



Les animaux transgéniques

Louis-Marie Houdebine

Directeur de Recherche honoraire, INRA, France
Membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France

Manuscrit révisé le 8 juin 2013 - Publié le 28 novembre 2013

Résumé : La transgénèse permet de replacer un gène dans son environnement complexe qu'est un organisme entier. Elle comprend l'addition de gènes étrangers, mais aussi le remplacement d'allèles et l'inactivation ciblée de gènes. Pour le règne animal, la transgénèse permet 1) de mieux comprendre les mécanismes de la régulation de l'expression des gènes, mais aussi leur fonction dans l'organisme 2) de créer des modèles pour l'étude de maladies humaines, 3) d'adapter des cellules et des organes pour des transplantations à l'homme, 4) de produire massivement des protéines pharmaceutiques dans le lait, le blanc d'œuf ou le sang, 5) d'accroître la diversité génétique des animaux d'élevage. Les techniques de transfert de gènes ont dû être adaptées aux différentes espèces. Les vecteurs d'expression des transgènes sont devenus beaucoup plus performants. Les techniques pour l'obtention d'animaux transgéniques (ou animaux génétiquement modifiés, AGM) dans le but d'améliorer les productions animales et les coûts ne sont plus des facteurs limitants.

Les premiers animaux d'élevage génétiquement modifiés, des saumons, devraient être sur le marché en 2013. Les applications de la transgénèse animale doivent également faire face à des problèmes de biosécurité spécifiques (dissémination irréversible des animaux) et d'acceptabilité par les consommateurs en rapport avec le bien-être animal. Cette revue se propose de faire le point sur les avancées de la transgénèse animale.

Mots clefs : Animaux transgéniques, animaux génétiquement modifiés (AGM), recherche fondamentale, modèles de maladie humaine, production d'organes et de protéines pharmaceutiques, amélioration des productions animales, confinement, bien-être animal.

1. Introduction

La transgénèse est le prolongement logique de la sélection génétique classique fondée sur le choix des meilleurs géniteurs provenant de mutations spontanées, aléatoires et inconnues, ainsi qu'à l'obtention d'hybrides interspécifiques comme le mulot dans le domaine animal ou comme le triticales dans le domaine végétal. Le gène sélectionné classiquement sur la base du phénotype, donc de ses effets biologiques, est le plus souvent inconnu ainsi que les gènes environnant de la même portion de chromosome. La sélection classique présente donc plusieurs limites intrinsèques : la reproduction sexuée ne procède que par une redistribution des diverses versions naturelles ou obtenues par des mutagenèses expérimentales aléatoires des gènes de l'espèce. Une autre limite vient du fait que la reproduction sexuée ne redistribue pas des gènes individuellement mais des portions plus ou moins longues de chromosomes dans lesquelles se trouvent éventuellement des gènes d'intérêt. La sélection classique se caractérise donc en pratique par une co-sélection de gènes d'intérêt et de dizaines voire de centaines de gènes inconnus situés au voisinage des gènes d'intérêt et qui sont co-transmis au cours des

génération successive. Ceci conduit parfois à l'émergence de gènes ayant des effets indésirables (Figure 1). Un processus de sélection réussi peut alors se révéler inexploitable en pratique.

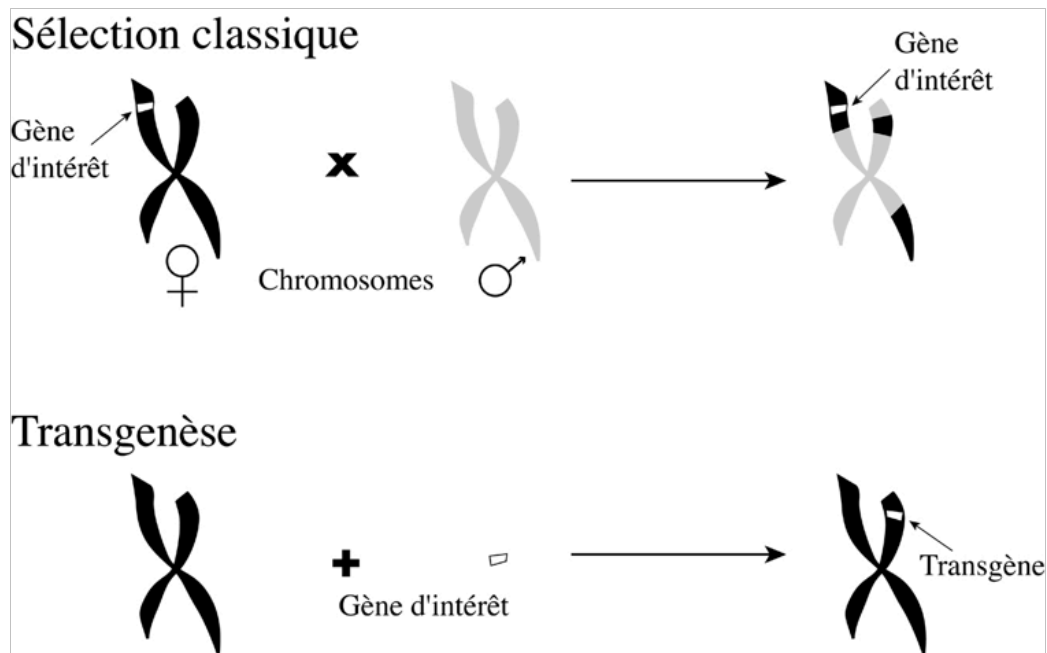


Figure 1. La sélection génétique via la reproduction ou la transgénèse.

D'un point de vue expérimental, la transgénèse est plus subtile, plus précise et elle permet surtout de procéder à des modifications génétiques très variées en une seule génération. La transgénèse permet d'éviter de co-sélectionner en aveugle les dizaines ou centaines de gènes qui entourent le gène d'intérêt dont les effets sont attendus. La transgénèse peut aussi dans certains cas modifier localement le fonctionnement du génome, induisant ainsi des effets inattendus qui doivent être pris en compte tant pour s'assurer de la pertinence d'un modèle que pour évaluer d'éventuels problèmes de biosécurité.

La transgénèse s'appuie sur des modifications génétiques effectuées à partir de gènes connus et disponibles. Elle comprend l'addition non ciblée ou ciblée de gènes étrangers, le remplacement d'allèles et l'inactivation ciblée de gènes. Le remplacement d'allèle consiste à substituer une version d'un gène par une autre version naturelle ou obtenue par génie génétique. Cette opération correspond à la mutation spécifique d'un gène de l'organisme qui aurait pu se produire spontanément à la suite d'une sélection classique portant sur un nombre élevé voire très élevé de générations. Cette technique se distingue donc de la transgénèse et elle porte le nom de *cisgénèse*.

Par définition, la transgénèse suppose que les modifications génétiques de l'organisme soient transmises à la descendance en général par la reproduction sexuée. Elle concerne donc toutes les cellules de l'organisme et la modification génétique doit pour cela avoir lieu dans l'embryon au stade une cellule ou dans des cellules capables de participer au développement de l'embryon.

La sélection classique et la transgénèse ne s'opposent donc pas, mais au contraire se complètent. La sélection classique permet de favoriser l'émergence de caractères dépendants de plusieurs gènes inconnus. La transgénèse excelle par contre lorsqu'il s'agit de transférer un caractère précis dépendant d'un gène connu. Les techniques de la sélection classique sont par ailleurs mises en œuvre pour disséminer les caractères portés par les transgènes dans des individus de l'espèce ayant des fonds génétiques variés.

2. Les techniques de transgénèse

2.1. Le transfert direct de gènes dans les embryons

Les techniques de transgénèse concernent deux types de problèmes : le transfert de gènes et le contrôle de l'expression des transgènes. Ces techniques ont été décrites dans un livre (Houdebine, 2003).

2.1.1. La microinjection d'ADN

Les premiers organismes transgéniques ont été obtenus en 1980 (Gordon *et al.* 1980). Il s'agissait de souris portant un gène étranger introduit par microinjection dans un des pronoyaux des embryons au stade 'une cellule'. Cette technique est encore la plus utilisée chez la souris, le lapin et certains poissons. Son rendement est de l'ordre de 1-2 transgéniques pour 100 embryons de souris et de lapins microinjectés. Chez les animaux ovipares, les pronoyaux ne sont pas visibles et la microinjection doit avoir lieu dans le cytoplasme. Les gènes étrangers s'intègrent de manière non ciblée avec, pour des raisons inconnues, un rendement très variable selon les espèces. Une variante de la technique, la nano-injection, permet de multiplier par 4 le taux d'intégration de l'ADN étranger chez la souris. La survie des embryons est par ailleurs plus élevée qu'avec la microinjection (Aten *et al.* 2012).

