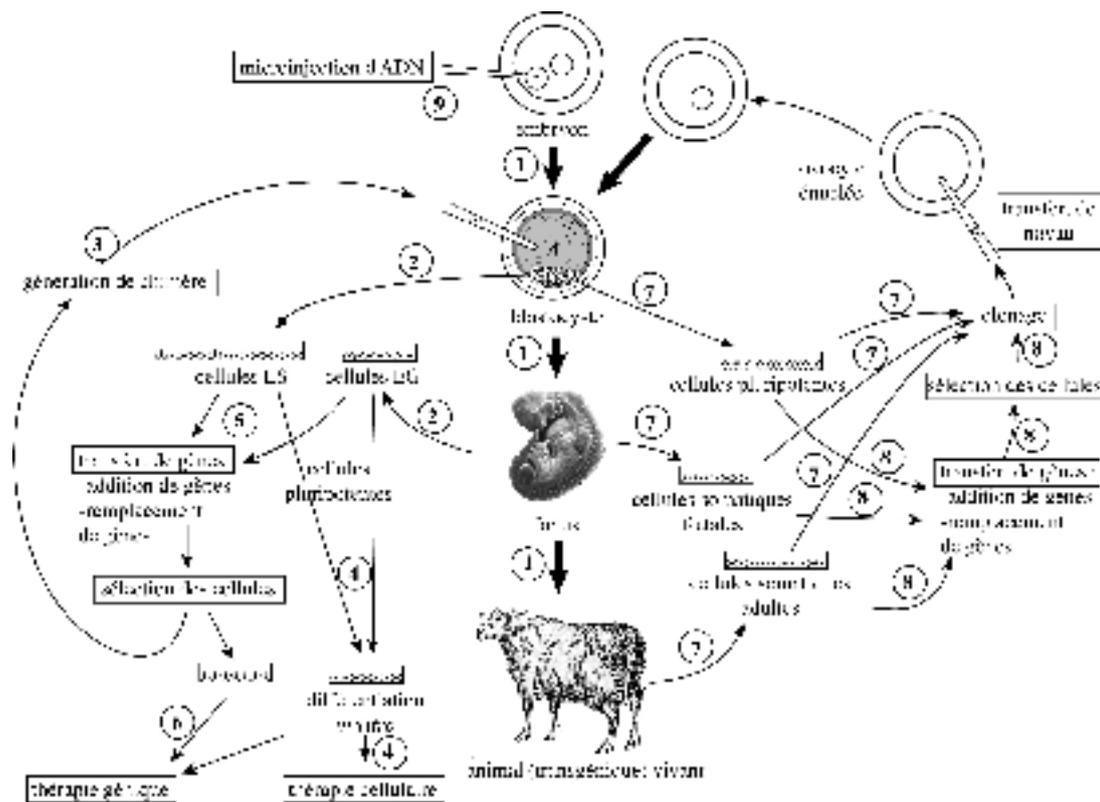


Figure 5: Les relations possibles entre le clonage, la transgénèse, la thérapie cellulaire génique. 1) Développement normal de l’embryon ; 2) Établissement de lignées de cellules pluripotentes à partir de la masse cellulaire interne de blastocystes (cellules ES) ou de gonades fœtales (cellules EG) ; 3) Les cellules pluripotentes réintroduites dans un blastocyste receveur participent au développement de tous les organes et donnent naissance à des animaux chimères ; 4) Les cellules pluripotentes peuvent se différencier in vitro et introduites chez des patients pour régénérer des organes endommagés (thérapie cellulaire), (la thérapie cellulaire peut également être réalisée avec des cellules souches d’organes ou des cellules déjà différenciées) ; 5) Des gènes peuvent être transférés dans des cellules pluripotentes utilisées ultérieurement pour engendrer des animaux chimériques transgéniques (cette méthode est employée essentiellement chez la souris pour le remplacement de gène) ; 6) Des cellules pluripotentes ayant reçu un gène étranger peuvent se différencier in vitro et être utilisées pour des thérapies géniques (les thérapies géniques sont généralement réalisées à partir de cellules somatiques différenciées) ; 7) Des cellules pluripotentes ou différenciées provenant de fœtus ou d’adultes peuvent être utilisées pour le clonage par transfert de noyau ; 8) Les cellules qui ont reçu des gènes peuvent être utilisées pour engendrer des animaux clonés transgéniques ; 9) Des gènes peuvent être introduits dans un embryon par microinjection pour engendrer des animaux transgéniques.

L’utilisation des cellules pluripotentes ou somatiques

Les gènes étrangers peuvent être intégrés dans des cellules pluripotentes ou dans des cellules somatiques en culture utilisées ultérieurement pour reconstituer des embryons transgéniques (figure 5).

Les cellules pluripotentes sont par définition capables de se différencier et de donner naissance à tous les types de cellules, y compris les gamètes. Les cellules pluripotentes peuvent être injectées dans un embryon précoce (morula ou blastocyste) et se mélanger aux cellules de l’hôte pour donner des animaux chimères.

Les cellules pluripotentes strictes sont les cellules de l’embryon au stade morula, les cellules de la masse cellulaire interne des blastocystes, ainsi que les cellules précurseurs des gamètes appelées PGC (primordial germ cell).

Les cellules ES à l’état de lignées gardent leur pluripotence pendant leur culture qui est nécessaire pour transférer les gènes et sélectionner les cellules génétiquement modifiées. De véritables cellules ES n’ont été obtenues que chez deux lignées de souris.

Les lignées de cellules PGC n’ont été obtenues que très récemment chez le poulet et la caille (Transgenic Animal Research Conference V, 2005).

Les cellules somatiques peuvent être utilisées pour engendrer des animaux clonés, après transfert de leur noyau dans des ovocytes énucléés. Le transfert de gène dans les cellules, réalisé au préalable, permet d’obtenir des animaux clonés transgéniques (figure 5). Cette technique, bien que laborieuse, a considérablement simplifié la transgénèse chez les ruminants, en permettant d’obtenir des rendements acceptables (KUROIWA *et al.*, 2004).

L’intégration ciblée des gènes étrangers

L’intégration parfaitement ciblée d’un gène est possible en utilisant un phénomène naturel, la recombinaison homologue. Un vecteur contenant des séquences presque identiques à des régions d’un génome vient remplacer très précisément cette région du génome.

Ce phénomène se produit avec une très faible fréquence. Les cellules dans lesquelles la recombinaison homologue a eu lieu doivent être sélectionnées, puis utilisées pour

reconstituer des embryons. La formation de chimères avec des cellules pluripotentes ou le clonage à partir de cellules somatiques, sont indispensables pour procéder à un remplacement de gène chez un animal entier.

La recombinaison homologe permet de remplacer un gène par une version inactive (*knock out*) ou par un autre gène actif (*knock in*) (figure 6). Divers procédés décrits dans la figure 6 permettent d'augmenter la fréquence de recombinaison homologe. L'intégration ciblée permet d'éviter l'inactivation au hasard d'un gène de l'hôte. Elle permet également de placer un gène étranger dans un environnement chromatinien connu pour être favorable à une bonne expression du transgène.

• LE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DES TRANSGÈNES

L'étude des mécanismes du contrôle de l'expression des gènes a permis de définir les éléments minimaux autorisant une transcription de l'ADN. Chez tous les organismes, y compris les bactéries, la région transcrite d'un gène est précédée par une région promotrice qui permet au complexe de transcription, et notamment l'ADN polymérase, de trouver le site où la transcription doit commencer. La région transcrite est suivie par ce que l'on appelle un terminateur de

transcription. Ces éléments minimaux sont suffisants pour exprimer un gène transféré dans une cellule (figure 7).

Les promoteurs permettent une expression des gènes associés dans un seul type de cellule différenciée ou au contraire dans plusieurs types cellulaires, voire dans toutes les cellules. Le choix d'un promoteur dépend des cellules dans lesquelles on souhaite faire exprimer le transgène.

Les promoteurs sont des régulateurs d'une grande complexité, dont les éléments sont repartis sur des distances considérables, jusqu'à plusieurs centaines de milliers de base de la région transcrite du gène. Ces éléments ont de multiples fonctions. Ils doivent être sensibles aux inducteurs cellulaires et extracellulaires spécifiques et permettre à un gène d'être isolé des éléments régulateurs de ses voisins.

Les régions transcrites des gènes contiennent elles aussi, de multiples signaux qui ne sont pas très connus. La région qui précède le codon AUG initiateur de la traduction peut contenir des régulateurs de la traduction des ARNm. La région qui suit le codon de terminaison de la traduction peut contenir des régulateurs de la stabilité des ARNm. La plupart des gènes contiennent des introns qui morcellent l'information génétique. Les introns sont éliminés avant que l'ARNm passe du noyau dans le cytoplasme, avant d'être traduit, puis détruit. Les introns contiennent souvent des éléments régulateurs de la transcription et leur élimination ne peut avoir lieu convenablement que s'ils contiennent des signaux permettant le clivage de l'intron et l'épissage des deux exons qui l'encadrent (figure 7).

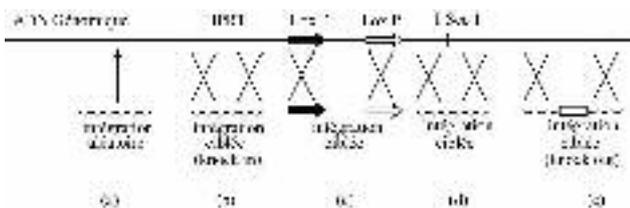


Figure 6: Les différentes méthodes pour intégrer de manière aléatoire ou ciblée les gènes étrangers dans les génomes. a) intégration aléatoire après microinjection, transfection ou électroporation; b) intégration ciblée dans le locus du gène HPRT qui permet une bonne expression de la majorité des transgènes (knock in); c) intégration ciblée à l'aide du système LoxP; d) intégration ciblée par recombinaison homologue stimulée par la coupure de l'ADN génomique au site I-SceI introduit dans le génome de l'hôte; e) intégration ciblée classique par recombinaison homologue (knock out).

La construction de vecteurs permettant une expression fiable des transgènes

Un transgène n'est parfois qu'un fragment génomique. Le plus souvent, un gène est au préalable construit au laboratoire pour contenir l'information génétique souhaitée, mais également les éléments régulateurs permettant une expression du transgène dans les cellules choisies.

La construction d'un gène consiste donc à entourer un ADN complémentaire (ADNc) qui est la copie de l'ARNm,

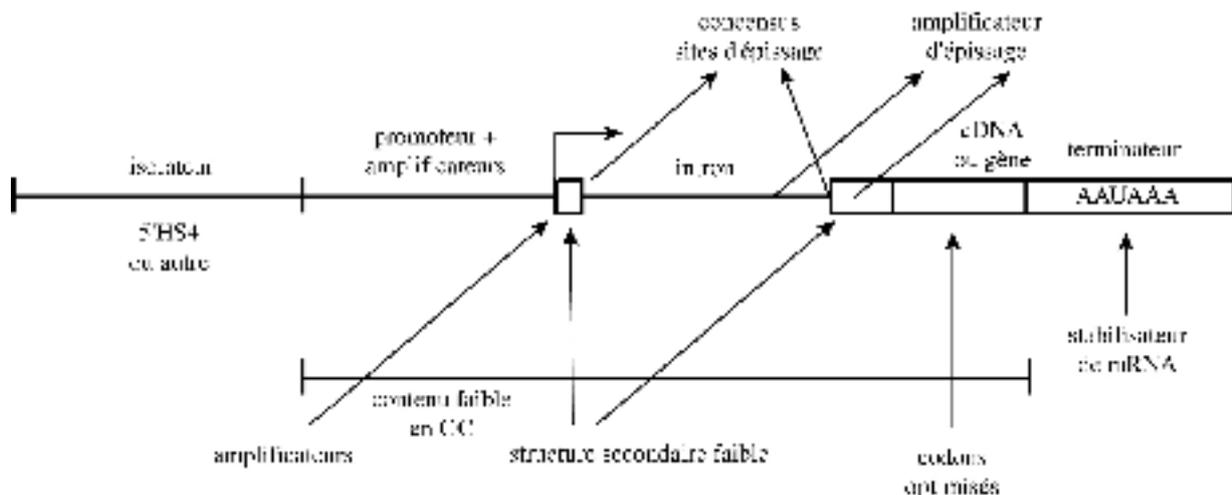


Figure 7: Les différents éléments régulateurs qui doivent être ajoutés à une information génétique (cDNA ou gène provenant d'un génome) pour obtenir une expression améliorée des transgènes.