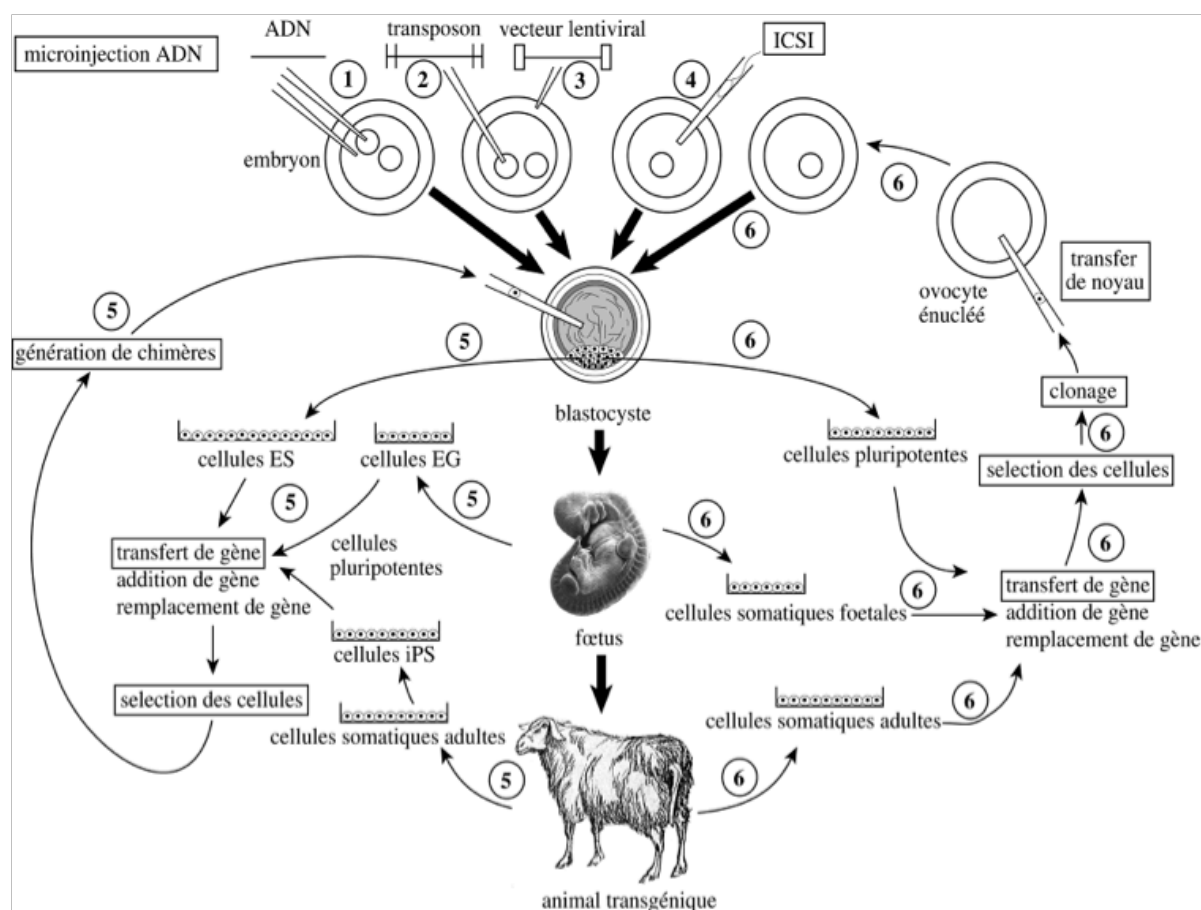


Figure 2. Les différentes méthodes de transgénèse basée sur le transfert direct d'ADN dans des embryons ou sur l'utilisation de cellules intermédiaires. Les **méthodes 1) 2) 3) et 4)** sont décrites dans le texte (partie 2.1.). **Méthode 5)** : les modifications génétiques peuvent être effectuées dans des cellules souches pluripotentes provenant des embryons (cellules ES) ou de cellules somatiques d'organes différenciées *in vitro* (cellules iPS : induced pluripotent cells) ou dans des cellules souches multipotentes de gonades foétales (cellules EG). Les cellules pluripotentes réintroduites dans un blastocyste receveur participent au développement de tous les organes et donnent naissance à des animaux chimères transgéniques. Les cellules EG donnent naissance à des animaux dont les gonades et les gamètes portent les transgènes qui sont transmis à la descendance. **Méthode 6)** : les cellules somatiques qui ont reçu des gènes étrangers peuvent être utilisées pour engendrer des animaux clonés transgéniques.

Cette méthode a permis d'obtenir en 1982 (Palmiter *et al.* 1982) des souris devenues géantes car porteuses d'un gène supplémentaire de l'hormone de croissance. Cette expérience a démontré que la transgénèse permettait des études physiologiques nouvelles *in vivo*. En 1985, des lapins, des moutons et des porcs transgéniques ont été obtenus par la microinjection d'ADN, démontrant que la transgénèse devait être possible chez de multiples espèces (Hammer *et al.* 1985). Cette expérience a également montré que la technique utilisée était trop peu efficace. Il a donc fallu rechercher d'autres méthodes de transfert de gènes. Ces méthodes sont résumées dans la figure 2.

2.1.2. Utilisation des transposons

Les transposons sont des éléments naturels des génomes capables de s'auto-répliquer et de s'intégrer dans le même génome via l'action d'une intégrase (ou transposase) dont le gène est porté par le transposon. Il est possible d'introduire un gène d'intérêt dans des transposons qui, en s'intégrant, insèrent le gène étranger efficacement. Plusieurs transposons ayant des origines diverses ont été optimisés notamment en augmentant l'activité des intégrases pour avoir une efficacité élevée dans différentes espèces animales. Les transposons sont régulièrement utilisés depuis plus de deux décennies pour obtenir des insectes transgéniques.

Le transposon piggyBac est particulièrement utilisé pour obtenir des oiseaux transgéniques via le transfert des gènes étrangers dans des PGC (cellules primordiales germinales qui sont à l'origine des cellules EG) (Park *et al.* 2012 ; MacDonald *et al.* 2012 ; Urschitz *et al.* 2010 ; Liu *et al.* 2013). Le transposon Tol2 est efficace chez les poissons aussi bien que chez la souris et il est capable de transférer jusqu'à 66 kb d'ADN étranger (Suster *et al.* 2009 ; Sumiyama *et al.* 2010). Le transposon Sleeping Beauty a été considérablement amélioré et le mutant SB100X est particulièrement efficace (Garrels *et al.* 2011 ; Mates *et al.* 2009). Il est intéressant de noter que le piggyBac s'intègre préférentiellement au voisinage de gènes ou l'intérieur de gènes. Le piggyBac peut donc ainsi provoquer des altérations du génome de l'hôte. Plusieurs vecteurs dérivés du piggyBac et contenant le gène de l'intégrase ou contenant une intégrase auto-inactivée sont disponibles (Urschitz *et al.* 2010 ; Marh *et al.* 2012). Il est remarquable que le piggyBac s'est avéré capable de transférer des fragments d'ADN de 150 kb chez la souris (Rostovskaya *et al.* 2012). Le transposon SB100X ne s'intègre pas dans des régions du génome riches en gènes et on ne s'attend donc pas à ce qu'il interfère avec l'expression des gènes de l'hôte. Le SB100X peut être présent en multiples copies indépendantes dans le génome de l'hôte. Toutes les copies semblent également actives et le niveau d'expression des transgènes est proportionnel au nombre de copies intégrées. Le SB100X s'intègre donc préférentiellement dans l'euchromatine où il est protégé contre les mécanismes épigénétiques conduisant à l'extinction des transgènes. Le SBX100 est stable et son niveau d'expression est maintenu chez les descendants des fondateurs transgéniques.

Les transposons peuvent transférer des gènes efficacement dans des embryons d'espèces variées, dans des cellules en culture ES, EG ou iPS, et directement dans les PGC *in vivo* par lipofection à l'aide du transposon Tol2 (Tyack *et al.*, 2013) ainsi que dans les cellules somatiques devant être utilisées comme source de noyaux pour le clonage (SCNT). La manipulation des transposons ne comporte pas de risques particuliers elle ne nécessite aucun confinement spécifique.