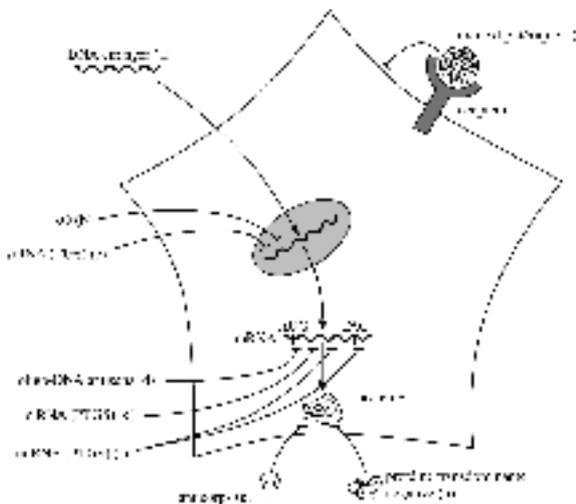


Figure 8 : Les différentes méthodes pour inhiber l'expression d'un gène cellulaire. a) addition classique d'un gène étranger ayant un effet inhibiteur. b) inactivation par recombinaison homologue (ko); c) extinction d'un gène (TGS: transcriptional gene silencing) par l'action d'un RNAi; d) inhibition de la traduction d'un ARNm par l'action d'un oligo-DNA complémentaire. e) dégradation (knock down) d'un ARNm par l'action d'un RNAi (PTGS: post transcriptional gene silencing). f) inhibition de la traduction d'un ARNm par la fixation d'un miRNA dans la partie suivant le codon de terminaison (TAG); g) action inhibitrice d'un anticorps dirigé contre une protéine cellulaire; l'anticorps peut être produit par un transgène et être sécrété ou rester dans la cellule (intracorps); h) action inhibitrice d'une protéine exerçant un effet transdominant négatif sur la protéine d'intérêt; i) destruction sélective d'un type cellulaire (ablation génétique) par l'action de la toxine diphthérique qui entre dans la cellule ciblée par son récepteur qui ne s'exprime que dans ce type de cellule.

par un promoteur avec ses amplificateurs et des isolateurs, un intron au moins et un terminateur de la transcription.

Ces constructions peuvent se faire à partir des multiples éléments disponibles et leur choix, ainsi que leur assemblage, conditionnent l'expression du transgène (figure 7). De tels vecteurs qui sont de plus en plus sophistiqués parviennent à faire fonctionner les transgènes de manière de moins en moins imprévisible.

Les ADNc introduits dans tels vecteurs restent cependant souvent mal exprimés, à un niveau trop faible ou dans des cellules qui ne sont pas celles où fonctionne normalement le promoteur. Il est maintenant admis que le transgène fonctionne plus ou moins bien selon sa position dans le génome de l'hôte mais aussi selon sa composition en bases. Ce dysfonctionnement révèle l'absence d'éléments régulateurs essentiels dans la construction de gène et notamment, d'isolateurs qui permettent au transgène de ne plus subir les influences de son voisinage dans la chromatine. La tendance actuelle consiste donc à utiliser de longs fragments d'ADN génomique (de 50 à 200 kb) contenant tous les éléments régulateurs d'un gène et d'y insérer l'information génétique à s'exprimer (HOUDEBINE, ATTAL et VILOTTE, 2002; GIRALDO *et al.*, 2004).

L'expression fiable des transgènes va donc progressivement devenir une réalité, grâce à l'utilisation de vecteurs composés de longs fragments d'ADN. Ce point est particulièrement important lorsqu'on s'adresse aux animaux d'élevage. En effet, quoi qu'il en soit, la transgénèse restera chez ces espèces un exercice laborieux et coûteux, pendant quelque temps encore. L'utilisation de vecteurs d'expression fiable permet de réduire le nombre de lignées d'animaux à préparer et à étudier avant de ne garder que ceux qui donnent satisfaction.

L'expression conditionnelle des transgènes

L'utilisation de promoteurs spécifiques de gènes permet, dans l'idéal, aux transgènes de ne fonctionner que dans les cellules contenant les inducteurs spécifiques du promoteur choisi. Les promoteurs des gènes des protéines du lait restreignent ainsi aux cellules mammaires des animaux allaitants l'expression des transgènes qui leur sont associés.

Cette situation ne répond toutefois pas à toutes les exigences des expérimentateurs comme des biotechnologistes. Dans certains cas, il est en effet souhaitable de n'induire et de désinduire un transgène qu'à une certaine période de la vie de l'animal sans stimuler des gènes de l'hôte. On peut ainsi construire des transgènes inductibles par les hormones corticostéroïdiennes. L'administration d'hormone chez l'animal induit alors le transgène, mais en même temps, des dizaines, voire des centaines de gènes de l'hôte. Ceci a toute sorte d'effets indésirables s'il s'agit d'un modèle d'étude d'un gène ou d'une fonction biologique, mais aussi si l'animal est exploité à des fins biotechnologiques.

Des promoteurs artificiels inductibles seulement par des molécules exogènes, qui n'agissent pas sur les gènes de l'hôte, ont été construits. Le système le plus utilisé met en œuvre des promoteurs qui ne sont activés (ou inhibés) qu'en présence de tétracycline ou de ses dérivés. L'expression du transgène n'a alors lieu que lorsque l'expérimentateur le décide (WEBER et FUSSENEGGER, 2004).