2.1.3. Utilisation de vecteurs viraux

Les rétrovirus doivent s'intégrer dans les génomes des cellules hôtes pour se répliquer. Des vecteurs rétroviraux et plus particulièrement des vecteurs lentiviraux sont capables d'infecter des embryons et de permettre l'intégration d'un gène étranger avec une haute efficacité. Des adaptations de la méthode ont permis d'obtenir des animaux transgéniques de différentes espèces (Hiripi *et al.* 2010 ; Lillico *et al.* 2011 ; Miao *et al.* 2010 ; Richtie *et al.* 2009). Ces vecteurs sont limités par la taille des fragments d'ADN qu'ils peuvent véhiculer. Ils sont bien adaptés pour exprimer des gènes codant des ARN interférents (voir 2.4). Des vecteurs lentiviraux les plus utilisés dérivent du VIH et des singes transgéniques ont pu être obtenus à l'aide de vecteurs dérivés du virus simien VIS.

L'intégration des vecteurs lentiviraux n'est pas contrôlée par les expérimentateurs et les transgènes portés par ce type de vecteurs sont sensibles aux mécanismes épigénétiques d'extinction. Cette limite est contrebalancée par la haute efficacité du transfert de gènes. Il est ainsi possible d'obtenir des porcs transgéniques exprimant des transgènes à des taux différents et ayant un fonds génétique propre. De tels animaux peuvent constituer des modèles particulièrement précieux pour l'étude de maladies humaines complexes dont la gravité dépend du taux d'expression des gènes responsables de la maladie. Le nombre des fondateurs, chez le porc notamment, est si élevé qu'ils peuvent être utilisés directement sans constituer une dépense excessive.

Des vecteurs dérivés de l'AAV (Adeno Associated Virus) peuvent également transférer des gènes dans des embryons de manière aléatoire ou ciblée (Larochelle *et al.* 2001).

2.1.4. Utilisation de l'ICSI

La fécondation in vitro peut être réalisée par microinjection de spermatozoïdes actifs ou non dans le cytoplasme d'ovocytes. Cette méthode (ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection) qui est appliquée couramment à l'espèce humaine a été mise à profit pour transférer des gènes. Les spermatozoïdes sont congelés et décongelés pour rompre leur membrane plasmique. Ils sont ensuite incubés en présence de l'ADN à transférer. Dans ces conditions, l'ADN se fixe sur les cellules mais ne s'intègre pas. Les spermatozoïdes chargés en ADN sont alors microinjectés dans des ovocytes. L'ADN ainsi transféré s'intègre avec une fréquence supérieure à celle obtenue avec la microinjection d'ADN. Cette méthode est utilisée avec succès chez la souris, le porc et le poisson médaka (Moreira *et al.* 2007 ; Yong *et al.* 2006 ; Liu *et al.* 2011). La limite de la méthode est essentiellement la maîtrise que l'on a ou pas de l'ICSI dans les différentes espèces.

2.2. Le transfert de gènes via des cellules intermédiaires

Lorsque les modifications génétiques ont lieu avec une trop faible fréquence, il est nécessaire de procéder à ces modifications dans des cellules qui ont la capacité de participer au développement d'embryons. Ces cellules doivent également être capables de transmettre les modifications génétiques à la descendance. Ces situations se rencontrent lorsque l'intégration spontanée et aléatoire de l'ADN étranger est un événement rare et lorsque l'on souhaite cibler l'intégration du gène étranger. Cette opération nécessite une recombinaison homologue entre l'ADN étranger et sa cible génomique. La recombinaison homologue est 100 à 1000 fois moins fréquente que la recombinaison hétérologue qui est responsable de l'intégration aléatoire non ciblée. Les différentes cellules mises à contribution sont décrites dans la figure 2.

2.2.1. Utilisation des cellules ES

Historiquement ce sont les cellules ES (Embryonic Stem Cells) de souris qui ont été utilisées les premières pour procéder à des intégrations ciblées de gènes (Bronson et Smithies, 1994 ; Capecchi, 1989) (Figure 2, méthode 5). La transposition de cette méthode à d'autres espèces n'a pas été possible pendant plus de deux décennies malgré des efforts soutenus. En effet, les cellules pluripotentes provenant d'embryons se différencient spontanément pendant la culture. Elles perdent alors leur pluripotence et sont incapables de transmettre les modifications génétiques qu'elles portent à leur descendance. Il y a quelques années seulement des cellules ES de rat authentiques ont pu être obtenues en ajoutant dans les milieux de culture des substances qui bloquent la différenciation spontanée des cellules ES (Hamra, 2010).

2.2.2. Utilisation des cellules iPS

Les cellules iPS (induced Pluripotent Cell) ont été obtenues par une dédifférenciation de cellules somatiques provenant de divers organes. La dédifférenciation est induite par le transfert dans les cellules somatiques de quatre des gènes qui caractérisent l'état de pluripotence des cellules ES. Les cellules iPS sont considérées comme des cellules pluripotentes même si leurs propriétés sont moins bien connues que celles des cellules ES. Des souris transgéniques ont pu être obtenues à partir de cellules iPS portant un gène étranger (Lee et Lloyd, 2011). Des cellules iPS ont été obtenues chez différentes espèces y compris chez des animaux de ferme. Il est donc probable que les cellules iPS vont devenir un outil de plus pour obtenir des animaux transgéniques (Figure 2, méthode 5).

2.2.3. Utilisation des cellules souches germinales

Pendant presque deux décennies il n'a pas été possible d'obtenir des poulets transgéniques par les méthodes en vigueur. Les vecteurs lentiviraux et les transposons ont permis de sortir de cette situation paralysante. La mise en œuvre de cellules intermédiaires a offert des possibilités particulièrement séduisantes. Des lignées de cellules souches multipotentes de gonades fœtales de poulet (cellules EG, Embryonic Gonad Cells) ont été établies pour obtenir des poulets transgéniques. De telles cellules introduites dans des embryons receveurs donnent naissance à des animaux dont les gamètes portent les transgènes qui sont transmis à la descendance (Figure 2, méthode 5) (Van de Lavoie *et al.* 2006a ; 2006b ; 2012).

Le transfert de gènes directement dans les cellules précurseurs des spermatozoïdes sont également à l'étude (Honaramooz *et al.* 2008).

2.2.4. Utilisation des cellules somatiques et du clonage

Le clonage de la brebis Dolly par transfert de noyau dans des ovocytes énucléés (SCNT, Somatic Cell Nuclear Transfer) a été réalisé essentiellement pour faciliter l'obtention d'animaux transgéniques. Les modifications génétiques sont effectuées dans des cellules somatiques en culture et les noyaux de ces cellules sont transférés dans des ovocytes énucléés receveurs pour donner naissance à des clones transgéniques. Cette méthode relativement laborieuse est actuellement la plus utilisée pour l'obtention des gros animaux de ferme transgéniques (Robl *et al.* 2007). Un des avantages de cette méthode est que la modification génétique peut être examinée dans les cellules et validée avant de procéder au clonage. Le rendement de cette technique est supérieur à la microinjection d'ADN.

2.3. Intégration ciblée des gènes

2.3.1. Utilisation de l'intégrase *phiC31*

Les cellules d'un certain nombre d'espèces contiennent la recombinase *phiC31* qui reconnaît les séquences *attB* et *attP* présentes dans un certain nombre de génomes. Cette intégrase cible par recombinaison homologue l'intégration des vecteurs contenant ces mêmes séquences. Une telle intégration se traduit par la formation in situ de séquences *attL* et *attR* qui ne sont pas reconnues par l'intégrase. L'intégration du gène étranger est donc ciblée et irréversible. Cet outil a été utilisé avec succès chez la Drosophile (Bateman *et al.* 2006) et chez certains poissons. Son usage reste limité.

2.3.2. Utilisation des systèmes *Cre-LoxP* et *Flp-FRT*

Plusieurs autres systèmes de recombinaison sont basés sur l'utilisation de recombinases spécifiques de séquences non présentes dans les génomes des animaux. Les deux recombinases les plus utilisées sont *Cre* et *Flp* qui reconnaissent respectivement les sites de 30 nucléotides environ, *LoxP* et *FRT*, qui doivent avoir été introduits dans les génomes des animaux. La loi d'action de masse implique que l'excision de l'ADN est plus efficace que son intégration. Ces systèmes ne peuvent donc être utilisés pour l'intégration seulement si le processus d'intégration engendre des séquences d'ADN incapables de se recombinaisonner et d'éjecter l'ADN intégré. Cette approche est appelée RMCE (Recombinase-Mediated Cassette Exchange) (Minorikawa *et al.* 2011). Les systèmes *LoxP* et *FRT* sont plus souvent utilisés pour supprimer ('déléter') des régions d'ADN génomique bordées préalablement par des séquences *LoxP* ou *FRT*.