Il est également possible de séparer les éléments régulateurs d'un promoteur par un fragment d'ADN qui empêche leur action. Le transgène reste alors silencieux tant que le fragment d'ADN inhibiteur n'a pas été éliminé. Cette élimination peut se faire aisément en faisant agir une recombinase comme la recombinase Cre qui recombine spécifiquement deux courtes séquences d'ADN appelées LoxP. Ce système et quelques autres permettent d'éliminer tout fragment d'ADN préalablement bordé par des régions LoxP.

C'est ce même système utilisé en sens inverse qui permet d'intégrer, dans une région du génome contenant des sites Lox P, un fragment à ADN étranger lui-même bordé par les mêmes Lox P (figure 5) (BAER et BODE, 2001).

L'inhibition spécifique de l'expression d'un gène

Ajouter un gène étranger à un animal permet d'étudier et d'exploiter ce gène. Inactiver spécifiquement une information génétique d'un animal ou d'un virus peut également apporter des renseignements essentiels sur le rôle du gène

mais aussi permettre de créer une situation physiologique nouvelle ou de bloquer une infection virale.

Le but recherché dans la plupart des cas est de ne plus permettre à la protéine codée par le gène considéré d'agir. Pour atteindre ce but, plusieurs stratégies sont possibles (figure 8).

Inactivation du gène

Une stratégie consiste à inactiver le gène par recombinaison homologe (*knock out*) (figure 6). Cette opération est laborieuse et elle présente l'inconvénient d'être effectuée le plus souvent très tôt dans la vie de l'animal et d'être irréversible.

Inactivation de l'ARNm

Une autre possibilité consiste à détruire l'ARNm ou à inhiber spécifiquement sa traduction. Ce but peut être atteint en faisant agir des ARN interférents (RNAi) ou des microARN (miRNA) (figure 8 et 9) (NOVINA et SHARP, 2004).

Les ARN interférents sont les sous-produits cellulaires d'une dégradation de longs ARN double brin. Les fragments ainsi engendrés font 21-23 pb. Leur association avec un complexe protéique (RISC) permet une dégradation spécifique de tout ARN ayant une structure nucléotidique exactement complémentaire. Ces mécanismes constituent une défense contre les virus dont le cycle de réplication comprend la formation d'un long ARN double brin. L'importance de ce mécanisme est très grande chez les plantes et les invertébrés. Il a perdu son caractère essentiel chez les vertébrés qui possèdent un système immu-

nitaire puissant. Ce même type de mécanisme reconnaît les régions du génome dans lesquelles les deux brins d'ADN sont anormalement transcrits. Le produit de ces transcriptions est en effet un long ARN double brin. Il est important de noter que les RNAi ne font pas qu'induire une destruction des ARNm, ils sont également capables d'inhiber la transcription des gènes produisant les longs ARN double brin. C'est ainsi que sont activés certains transposons, certains retrovirus et certains transgènes mal régulés (NOVINA et SHARP, 2004).

Le génome des eucaryotes contient des centaines de séquences codant pour de petits ARN dont certains constituent des microARN. Ces miRNA peuvent être partiellement dégradés pour donner naissance à des RNAi qui dégradent les ARN ayant une séquence complémentaire. Ils inhibent la traduction des ARNm en se fixant sur la région suivant le codon de terminaison lorsque leur séquence est partiellement complémentaire. Des études récentes ont montré que les miRNA jouent un rôle régulateur essentiel dans le développement et la différenciation cellulaire en inhibant transitoirement spécifiquement l'expression de gènes (NOVINA et SHARP, 2004).

Les RNAi et les miRNA peuvent être produits par des transgènes et inhiber spécifiquement des gènes endogènes ou viraux. Cette opération a été appelée *knock down*, par analogie avec le *knock out*. Les RNAi et les miRNA peuvent en principe être exprimés chez des animaux transgéniques sous l'influence d'inducteurs spécifiques. Cette situation devrait devenir une réalité dans les années qui viennent.

Inactivation de la protéine

Une protéine peut être inactivée de différentes manières. L'une consiste à produire des anticorps dirigés contre cette protéine, qui peuvent être produits et maintenus à l'intérieur de la cellule.

Beaucoup de protéines ont des analogues inactifs naturels ou artificiels qui bloquent leur action par effet de compétition. Ces analogues inhibiteurs sont appelés des protéines transdominantes négatives. La surexpression de telles protéines rend inopérantes les protéines naturelles. Un faux récepteur de l'insuline peut ainsi capter l'hormone sans transmettre son signal dans la cellule. Ceci se traduit chez les souris transgéniques par un diabète de type II.

Destruction des cellules

Des cellules d'un organe peuvent être spécifiquement détruites par l'expression d'un gène codant pour une toxine. Pour plus de sécurité, la cellule à détruire peut exprimer le gène du récepteur de la toxine. La toxine injectée à l'animal transgénique ne détruit que les cellules possédant les récepteurs de la toxine. Une fonction biologique peut ainsi être perdue irréversiblement à toute étape de la vie de l'animal.

• **LES APPLICATIONS DE LA TRANSGÉNÈSE**

La transgénèse animale a trois grands types d'applications.

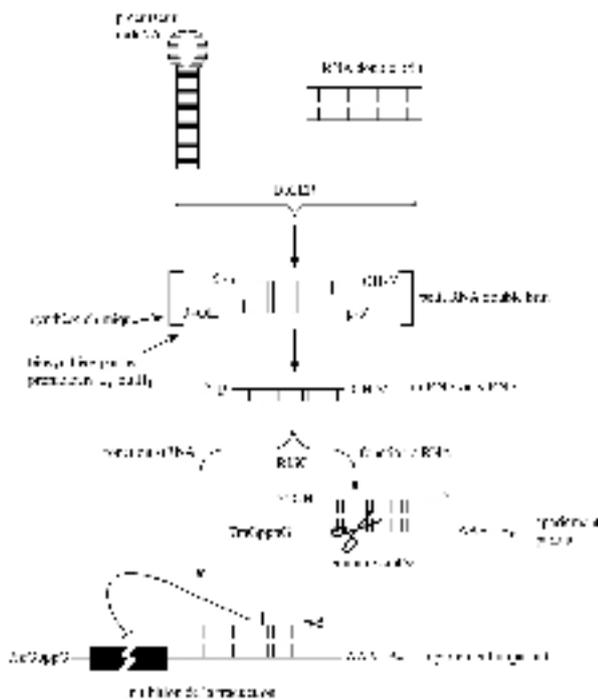


Figure 9 : Synthèse et mécanisme d'action des RNAi et des miRNA. Les RNAi sont des produits de dégradation de longs ARN double-brins ou sont synthétisés directement à partir des transgènes appropriés. Les RNAi induisent une dégradation des ARNm complémentaires. Les miRNA sont synthétisés à partir de gènes cellulaires ou de transgènes. Les miRNA peuvent engendrer de RNAi qui détruisent les ARNm ou de petits RNA inhibant la traduction des ARNm.