2.3.3. Utilisation d'endonucléases ciblées

Le ciblage de gènes présente plusieurs avantages. Il permet de procéder à un remplacement précis d'allèles, de remplacer un gène actif par un gène inactif ce qui revient à invalider le gène ciblé (KO : knock out) ou par un gène actif non allélique (KI : knock in). Le ciblage de gènes consiste à placer un gène dans un environnement chromatinien connu, ce qui limite très fortement les effets de position généralement observés lorsque les gènes s'intègrent de manière aléatoire par recombinaison hétérologue.

Le ciblage de gènes n'a, pendant deux décennies au moins, pu être mis en œuvre que chez la souris. Le ciblage de gènes repose en effet sur une recombinaison homologue entre les séquences du gène ciblé et les séquences du vecteur de recombinaison. Ces événements sont rares et doivent, selon les méthodes classiques, être basés sur l'utilisation de cellules ES. Cette approche a permis d'obtenir des lignées cellules ES dans lesquelles la quasi-totalité de gènes de souris ont été invalidés. Ces cellules sont disponibles et chaque expérimentateur peut acheter celles dans lesquelles le gène étudié est invalidé (ou remplacé par un mutant du gène) (Montoliu et Whitelaw, 2011). L'expérimentateur peut obtenir des souris avec le gène invalidé en transférant les cellules ES mutées dans des embryons receveurs. Ces pratiques sont décrites en détail dans un livre focalisé sur les souris transgéniques (Houdebine, 2012).

Le ciblage de gènes est possible lorsqu'on utilise les cellules EG, les cellules iPS ou le clonage. Il est apparu toutefois nécessaire d'augmenter le taux de recombinaison homologue dans les cellules. Ceci a été rendu possible en procédant à la coupure des deux brins d'ADN au site génomique choisi. Cette coupure est réparée spontanément par la machinerie cellulaire. En absence d'ADN exogène, la réparation est le plus souvent imparfaite ce qui induit une mutation ponctuelle selon un mécanisme appelé NHEJ (Non Homologous End Joining). Cette opération est parfois qualifiée de transgénése sans transgène. Il s'agit en fait d'une mutagénése dirigée

réalisée directement dans des cellules voire des embryons. En présence d'ADN dont des séquences sont identiques à celle du site génomique ciblé, la réparation de l'ADN clivé s'effectue selon un processus de recombinaison homologue dont l'efficacité est plusieurs centaines de fois plus efficace que celle qui a lieu lorsque l'ADN ciblé n'est pas clivé.

Les outils nécessaires pour obtenir un clivage des deux brins d'ADN au site choisi sont des nucléases ingénierisées pour reconnaître le site choisi. Les nucléases en question sont actuellement des méganucléases, des ZFN (Zinc Finger Nuclease) (Rémy *et al.* 2010 ; Meyer *et al.* 2010 ; Hauschild-Quintern *et al.* 2013) et des TALEN (Transcription Activator-Like Endo Nuclease) (Reyon *et al.* 2012 ; Nature Methods, 2012). Une quatrième possibilité consiste à utiliser des RGEN (RNA Guided Endo Nuclease) également capables de cibler un très grand nombre de sites dans le génome des animaux (Mali *et al.* 2013 ; Mussolino et Cathomen, 2013).

L'efficacité de ces outils est particulièrement élevée permettant des ciblage de gènes et des mutations ciblées directement dans des embryons (Rémy *et al.* 2010 ; Meyer *et al.* 2010), aussi bien chez des mammifères que des poissons (Woods et Schier, 2008).

2.4. Utilisation des ARNi (ARN interférents)

L'inhibition de l'expression de gènes spécifiques chez un animal est une des méthodes essentielles pour identifier leurs fonctions. C'est également un moyen pour bloquer des infections virales et pour inhiber la synthèse de substances toxiques ou allergènes. L'invalidation de gènes (KO) peut être obtenue par recombinaison homologue (voir 2.3.3.) ou par NHEJ (voir 2.3.3.). L'inhibition peut également avoir lieu au niveau des ARN messagers ou au niveau des protéines.

Une découverte fortuite a montré que de longs ARN double brin présents dans des cellules d'eucaryotes sont clivés de manière aléatoire en fragments de 20-22 nucléotides par un complexe de protéines qui dirige un des deux brins vers une séquence complémentaire d'un ARN. Le complexe inhibe l'ARN ainsi ciblé en le dégradant ou en inhibant réversiblement sa traduction. Ces petits ARN ont été qualifiés d'ARN interférents (ARNi). Il a également été montré que les génomes des eucaryotes contiennent plusieurs centaines de gènes codant de petits ARN (les micro ARN, miARN) qui sont modifiés pour devenir des ARNi et agir selon les mêmes mécanismes. Les miARN sont donc des éléments régulateurs naturels essentiels de l'expression des gènes. Des gènes contenant des séquences synthétiques d'ADN codant de petits ARN peuvent être transférés dans des cellules ou des organismes entiers et donner naissance à des ARNi capables d'inhiber les ARN cellulaires ainsi ciblés. Ces opérations ont été qualifiées de knock down (KD) par analogie avec les KO. Plusieurs vecteurs peuvent être utilisés pour exprimer les gènes codant des ARNi : des vecteurs lentiviraux (Tiscornia *et al.* 2003), des vecteurs contenant des promoteurs de gènes codant des petits ARN et transcrits par l'ARN polymérase III (Daniel-Carlier *et al.* 2013) ou des vecteurs transcrits par l'ARN polymérase II classiquement utilisés pour la transgénèse. Les séquences codant des précurseurs des ARNi peuvent être introduites dans les introns des vecteurs de type ARN polymérase II. Les transcrits sont alors efficacement maturés pour donner naissance à des ARNi (Ripoll *et al.* 2010).

Les ARNi ne peuvent pas chez les animaux transgéniques provenir de longs ARN double brin, alors que cela est possible chez les plantes transgéniques. Les longs ARN double brin induisent en effet des réactions de défense létales chez les animaux : synthèse d'interférons, activation des récepteurs Toll (Sioud, 2006).

La production d'ARNi doit donc provenir de précurseurs de petite taille. Des règles empiriques ont été établies pour trouver les séquences d'ARNi les plus efficaces et ne reconnaissant pas de cibles secondaires dans les génomes. Il est également essentiel de cibler les ARNi sur des régions des ARNm à inhiber qui sont en simple brin et donc accessibles aux ARNi (RNAi, Nature, 2009). Un nombre limité d'animaux transgéniques exprimant des gènes d'ARNi ont été obtenus jusqu'à ce jour.

Des gènes de précurseurs d'ARNi validés dirigés contre de multiples ARNm murins, humains et autres sont commercialement disponibles.

2.5. Les constructions de vecteurs pour l'expression des transgènes

2.5.1. Construction de vecteurs de base

Les vecteurs d'expression des gènes comprennent au minimum une région promotrice, une région codante contenant au moins un intron et un terminateur de transcription. De tels vecteurs simplifiés expriment plus ou moins bien les gènes dans des cellules en culture et chez des animaux transgéniques. Il est par ailleurs aucunement certain qu'un vecteur qui fonctionne bien dans des cellules en culture soit efficace chez un animal transgénique. Ceci est dû au fait que les gènes contiennent de multiples mécanismes pour réguler leur expression via des signaux qui se trouvent dans les régions promotrices mais également dans les régions transcrites et au-delà de la région traduite en protéine. Ces signaux ne sont pas tous connus. Construire un gène revient donc souvent, en partie, à assembler des signaux mal identifiés ce qui peut conduire à la disparition de signaux importants mais aussi à la création fortuite de signaux délétères. Des recommandations pour éviter les mauvaises surprises sont résumées dans un chapitre de livre (Houdebine, 2009a).