La recherche fondamentale

Comme cela a été mentionné tout au long de ce texte, la transgénèse est un outil d'étude incontournable pour les biologistes. Ceci explique le fait qu'au moins 80 % des organismes génétiquement modifiés sont des animaux de laboratoire.

Les applications biomédicales

La transgénèse permet de créer des modèles d'étude pour les maladies humaines. L'addition de gènes, le *knock out* et le *knock down*, offrent des possibilités sans précédent. Beaucoup de modèles de maladies n'apparaissent en effet pas spontanément dans les élevages. Les situations physiologiques les plus éprouvantes pour les animaux peuvent être modulées en contrôlant finement l'expression des transgènes. La plupart des animaux modèles sont des souris. Ce petit mammifère se prête bien à ce type d'expérimentation et ce, d'autant plus que le génome de cette espèce a été séquencé récemment et que tous les gènes murins sont connus. D'autres espèces (rat, lapin, porc et ruminants) sont parfois nécessaires lorsque la physiologie de la souris est trop éloignée de celle de l'homme ou que les organes de la souris sont trop petits (HOUDEBINE, 2004, 2005).

Le rat, le lapin et le porc sont des modèles d'étude pour définir les conditions permettant des xénogreffes d'organes d'animaux à des patients. Il est admis que le porc est le meilleur donneur potentiel d'organes. Des gènes ajoutés ou inhibés permettent aux organes de porcs, de ne plus être rejetés par le système du complément. D'autres modifications génétiques sont nécessaires pour rendre les organes totalement compatibles avec les receveurs humains (HOUDEBINE et WEILL, 1999).

La synthèse de protéines thérapeutiques recombinantes est l'un des principaux succès des biotechnologies. Certaines protéines comme l'insuline ou l'hormone de croissance peuvent être synthétisées par des bactéries qui portent les gènes correspondants. D'autres protéines comme les anticorps ou les facteurs sanguins ont une structure plus complexe. Elles sont en particulier glycosylées. Les événements post-translationnels, comme la glycosylation, ne peuvent être assurés que par des cellules d'animaux supérieurs. Ces cellules peuvent être également les composants d'animaux transgéniques. Des protéines thérapeutiques peuvent ainsi être produites massivement, à un coût réduit, dans le lait et le blanc d'œuf d'animaux transgéniques. Plusieurs de ces protéines sont en phase I à III d'étude clinique (HOUDEBINE, 2002).

Les applications agronomiques

La mise en œuvre de la transgénèse pour améliorer les productions animales est beaucoup moins avancée que ce que l'on peut voir chez les plantes. Les problèmes méthodologiques sont la cause de ce retard relatif.

Diverses applications de la transgénèse pour les animaux d'élevage sont concevables, comme pour les plantes. Ce sont en réalité toutes les améliorations, que l'on cherche à obtenir par la sélection classique, qui sont susceptibles de bénéficier de la transgénèse. La lutte contre les maladies paraît un

domaine d'intervention de la transgénèse particulièrement souhaitable. Une partie non négligeable des animaux d'élevage est en effet décimée par des maladies non contrôlées. Des animaux devenus génétiquement résistants à des maladies *via* la transgénèse réduiraient les pertes, le mal-être animal, certains soucis des éleveurs, ainsi que les fréquences des zoonoses (tableau 1). Il est important de noter par ailleurs qu'une bonne partie des transgènes ayant une action anti-pathogène n'interfèrent en principe pas avec la physiologie des animaux.

Les données du tableau 2 résument les principaux projets en cours visant à créer des lignées d'animaux domestiques génétiquement améliorées. Les différents projets en cours peuvent être regroupés en plusieurs catégories.

La lutte contre les maladies

Des vaches exprimant dans leur lait des gènes antibactériens ont été obtenues. Ces gènes sont ceux codant pour la lysostaphine (WALL *et al.*, 2005), la lactoferrine humaine et le lysozyme humain (Transgenic Animal Research Conference, 2005). Ces protéines réduisent plus ou moins intensivement la fréquence des mammites. Elles pourraient également protéger les consommateurs humains et animaux contre des infections du tractus digestif.

Des vaches chez lesquelles le gène PrP a été inactivé par recombinaison homologue *via* le clonage sont disponibles. Ces animaux devraient être résistants aux maladies *a priori* de type ESB (KUROIWA *et al.*, 2004).

Des souris surexprimant la région soluble du récepteur du virus de la maladie d'Aujeszky sont totalement résistantes au virus. Cette protéine qui joue le rôle de transdominant négatif est actuellement chez des porcs transgéniques qui devraient également être génétiquement résistants à la maladie (ONO *et al.*, 2004).

Des poissons chats nord-américains exprimant le gène de la cécropine B (un petit peptide anti-bactérien à large spectre) sont résistants à des infections bactériennes multiples (Transgenic Animal Research Conférence, 2005).

Des souris transgéniques secrétant dans leur lait un anticorps recombinant dirigé contre un coronavirus, ont des portées résistantes au virus, tant que celles-ci sont allaitées par leur mère (CASTILLA *et al.*, 1998).