2.5.2. Construction de vecteurs contenant de longues régions d'ADN génomique

Il est maintenant bien établi que les gènes des animaux sont régulés par de multiples mécanismes impliquant des régions de la chromatine parfois très éloignées du gène (jusqu'à 100 kb voire plus). Les régions éloignées grâce à la formation de boucles se positionnent à la proximité du début de la région transcrite du gène en apportant des facteurs régulant la transcription. Les mécanismes d'action de ces multiples régulateurs ne sont que partiellement connus. Certaines régions ont pour effet d'isoler les gènes voisins permettant ainsi aux gènes de ne dépendre que de leurs propres régulateurs. D'autres régions agissent comme des amplificateurs et d'autres enfin ont pour effet de maintenir la chromatine ouverte au site où se trouvent le gène ce qui permet aux facteurs de transcription d'atteindre leurs cibles. Une au moins de ces régions a été étudiée en détail. Il s'agit d'une séquence d'ADN de 300pb qui appartient à la région 5'HS4 du locus de la globine-bêta de poulet. Cette séquence permet à la majorité des transgènes de s'exprimer de manière plus fiable et plus régulière (Taboit-Dameron *et al.* 1999 ; Giraldo *et al.* 2003).

Il est possible d'introduire un gène dans un fragment d'ADN génomique contenant jusqu'à 150 kb et cloné dans un vecteur BAC (Bacterial Artificial Chromosome) puis de transférer cette construction dans un embryon ou des cellules participant au développement d'embryons. Ces constructions permettent souvent une expression des transgènes plus satisfaisante que les vecteurs de base (Long et Miano, 2007). Le locus DHFR (Dihydrofolate Reductase) est exceptionnellement capable d'exprimer dans des cellules en culture des gènes étrangers très variés de manière spécifique du promoteur et indépendante du site d'intégration du gène étranger (Bian et Belmont, 2010).

2.5.3. Construction de vecteurs polycistroniques

Il est parfois nécessaire de produire deux protéines distinctes à partir du même gène et du même promoteur. Des séquences d'ARN présentes dans un certain nombre d'ARNm permettent aux ribosomes de traduire successivement deux régions codantes ayant leurs propres codons initiateurs et séparées par un codon stop. Ces séquences appelées IRES (Internal Ribosome Entry Site) doivent être placées dans une position adéquate pour optimiser la traduction du second cistron qui est souvent moins intense que celle du premier cistron (Houdebine et Attal, 1999). Une autre méthode particulièrement performante consiste à ajouter entre les deux cistrons le peptide 2A qui est spontanément clivé dans la plupart des cellules. Les deux protéines sont ainsi séparées l'une de l'autre (Deng *et al.* 2011).

2.5.4. Expression conditionnelle des transgènes

Les vecteurs décrits plus haut permettent une expression des transgènes à partir de promoteurs qui sont spontanément actifs dans les cellules des animaux transgéniques. Ceci implique que l'expression des transgènes soit régulée par les inducteurs naturels des gènes de l'hôte. L'induction d'un transgène peut donc s'accompagner d'une induction non désirée d'un certain nombre de gènes de l'hôte.

Des promoteurs artificiels contenant des éléments régulateurs de gènes animaux et de gènes bactériens ont été construits. Ces promoteurs sont actifs dans les cellules animales, mais sous la dépendance de substances actives chez les bactéries mais pas chez les animaux. Le système le plus utilisé comporte un antibiotique, la doxycycline, comme inducteur. En pratique, les transgènes ne sont activés (ou réprimés selon les cas) que lorsque la doxycycline est administrée aux animaux et ces inductions (ou répressions) sont réversibles (Malphettes et Fussenegger, 2006).

2.5.5. Invalidation ciblée conditionnelle des gènes

Les systèmes Cre-LoxP et FLP-FRT décrits dans la partie 2.3.2. permettent d'éliminer une région de l'ADN génomique dès lors qu'elles sont bordées par des séquences LoxP ou FRT. Il est possible de n'exprimer les recombinases Cre et FLP que dans certaines cellules et à certaines périodes seulement en plaçant les gènes de ces recombinases sous la dépendance de promoteurs spécifiques des cellules en question. Il est également possible d'utiliser des promoteurs spécifiques dépendant de la doxycycline. Un étage supplémentaire de contrôle peut être obtenu en utilisant un mutant de la recombinase Cre qui n'est active qu'en présence d'un inducteur, le 4-hydroxy tamoxifen (Metzger et Chambon, 2001).

2.5.6. Utilisation de leurres

Un certain nombre de mécanismes naturels de régulation reposent sur la surexpression de leurres qui captent et inactivent ainsi un inducteur. Les leurres, aussi appelés transdominants négatifs, peuvent être des protéines. Un exemple est celui de la surexpression dans des souris d'un récepteur muté de l'insuline. Ce récepteur se lie à l'hormone mais ne transduit pas son signal dans cellules. Ce modèle mime le diabète de type II (Chang *et al.* 1994).

Un autre exemple est celui du récepteur du virus de la pseudo-rage du porc responsable de la maladie d'Aujetzki. Ce récepteur permet au virus de pénétrer dans les cellules. La surexpression de la partie extracellulaire du récepteur du virus sous forme soluble a été obtenue chez des souris. Le virus a été ainsi piégé par le récepteur soluble et il n'a plus été capable d'infecter les souris (Ono *et al.* 2004). Le même transgène a permis de protéger des porcs contre le virus.

Les leurres peuvent également être des ARN. La surexpression d'un ARN muté du virus H5N1 chez des poulets protège ces animaux contre des infections par le virus. Cette résistance résulte du fait que l'ARN leurre se lie à certaines protéines du virus et empêche ainsi la formation de particules virales fonctionnelles (Lyall *et al.* 2011).

3. Les applications de la transgénèse animale

Les différentes applications de la transgénèse animale sont résumées dans le tableau 1.

3.1. La recherche fondamentale et médicale

La transgénèse consiste à réintroduire des gènes natifs ou mutés ainsi qu'à supprimer une information génétique précise dans un organisme vivant. Les animaux transgéniques sont utilisés en très grande majorité pour la recherche, essentiellement pour déterminer le rôle des gènes dans l'expression des fonctions biologiques et pour décrypter les mécanismes de régulation de l'expression des gènes. La transgénèse est un des outils essentiels pour étudier les maladies humaines. Elle permet en effet de créer des modèles pertinents et très variés.

- 1) Rôle des gènes dans l'expression des fonctions biologiques
- 2) Modèles pour l'étude de maladies humaines
- 3) Adaptation des organes de porc pour la transplantation aux patients
- 4) Préparation de protéines pharmaceutiques dans le lait ou le blanc d'œuf
- 5) Amélioration des productions animales (viande, lait...)

Tableau 1. Utilisation des animaux transgéniques.

Quelques espèces animales seulement sont utilisées pour ce types d'applications : souris (Montoliu et Whitelaw, 2011 ; Houdebine, 2012 ; Doyle *et al.* 2012), rats (Rémy *et al.* 2010), lapins (Bösze et Houdebine, 2006; Rabbit Biotechnology, 2009 ; Duranthon *et al.* 2012), porcs (Prather *et al.* 2008), vaches, moutons, chèvres (Boulangier *et al.* 2012), poisson zèbre, drosophiles et un ver nématode *Cænorhabditis elegans*.

3.2. La production d'organes et de protéines thérapeutiques

3.2.1. L'adaptation des organes de porc pour la transplantation aux patients

La transplantation d'organes animaux à l'homme a été tentée pour la première fois il y a un siècle afin de tenter de pallier le manque d'organes provenant de donneurs humains. Les rejets très violents ont empêché l'application de cette technique qui a été délaissée jusqu'à la découverte des immunosuppresseurs. Ces molécules efficaces pour les allogreffes (donneur et receveurs sont de la même espèce) se sont avérées inopérantes pour les xéno-greffes (donneur d'une espèce différente du receveur). La pénurie croissante d'organes humains a poussé à reprendre l'étude des mécanismes de rejet des xéno-organes. Le porc est unanimement reconnu comme le meilleur donneur potentiel. Il est en effet relativement proche de l'homme et suffisamment éloigné pour ne pas être la source de pathogènes incontrôlables transférables aux patients. La transgénèse joue un rôle clef dans cette aventure. Elle permet de créer des

modèles d'étude des rejets et elle est essentielle pour obtenir les porcs donneurs d'organes. Deux approches complémentaires sont poursuivies : la suppression par invalidation de gènes des antigènes porcins les plus actifs et le transfert chez le porc de gènes capables d'inhiber localement les mécanismes de rejets chez les patients. Entre 5 et 10 modifications génétiques apparaissent nécessaires pour atteindre ces buts (Ayares, 2009 ; Petersen *et al.* 2009). Le succès de cette entreprise n'est actuellement ni exclu ni certain.