L'augmentation des productions animales

Les projets les plus avancés dans ce domaine sont ceux visant à accélérer la croissance de certains poissons d'élevage par l'action du transgène de l'hormone de croissance. Cela concerne actuellement le saumon, la truite, le tilapia, la carpe, la loche et le poisson-chat. Ces animaux utilisent moins de nourriture et moins d'espace et leur chair est semblable à celle des animaux contrôlés. L'utilisation industrielle de ces animaux ne sera toutefois autorisée que lorsque des systèmes mécaniques ou physiologiques auront réussi à empêcher l'évasion des poissons dans les eaux sauvages. Les chances qu'une telle évasion ait des conséquences environnementales néfastes, apparaissent très faibles mais ceci ne peut être démontré avec certitude dans tous les cas (MUIR, 2004).

La myostatine est une protéine qui limite la croissance musculaire. Des mutants naturels du gène ont un développement très amplifié de leurs muscles squelettiques. La surexpression du gène codant une portion de la myostatine ayant un effet transdominant négatif, induit une hypertrophie du muscle chez des souris transgéniques. Cette approche paraît intéressante dans la mesure où l'hypertrophie musculaire peut n'être induite qu'après la naissance des animaux, ce qui n'oblige pas à recourir à des césariennes, comme c'est le cas pour les races culards et blancs bleus. Ce modèle est actuellement étendu à de gros mammifères ainsi qu'au saumon. Une perspective intéressante consiste à intégrer le gène du transdominant de la myostatine dans le chromosome Y de vache de races à lait. Les femelles de ces lignées produiraient du lait comme cela est déjà le cas et les mâles deviendraient des producteurs de viande intéressants. Les résultats obtenus chez des souris invitent à considérer que cette approche n'est pas une utopie (PIROTTIN *et al.*, 2005).

Diverses tentatives pour accélérer la croissance de la laine de mouton et changer la texture de ses fibres se sont jusqu'à maintenant traduites par des résultats décevants (BAWDEN *et al.*, 1999).

L'amélioration de la qualité de la nourriture

Du lait contenant moins de lactose, qui est mal toléré par une large partie de la population mondiale, a été obtenu en exprimant un gène de la lactase dans le lait ou en réduisant l'expression du gène de l' α -lactalbumine.

Des vaches chez lesquelles le gène de la β -lactoglobuline du lait a été inactivé, sont actuellement à l'étude. Le lait de ces animaux devrait avoir perdu un de ses allergènes (Transgenic Animal Research Conference, 2005).

La surexpression du gène de la caséine K chez des vaches induit une réduction de la taille des micelles. Ceci peut améliorer la qualité de la pâte à fromage.

Les laits mentionnés plus haut, et contenant des protéines antibactériennes, pourraient contribuer à protéger les consommateurs, les animaux, mais aussi les pâtisseries et les produits laitiers contre des infections bactériennes (BROPHY *et al.*, 2003).

Des porcs exprimant le gène de la Δ -12 désaturase d'épinard ont plus d'acide linoléique dans leurs cellules adipeuses (SAEKI *et al.*, 2004). Des souris exprimant les gènes de la Δ -12 désaturase et de la Δ -3 désaturase ont plus d'acide linoléique dans leur lait (Transgenic Animal Research Conference, 2005). Ces produits pourraient contribuer à protéger les consommateurs des maladies cardiovasculaires.

Dans le futur, des projets plus ambitieux pourraient voir le jour. Des poissons exprimant les gènes permettant la digestion des carbohydrates, pourraient recevoir une alimentation bon marché contenant des polysaccharides et non seulement des protéines.

Des mammifères monogastriques et des poulets pourraient synthétiser leur lysine et leur méthionine, ce qui n'obligerait

Fonction biologique	Avantages attendus
Résistance aux maladies	<ul style="list-style-type: none"> - Moindre utilisation des antibiotiques - Meilleur bien-être des animaux - Simplification des élevages - Augmentation de la production - Diminution des risques d'infections pour l'homme
Digestion et métabolisme	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la pollution - Augmentation de la production - Meilleure utilisation de la nourriture - Adaptation à des aliments disponibles - Changements métaboliques profonds
Composition du lait	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de l'allergénicité et de l'intolérance - Optimisation de la composition en protéines - Optimisation de la composition en lipides - Protection contre les maladies (immunisation active ou passive) - Augmentation du contenu en aliments ou alicaments
Croissance de la laine	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la croissance de laine - Optimisation de la composition de la laine
Croissance de la carcasse	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la croissance musculaire - Diminution du stockage de lipides - Meilleure composition en lipides - Réduction de la consommation de nourriture
Reproduction	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la prolificité

Tableau 1 : Les gènes utilisables pour améliorer les productions animales.

Gènes	Animal	Tissus	Effets observés
Lysostaphine	Souris Vache	Glande mammaire	Effets antibactériens Réduction des mammites
Lactoferrine	Vache	Glande mammaire	En cours
Lysozyme	Chèvre Vache	Glande mammaire	Effets antibactériens Réduction des mammites
PrP (ko)	Vache	Tous les tissus	Résistance à ESB (en cours)
RNAi anti-PrP	Souris	Tous les tissus	Résistance à ESB (en cours)
Cécropine B	Poisson chat	Tous les tissus	Effets anti-bactériens
Récepteur soluble du virus d'Aujeszky	Souris	Tous les tissus	Protection contre le virus d'Aujeszky
Phytase	Porc	Glande salivaire	Réduction des rejets de phosphate
Hormone de croissance	Porc Mouton Poissons	Divers	Légère augmentation de la croissance Non augmentation de croissance, diabète Accélération de la croissance
IGF ₁	Porc	Muscle	Augmentation de la croissance musculaire
Dominant négatif de la myostatine	Souris Vache Saumon	Muscle	Augmentation de la croissance musculaire
Lactase	Souris	Glande mammaire	Diminution du lactose
α-lactalbumine (ko)	Souris	Glande mammaire	Absence de lactose Faible sécrétion de lait
RNA anti-α-lactalbumine	Souris	Glande mammaire	Réduction du lactose
Phe-α-lactalbumine humaine	Mouton	Glande mammaire	Sécrétion de phe-α-lactalbumine (protéine sans phenylalamine) (encours)
α-lactalbumine bovine IGF ₁	Porc	Glande mammaire	Augmentation de la valeur nutritive du lait Augmentation du nombre de porcelets sevrés
β-lactalbumine (ko)	Vache	Glande mammaire	Réduction de l'allergénicité du lait (en cours)
Δ ¹² désaturase	Porc	Adipocytes	Augmentation d'acide linoléique dans les adipocytes
Δ ¹² désaturase	Souris	Glande mammaire	Augmentation des acides gras Δ ³ dans le lait
Δ ³ désaturase	Souris	Glande mammaire	Augmentation des acides gras Δ ³ dans le lait
Caséine-k	Souris Vache	Glande mammaire	Réduction de la taille des micelles
Immunoglobuline (IgG)	Souris	Glande mammaire	Activité antivirale (coronavirus)
Serine → Cystéine	Mouton	Divers tissus	Augmentation de la croissance de la laine
Kératines	Mouton	Kératinocytes	Changement de la composition de la laine
Enzyme de digestion des carbohydrates	Lapin Poisson	Intestin	Augmentation de la digestion des sucres (en cours)
Acétate → glucose	Mouton		Meilleure efficacité du métabolisme (en cours)