3.2.2. La production de protéines d'intérêt pharmaceutique

L'idée d'utiliser des protéines comme médicaments est aussi vieille que la découverte des protéines. Pour être exploitable comme médicament une protéine doit être administrée par injection et devoir être active à partir du sang, car elles sont dégradées par les enzymes digestives et ne pénètrent pas spontanément dans les cellules. Les premières protéines médicaments ont été obtenues par extraction à partir du sang ou d'organes humains ou animaux.

Les protéines recombinantes (synthétisées par des cellules étrangères) ont commencé à être exploitées comme médicaments avec la synthèse d'insuline humaine par des bactéries. Il est vite apparu que les bactéries pouvaient produire des protéines actives biologiquement comme l'insuline, l'hormone de croissance, mais pas les protéines devant subir des modifications post-traductionnelles comme les glycosylations. Il faut pour ces protéines avoir recours à des cellules de mammifères en culture ou chez un animal entier. Le lait et le blanc d'œuf d'animaux génétiquement modifiés pour sécréter les protéines médicaments dans ces liquides biologiques sont considérés comme les systèmes les plus performants. Deux protéines médicaments provenant du lait sont sur le marché. Cette méthode techniquement exploitable ne se développe que lentement. Les entreprises pharmaceutiques, seules capables de mener à terme les essais cliniques, ne s'impliquent pas assidûment dans cette aventure. Il semble que ces entreprises ne sont pas disposées à introduire sur le marché un procédé nouveau susceptible de réduire le bénéfice qu'elles tirent des protéines préparées à partir de cellules en culture (Houdebine, 2009b ; Houdebine et D'Aoust, 2011).

Un projet ambitieux a pour but de produire des anticorps polyclonaux humains par des animaux transgéniques. Ceci implique que les gènes des immunoglobulines des animaux soient inactivés et qu'ils soient dotés des gènes correspondants humains. Les animaux après immunisation produisent uniquement des anticorps humains. Ces animaux qui sont en cours d'obtention (vache, lapin, porc et poulet) devraient être une source abondante et assez peu coûteuse de molécules thérapeutiques traditionnellement accessibles en très petite quantité (Houdebine, 2011).

3.3. Amélioration des productions animales

Les applications de la transgénèse pour améliorer les productions animales n'ont pas jusqu'à ce jour été menées jusqu'à la mise sur le marché de produits alimentaires comme cela est le cas pour les plantes. Les raisons en sont multiples : la transgénèse est plus coûteuse et plus lente que chez les plantes, beaucoup d'efforts ont été porté dans les domaines médicaux et pharmaceutiques aux dépens de projets concernant l'élevage, les plantes sont en première ligne dans la chaîne de production des denrées alimentaires.

Les principaux secteurs où des avantages sont attendus de la transgénèse pour les productions animales sont résumés dans le tableau 2.

1) Accélération de la croissance des poissons (saumons, tilapia...), porcs. Croissance musculaire (myostatine: selon le sexe et la race).

2) Résistance aux maladies: pertes réduites, meilleur bien-être animal, moindre utilisation d'antibiotiques, réduction des zoonoses :

* Mammites: lysostaphine dans le lait (anti-*Staphylococcus aureus*).

* Infections bactériennes : lysozyme, lactoférine dans le lait, cécropine chez les poissons.

* Infections virales: porcs résistant à la maladie d'Aujeszky, anticorps monoclonaux anti-coronavirus, poulets résistant à la grippe , porcs résistants à la peste porcine.

* Prions: gène PrP inactivé.

3) Amélioration de la qualité du lait : moins de lactose et de protéines allergènes, plus de protéines (pour les porcelets), protéines anti-pathogènes, plus de lipides polyinsaturés oméga-3.

4) Amélioration de la viande : plus de lipides polyinsaturés de type oméga-3.

5) Réduction de la pollution : porcs sécrétant de la phytase dans leur salive.

Tableau 2. Obtention d'animaux génétiquement modifiés pour améliorer les productions animales

Les principaux projets en cours ou interrompus sont résumés dans le tableau 3. Les remarques que l'on peut faire sur ces projets sont les suivantes :

L'hormone de croissance ne provoque pas une augmentation ou une accélération de la croissance notable chez les mammifères domestiques. Un excès de l'hormone entraîne des désordres métaboliques délétères. Chez les animaux transgéniques les vecteurs ne doivent donc exprimer que des quantités modestes de l'hormone. Des porcs ayant une croissance légèrement augmentée, un supplément de muscle et un dépôt de graisse réduit, sans effet secondaire indésirable ont été obtenus en Australie (Nottle *et al.* 1999). Ces animaux présentaient donc des avantages significatifs pour les éleveurs et les consommateurs. Ces derniers ont rejeté ces animaux et le projet a dû être abandonné.

L'hormone de croissance a des effets très puissants chez le saumon et d'autres poissons. Il s'agit pour les saumons d'une accélération de la croissance car ces animaux ont comme d'autres poissons une croissance continue. L'hormone ne peut être administrée quotidiennement à une multitude d'alevins. Elle est sans effet par voie orale. La transgénèse permet de contourner ces difficultés. Pour obtenir une présence continue de l'hormone à une concentration modérée, le gène d'hormone de croissance de saumon a été placé sous la direction du promoteur d'un gène fonctionnel pendant la saison froide, une période au cours de laquelle le gène endogène du saumon est silencieux. Les saumons transgéniques sont matures beaucoup plus tôt. Ils consomment donc moins de nourriture et occupent moins longtemps les cages. Leur chair n'est pas altérée, ni toxique. Malgré ces garanties, l'agrément pour l'élevage en masse de ces poissons n'a toujours pas été attribué par les autorités des USA, car les effets négatifs potentiels d'une évasion dans la mer de quelques saumons ne sont pas connus avec précision. Il est prévu d'élever les larves de saumons en eau douce à Terre Neuve ou l'île du Prince Edouard et de faire croître les poissons dans des étangs au Panama. Des barrières physiques empêchent l'évasion des saumons et ne sont élevées que des femelles triploïdes donc stériles. En cas d'évasion, ni les larves ni les animaux en croissance ne survivraient dans la mer trop salée pour les larves et trop chaude au Panama. La mise sur le marché de ces saumons est prévue pour 2013 (Van Eenennaam et Muir, 2011). Le rapport de la FDA (AquAdvantage Salmon,

Effet physiologique	Gène/protéine	Espèce	Références
Croissance accélérée Moins de graisse	Hormone de croissance	Porc	Nottle, 1999
	IGF1	Porc	Pursel, 1999
	Hormone de croissance	Saumon	Devlin, 2009
Plus de muscle	Anti-myostatine	Souris	Pirottin, 2005
Plus d'acides gras Poly-insaturés	Désaturase (épinard)	Porc	Saeki, 2004
	Désaturase (<i>C. elegans</i>)	Porc	Lai, 2006
	Stéaroyl désaturase	Chèvre	Reh, 2004
Lait plus nourrissant	Alpha-lactalbumine	Porc	Wheeler, 2001
Lait moins allergène	Bêta-lactoglobuline (KD)	Vache	Anower, 2012
Lait plus de protéines	Caséines Alpha-S1 et K	Vache	Brophy, 2003
Lait plus anti-bactériens	Lysostaphine	Vache	Wall, 2005
	Lysozyme humain	Chèvre, Vache	Brundige, 2009
	Lactoferrine humaine	Vache	Platenburg, 1994 Yang, 2008
Lait plus anti-tumeur	Alpha-lactalbumine humaine	Vache	Wang, 2008
Résistance au prion	PrP (KO)	Vache	Denning, 2001
Résistance aux bactéries	Cécropine	Poisson chat	Dunham, 2009
Résistance au virus H5N1	ARN leurre viral	Poulet	Lyall, 2011
Moins de phosphate	Phytase	Porc	Hakimov, 2009
Lutte contre les insectes	Divers gènes	Divers insectes	Voir 3.3

Tableau 3. Les principaux projets de transgénèse pour l'amélioration des productions animales

2012; Draft Environmental Assessment, 2012) est actuellement soumis à une consultation publique (Maxmen, 2012). En novembre 2013, le gouvernement canadien a donné son autorisation à AquaBounty pour développer et commercialiser des alevins de saumon à croissance accélérée. Cette prise de position augmente les chances que la FDA autorise la croissance et la commercialisation des saumons. Il n'est pas certain que l'entreprise qui propose ces poissons aura des retours financiers conséquents. Un échec de ce projet aurait des effets négatifs pour d'autres projets concernant entre autres des poissons tropicaux sources de protéines.