Tableau 2 : Effets de transgènes dans des tissus de différents animaux.

plus à procéder à des suppléments alimentaires coûteuses. Un projet complexe pourrait consister à permettre aux ruminants de transformer leur acétate provenant du rumen en glucose plus directement utilisable par les cellules. Des truies sécrétant de l' α -lactalbumine de porc et de l'IGF₁ dans leur lait peuvent nourrir un plus grand nombre de porcelets. Ceci pourrait se traduire par une diminution significative du prix de la viande de porc (BLECK, 1998).

La réduction de l'impact environnemental

Un certain nombre d'espèces monogastriques ne digèrent pas l'acide phytique qui est rejetée dans l'environnement par les animaux ; ces rejets se trouvent être une des causes majeures de la pollution par les phosphates. Des porcs sécrétant dans leur salive de la phytase d'*E.coli* éliminent moitié moins de phosphate polluant. Ce procédé éviterait d'ajouter de la phytase extraite à partir de plantes ou de levures. Cette méthode est en effet moins efficace que celle mettant en œuvre les porcs transgéniques et elle est plus polluante, dans la mesure où la préparation de phytase est consommatrice d'énergie et engendre des sous-produits qu'il faut éliminer (GOLOVAN *et al.*, 2001 ; Transgenic Animal Research Conference, 2005).

Amélioration du bien-être animal

La lutte contre les maladies et une meilleure adaptation de l'alimentation animale *via* la transgénèse, peut contribuer à augmenter le bien-être animal.

• LES PROBLÈMES DE BIOSÉCURITÉ

La transgénèse, comme la sélection génétique, engendre des animaux dont les propriétés biologiques ne sont pas complètement connues. Des tests spécifiques et rigoureux sont appliqués pour évaluer les éventuels effets néfastes sur les consommateurs (FAO/WHO, 2003). Il ne peut être exclu que l'intégration non contrôlée d'un transgène ou le produit du transgène lui-même sensibilise les animaux vis-à-vis de maladies infectieuses transmissibles aux troupeaux et à l'homme. Les mesures de surveillance proposées paraissent suffisantes pour limiter de tels effets des transgènes.

Le clonage est de plus en plus souvent impliqué dans l'obtention d'animaux d'élevage transgéniques. Le clonage en soi peut induire des modifications épigénétiques des animaux. Les risques encourus paraissent, en bien des points, semblables à ceux potentiellement engendrés par la transgénèse. Les tests appliqués aux animaux transgéniques et clonés sont donc les mêmes pour l'essentiel (AFSSA, 2005).

La dissémination volontaire ou non des animaux transgéniques peut poser des problèmes environnementaux spécifiques. Ceux-ci sont moins importants pour la plupart des animaux que pour les plantes. Les animaux d'élevage sont en effet le plus souvent maintenus dans des espaces confinés et beaucoup d'entre eux n'ont pas d'équivalents sauvages avec lesquelles ils pourraient se croiser. Une classification des principales espèces en fonction des risques croissants de dissémination est la suivante : vache, mouton, poulet, chien, lapin, cheval, porc, chat, rat, souris, poissons, coquillages et insectes.

Des confinements mécaniques sont possibles dans tous les cas mais ils peuvent être coûteux. Une stérilisation conditionnelle paraît possible dans certains cas *via* la création d'animaux marins triploïdes, l'utilisation de RNAi dirigés contre l'ARNm de l'hormone gonadotrope ou la synthèse de stéréphérol qui arrête le développement fœtal (MUIR, 2004).

Aucun de ces problèmes concernant les animaux d'élevage ne paraît insurmontable mais ils ne sont pas tous résolus.

• ACCEPTABILITÉ DES PRODUITS PROVENANT DES ANIMAUX TRANSGÉNIQUES

Il est impossible de déterminer lequel des projets en cours permettra la mise sur le marché de produits alimentaires nouveaux mais il semble peu douteux que l'approche transgénique peut et va contribuer à améliorer les productions animales.

Un problème important est l'acceptabilité de ces nouveaux produits par les consommateurs. Dans tous les pays, les produits provenant des organismes génétiquement modifiés font l'objet d'un rejet de principe, à des degrés divers, par au moins la moitié des consommateurs. Les arguments des opposants sont les suivants : 1) les nouveaux produits sont inconnus et potentiellement dangereux pour les humains, 2) un contrôle de la dissémination des transgènes ne peut pas être garanti dans tous les cas, 3) une surutilisation des techniques, en particulier en ce qui concerne le monde vivant, n'est pas indispensable pour la survie des communautés humaines, 4) les modifications peuvent diminuer le bien-être animal.

Ces arguments sont tous pertinents et ils font tous l'objet d'études et de réglementations dans les pays concernés.

Dans certains pays, des groupes pour et contre l'utilisation des organismes génétiquement modifiés pour l'alimentation existent et cela permet une véritable confrontation des arguments. Dans d'autres, notamment en Europe, les opposants sont bien organisés et ils ont un fort impact sur l'opinion publique. Ceux qui pensent que le recours à la transgénèse représente un véritable progrès pour l'humanité, en particulier pour les pays pauvres, ne sont pas bien organisés et leur impact sur la société est très limité.