L'intégration dans le chromosome Y de souris d'un gène codant pour une protéine ayant un effet trans-dominant négatif contre la myostatine induit un développement plus intense du muscle après la naissance chez les animaux mâles seulement.

Les changements de composition des acides gras du lait et de la viande sont *a priori* favorables pour les consommateurs, mais le succès commercial de ces projets est incertain.

Le lait de truie rendu plus nourrissant permet de sauver plus de porcelets au sevrage. Le lait de vache ne contenant plus son principal allergène, la bêta-lactoglobuline, doit pouvoir trouver des consommateurs. Le lait de vache enrichi en caséines est plus nourrissant et mieux adapté à

certaines opérations de l'industrie laitière. Le lait contenant de l'alpha-lactalbumine humaine est plus nourrissant et cette protéine a des propriétés anti-tumorales.

Les trois antibactériens diminuent la fréquence des mammites, surtout la lysostaphine. Les trois protéines permettent une meilleure conservation du lait. Le lysozyme et la lactoferrine sont abondants dans le lait humain mais en petite quantité seulement dans le lait de vache. Le lait contenant une ou plusieurs des trois protéines pourrait être consommé sous une forme ou une autre pour prévenir ou atténuer des infections bactériennes orales.

De nombreux peptides anti-bactériens sont présents chez les plantes et les invertébrés. L'un d'entre eux, une cécropine, protège les poissons chat contre des infections bactériennes.

Des poulets résistants au virus de la grippe H5N1 ont été obtenus en exprimant un ARN leurre du virus. Ce procédé sans risque connu peut s'opposer aux infections par ce virus et aux zoonoses qui sont une menace permanente.

Des porcs exprimant le gène d'une phytase bactérienne dans la salive des porcs ont été obtenus. Ces animaux digèrent une bonne partie de l'acide phytique qu'ils ingèrent. Le phosphate ainsi libéré est utilisé pour la croissance des porcs qui relarguent de ce fait jusqu'à 60% moins de phosphate polluant dans l'environnement. Ces porcs appelés 'Enviropigs' ne présentent pas d'inconvénients alimentaires ou environnementaux particuliers mais leur mise sur le marché n'est pas acquise. Ce problème peut semble-t-il également être résolu en faisant exprimer un gène de phytase dans les plantes consommées par les animaux.

Des souris et des porcs transgéniques résistants au virus porcin de la pseudo-rage ont été obtenus en exprimant un gène codant la partie soluble du récepteur du virus qui joue le rôle de leurre pour le virus (Ono *et al.* 2004). Des ARN interférents dirigés contre un gène précoce du virus ont également rendu les souris résistantes au virus (Daniel-Carlier *et al.* 2013).

Le remplacement d'un allèle d'un gène porc conférant aux animaux une sensibilité à la peste porcine par un allèle connu pour induire une résistance a permis de protéger les animaux contre la maladie (résultats non publiés). Un insecte, la Drosophile, est très largement utilisé, via la transgénèse notamment, comme modèle du développement. La lutte contre les insectes est une préoccupation qui ne va pas en diminuant. L'utilisation de pesticides et la stérilisation en masse par irradiation des géniteurs sont couramment utilisées mais avec des inconvénients divers. Les principales raisons de lutter contre les insectes sont leur capacité à disséminer des agents pathogènes infectieux et à endommager les récoltes (voir l'article de Charles Descoins "*La protection phytosanitaire des cultures*"). Il a été montré que le relargage en masse d'insectes nuisibles stérilisés par irradiation constitue une alternative efficace et peu coûteuse à l'utilisation des plantes transgéniques Bt (Tabashnik *et al.* 2010). La transgénèse est en passe de devenir un outil majeur pour lutter contre les insectes (ACTA, 2010 ; Scolari *et al.* 2010 ; Subbraman, 2011). Divers transgènes rendent les insectes stériles ou peu viables (Scolari *et al.* 2010 ; Lee *et al.* 2013). D'autres transgènes diminuent la présence des agents pathogènes portés par les insectes (Kokoza *et al.* 2010 ; Corby-Harris *et al.* 2010 ; Deredec *et al.* 2011 ; Isaacs *et al.* 2012).

3.4. Les perspectives de la transgénèse animale

Les techniques de la transgénèse animale se sont très notablement améliorées depuis une décennie. Développer des animaux de ferme pour améliorer les productions animales est un

- 1) Gènes codant pour des enzymes digestives (cellulases)
- 2) Gènes favorisant la digestion de l'amidon par des poissons carnivores
- 3) Gènes favorisant l'ingestion de nourriture
- 4) Gènes réduisant la production de chaleur par les animaux
- 5) Gènes réduisant la production de CH₄ et de CO₂
- 6) Gènes réduisant la teneur en lactose du lait
- 7) Gènes réduisant la teneur en graisse de la viande et du lait
- 8) Gènes favorisant le dépôt de graisse dans le muscle pour améliorer les qualités gustatives de la viande
- 9) Gènes favorisant le développement musculaire
- 10) Gènes favorisant le bien-être animal

Tableau 4. Des transgènes candidats pour les AGM

objectif désormais accessible. Ceci permet de tracer un tableau prospectif des types de projets qui sont ou vont être abordés.

Le nombre d'animaux transgéniques modèles de laboratoire devrait se maintenir ou continuer à augmenter. La production de protéines thérapeutiques à partir d'animaux transgéniques pourrait augmenter si les entreprises de la pharmacie venaient à s'impliquer d'avantage. La production de xéno-organes devrait suivre son cours.

Une liste de gènes candidats pour améliorer les productions animales se trouve dans le tableau 4. Plusieurs revues sur le sujet ont été publiées ces dernières années. (Wall *et al.* 2009 ; Niemann *et al.* 2011; Farhenkrug *et al.* 2011).

Les grands objectifs, en particulier la lutte contre les maladies et la croissance, vont demeurer. Une inflexion nette fait apparaître des projets en rapport avec l'environnement, le bien-être animal et une amélioration de la qualité de la nourriture.

Des animaux exprimant dans leur salive des gènes de cellulases sont en cours d'étude. La possibilité de digérer la cellulose améliorerait très notablement l'utilisation de la nourriture chez les non ruminants. Dans le même ordre d'idée, obtenir des poissons carnivores capables de digérer l'amidon réduirait la dépendance de ces animaux à la consommation de poissons. Il apparaît possible d'augmenter les capacités d'ingestion des animaux ce qui permettrait une croissance plus rapide et plus économe. Il serait également utile de diminuer la production de chaleur des animaux qui représente une perte d'énergie. Une diminution de la production de méthane et de gaz carbonique contribuerait à diminuer l'effet de serre.

Diminuer la concentration du lactose du lait est possible sans perte de qualité du produit. De même qu'obtenir du lait plus concentré, contenant moins d'eau qu'il faut actuellement transporter avec ce que cela comporte comme effets indésirables.

Il est souhaitable de diminuer la teneur globale en graisse de la viande et du lait, car les acides gras de la graisse stockée ne sont pas les meilleurs pour la santé et leur accumulation est une perte d'énergie. Paradoxalement, accumuler de petites quantités de graisse dans les

muscles augmente les qualités gustatives de la viande. Une amélioration du goût de la viande bœuf est annoncée. Ces animaux expriment le transgène de la FABP (Fatty Acid Binding Protein) adipocytaire ou le gène DGAT1 qui augmentent la teneur du muscle en acides gras ([GM calves bred to beef up flavor, 2012 - www.globaltimes.cn/content/726991.shtml](#); Li *et al.* 2013).

Un accroissement du développement du muscle après la naissance est envisagée en exprimant un gène codant une protéine qui inhibe la myostatine dont la fonction est de limiter la croissance du muscle. Pour optimiser cette approche, il est possible en principe de faire en sorte que le transgène soit porté par le chromosome Y et exprimé seulement après la naissance (Pirottin *et al.* 2005). Ce protocole appliqué aux vaches permettrait de mieux valoriser les mâles des races à lait sans perturber la lactation des femelles ni poser le problème des culards dont les muscles sont hypertrophiés avant la naissance.

Le bien-être animal peut être en principe amélioré par la transgénèse. Un gène induisant une castration biochimique réduirait le mal-être causé par la castration mécanique.