Un point paraît frappant. L'acceptabilité, par l'opinion publique de la plupart des pays, des produits issus d'organismes génétiquement modifiés, incluant les animaux, ne repose pas véritablement sur une attitude rationnelle. Les informations sur ces sujets et en particulier, la diffusion des données validées concernant l'absence de risque de tel ou tel produit, n'ont actuellement qu'un impact limité sur l'opinion publique. Ceci suggère que l'acceptation des produits issus des organismes génétiquement modifiés devrait devenir une réalité mais dans un temps imprévisible. Pendant ce temps, il serait déraisonnable et imprudent de ne pas poursuivre les recherches et le développement de projets qui apparaissent les plus pertinents.

BIBLIOGRAPHIE

- AFSSA (2005) Bénéfices et risques liés aux applications du clonage des animaux d'élevage.
- BAER A, BODE J (2001) Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 473-480.
- BAWDEN CS, DUNN SM, McLAUGHLAN J, NESCI A, POWELL BC, WALKER SK, ROGERS GE (1999) Transgenesis with ovine keratin: expression in the sheep wool follicle for fibres with new properties. *Transgenic Res.*, **8**, 459-461.
- Biotechnology applications in animal health and production (2005) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **24** (special multiauthors issue).
- BLECK GT, WHITE BR, MILLER DJ, WHEELER MB (1998) Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J. Anim. Sci.*, **76**, 3072-3078.
- BROPHY B, SMOLENSKI G, WHEELER T, WELLS D, L'HUILLIER P, LAIBLE G (2003) Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 157-162.
- CASTILLA J, PINTADO B, SOLA I, SANCHEZ-MORGADO JM, ENJUANES L (1998) Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus- neutralizing antibodies in milk. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 349-354.
- DUPUY AJ, CLARK K, CARLSON CM, FRITZ S, DAVIDSON AE, MARKLEY KM, FINLEY K, FLETCHER CF, EKKER SC, HACKETT PB, HORN S, LARGAESPADA DA (2002) Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4495-4499.
- FAO/WHO, (2003) Expert consultation on the Safety assessment of Foods derived from genetically modified animals, including fish. Rome.
- GIRALDO P, RIVAL-GERVIER S, HOUDEBINE LM, MONTOLIU L (2003) The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Res.*, **12**, 751-755.
- GOLOVAN SP, HAYES MA, PHILLIPS JP, FORSBERG CW (2001) Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 429-433.
- HOUDEBINE LM (2001) *Transgènèse animale et clonage*. Dunod éditeur, Collection Masson Sciences, 160 p.
- HOUDEBINE LM (2002) Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 625-629.
- HOUDENINE LM (2003) *Animal transgenesis and cloning*. Ed. Wiley and Sons, 250 p.
- HOUDEBINE LM (2004) The mouse as an animal model for human diseases. In: HEDRICH H, editor. *The laboratory mouse*. Academic Press, pp. 99-110.
- HOUDEBINE LM (2005) Transgenic animal models and target validation. *Methods in Molecular Biology* (in press).
- HOUDEBINE LM, ATTAL J, VILOTTE JL (2002) Vector design for transgene expression. In: PINKERT CA, editor, 2^e édition. *Transgenic animal technology*, pp. 419-458.
- HOUDEBINE LM, WEILL B (1999) The impact of transgenesis and cloning on cell and organ xenotransplantation to humans. ECS 9 Brussels. *Focus on Biotechnology*, 351-361.
- KUROIWA Y, KASINATHAN P, MATSUSHITA H, SATHIYASELAN J, SULLIVAN EJ, KAKITANI M, TOMIZUKA K, ISHIDA I, ROBL JM (2004) Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-micro and prion protein in cattle. *Nat. Genet.*, **36** (7), 671-672.
- LAVITRANO M, FORNI M, BACCI ML, DI STEFANO C, VARZI V, WANG H, SEREN E (2003) Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol. Reprod. Dev.*, **64**, 284-291.
- MOREIRA PN, GIRARLDO P, COZAR P, POZUETA J, JIMENEZ A, MONTOLIU L, GUTIERREZ-ADAN A (2004) Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, **71**, 1943-1947.
- MUIR WM (2004) The threats and benefits of GM fish. *EMBO Rep.*, **5**, 654-659.
- NOVINA CD, SHARP PA (2004) The RNAi revolution. *Nature*, **430**, 161-164.
- ONO E, AMAGAI K, YOSHINO S, TAHARAGUCHI S, INOBE M, UEDE T (2004) Resistance to pseudorabies virus infection in transformed cell lines expressing a soluble form of porcine herpesvirus entry mediator C. *J. Gene. Virol.*, **85**, 173-178.
- PIROTTIN D, GROBET L, ADAMANTIDIS A, FARNIR F, HERENS C, DAA SCHRODER H, GEORGES M (2005) Transgenic engineering of male-specific muscular hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, 6413-6418.
- SAEKI K, MATSUMOTO K, KINOSHITA M, SUZUKI I, TASAKA Y, KANO K, TAGUCHI Y, MIKAMI K, HIRABAYASHI M, KASHIWAZAKI N, HOSOI Y, MURATA N, IRITANIA (2004) Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6361-6366.
- Transgenic Animal Research Conference V (2005) Tahoe City. Résumés à paraître dans *Transgenic Research*.
- WALL RJ, POWELLI AM, PAAPE MJ, KERR DE, BANNERMAN DD, PURSEL VG, WELLS KD, TALBOT N, HAWK HW (2005) Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 445-451.
- WEBER W, FUSSENEGGER M (2004) Approaches for trigger-inducible viral transgene regulation in gene-based tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 383-391.
- WHITELAW CBA (2004) Transgenic livestock made easy. *Trends in Biotechnol.*, **22**, 157-160.
- WHITELAW CB, RADCLIFFE PA, RITCHIE WA, CARLISLE A, ELLARD FM, PENA RN, ROWE J, CLARK AJ, KING TJ, MITROPHANOUS KA (2004) Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett.*, **571**, 233-236