4. La gestion des AGM

4.1. La sécurité de la manipulation des AGM

Toutes les expériences impliquant des AGM soit en milieu confiné soit en milieu ouvert doivent recevoir un accord au cas par cas d'une commission spécialisée, en France le HCB (Haut Conseil des Biotechnologies), qui applique des directives de l'UE. Certains des projets comportent des dangers bien réels. Après plus de trente ans, on ne déplore aucun accident dû à la contamination d'expérimentateurs ou de l'environnement.

4.2. La sécurité des aliments provenant d'AGM

Des réglementations pour évaluer les risques de la consommation des produits issus d'AGM par l'homme et les animaux ont été établies à l'image de ce qui existe depuis des années pour les plantes génétiquement modifiées (PGM). Ces réglementations sont en perpétuelle évolution pour être optimisée. L'EFSA (European Food Safety Authority) vient ainsi de préciser les conditions d'utilisation des tests de toxicité de 90 jours chez des rats.

Les réglementations ont été publiées notamment par la FDA (Food and Drug Administration) (USA FDA, 2009) et l'EFSA (2008; 2012a). La réglementation de l'EFSA comporte un volet sur le bien-être animal (EFSA, 2012a) et sur l'impact environnemental des AGM (EFSA, 2012). D'autres rapports sur le bien-être animal ont été publiés par des groupes non académiques (Assuring animal welfare, 2007). D'autres institutions et en particulier le Codex Alimentarius ont adopté des réglementations très semblables à celles de la FDA et de l'EFSA.

Les tests de toxicité pour les AGM sont fondamentalement les mêmes que ceux en vigueur pour les PGM. Les plantes contiennent souvent des toxines qui sont des pesticides naturels. Les plantes ne sont pas sensibles à leurs propres toxines. Les animaux d'élevage sont généralement considérés comme ne contenant pas de substances toxiques. Si tel n'était pas le cas, ils seraient les premières cibles de ces toxines. Les AGM se trouvent donc être spontanément dans la position d'animaux expérimentaux capables de révéler les effets délétères éventuels des transgènes qu'ils portent.

Les plantes sont considérées comme ne transmettant pas ou très peu de pathogènes à l'homme. A l'inverse les animaux sont périodiquement à l'origine de maladies humaines. Les AGM doivent donc être examinés minutieusement sur ce plan. Les examens pratiqués au moment de l'abattage des animaux constituent une première mesure de sécurité des AGM.

4.3. Impacts environnementaux des AGM

Le principal impact des AGM sur l'environnement provient essentiellement de leur possible évasion des lieux d'élevage et la dissémination incontrôlée des transgènes. Les risques sont très différents selon les espèces. Les vaches, les chèvres, les moutons et les porcs pourraient survivre à l'état sauvage, à des degrés divers toutefois selon les races. Les ruminants domestiqués n'ont plus d'équivalents sauvages dans la plupart des pays. On sait par contre que les porcs se croisent avec des sangliers pour donner des animaux prolifiques et envahissants.

Les lapins d'élevage ne survivraient sans doute pas longtemps en cas d'évasion. La plupart de ces animaux sont des races albinos peu adaptées à la vie sauvage. Les renards et les chiens extermineraient rapidement les fuyards. Une femelle échappée pourrait être fécondée par un mâle sauvage mais ne survivrait probablement pas le temps d'une gestation. A l'inverse un lapin mâle échappé aurait le temps de féconder plusieurs femelles sauvages avant d'être mangé. Les transgènes pourraient ainsi se disséminer de manière incontrôlée.

En règle générale les animaux qui posent problème sont ceux qui volent et qui nagent et peuvent de ce fait se répandre de manière incontrôlée dans de vastes espaces. Le cas des saumons à croissance accélérée a été traité dans la partie 3.3. Le cas des insectes est également considéré avec une particulière attention dans la mesure où ils sont pour la plupart destinés à être disséminés volontairement. Le problème ne se pose évidemment pas pour les insectes stérilisés.

La fonction des transgènes est également prise en compte. Des poissons résistants à des maladies et ayant une croissance accélérée et de ce fait une reproduction précoce pourrait coloniser un espace sans que l'on puisse en mesurer les conséquences.

L'EFSA a publié un rapport détaillé sur les différentes situations que l'on peut rencontrer en incluant les effets secondaires potentiels des transgènes indépendamment d'une évasion (EFSA, 2012b). Un cas concret s'est posé : les vaches exprimant les gènes antibactériens décrits dans le tableau 3 ou les animaux consommant le lait de ces vaches pourraient avoir un impact sur la flore bactérienne de la prairie où elles vont paître. Aucune modification de la flore en question n'a cependant pas été observée (Xu *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2012).

4.4. Le bien-être des AGM

Le bien-être est considéré comme étant un problème spécifique des animaux. L'opinion publique est de plus en plus exigeante en ce qui concerne le bien-être des animaux d'élevage. Il n'existe pas de solution totalement satisfaisante à ce problème. Pour limiter l'utilisation des animaux en particulier des animaux expérimentaux, la règle des 3R a été proposée et est mis en application : *Remplacement*, *Raffinement* et *Réduction* (NC3Rs; www.nc3rs.org.uk), auxquels certains ajoutent un quatrième R pour *Responsabilité*. À cela, certains ont rappelé les contraintes qui demeurent pour l'utilisation des animaux de laboratoire et la règle des 3I a été proposée: *Important*, *Increasing* (en augmentation) et souvent *Irreplaceable* (irremplaçable) (Editorial, 2012).

L'application de la règle des 3R est une réalité même s'il est parfois difficile placer le curseur de l'interdiction au bon endroit pour ne pas compromettre des recherches importantes tout en limitant le sacrifice inutile d'animaux. Un livre récent contient une description détaillée de toutes les techniques de transgénèse chez la souris, y compris les recommandations pour préserver au maximum le bien-être des animaux. Une partie de ces recommandations est extrapolable à d'autres espèces (Houdebine 2012).

Plusieurs rapports et articles sur le bien-être animal ont été publiés (Van Reenen *et al.* 2001 ; Van Reenen, 2009 ; Mephram *et al.* 1998 ; EFSA, 2008 et 2012a ; Assuring animal welfare, 2007 ; Gannon, 2007). Une manière de classer les animaux par le niveau du mal-être qui leur est infligé peut être la suivante :

Classe 1 - Animaux de laboratoire essentiellement utilisés pour acquérir un savoir et non pour un profit direct, effets secondaires relativement fréquents et imprévisibles, utilisés en nombre réduit ; tolérance possible vis-à-vis de la souffrance.

Classe 2 - Animaux utilisés comme source d'organes ou de substances pharmaceutiques directement utilisés pour la santé humaine, peuvent engendrer des profits élevés, peuvent souffrir d'effets secondaires délétères, connus et reproductibles, utilisés en nombre limité : tolérance vis-à-vis de la souffrance au cas par cas.

Classe 3 - Animaux de ferme et animaux de compagnies non strictement requis dans la majorité des cas pour la survie humaine, peuvent engendrer des profits élevés, peuvent souffrir d'effets secondaires délétères, connus et reproductibles, utilisés en grand nombre : aucune tolérance vis-à-vis de la souffrance.

Il est important de noter que le bien-être animal est essentiellement abordé par ses aspects négatifs. Il est implicitement admis que la transgénèse peut seulement réduire le bien-être animal. Bien au contraire, il est attendu que certains animaux transgéniques souffriront moins du fait qu'ils ne sont pas malades ou qu'ils sont mieux adaptés aux conditions d'élevage.

4.5. L'acceptabilité des AGM

Les PGM ne sont pas acceptées par une majorité de citoyens de l'UE. Cette situation atypique, non fondée sur des arguments scientifiques, coûte 443-929 M€ par an. A ce coût direct, il faut ajouter le fait que les Européens ont perdu leur capacité de préparer eux-mêmes les PGM dont ils ont besoin. Pour éviter que le même scénario s'applique au AGM, la Commission Européenne a soutenu le projet Pegasus (<http://www.projectpegasus.eu>). Le but de ce projet de trois ans qui s'est achevé à la fin de l'été 2012, était de procurer aux Européens une information de qualité et aussi complète que possible sur les AGM, incluant les aspects scientifiques, techniques, éthiques et économiques. Trois projets ont été examinés en détail dont deux ont été soumis à l'appréciation de deux jurys de citoyens, l'un dans l'UK et l'autre en Italie. Les deux jurys ont soutenu modérément le projet « saumons à croissance accélérée » et plus fermement le projet « production d'anticorps polyclonaux humains » par des animaux transgéniques.

Une des recommandation de Pégasus qui ont été proposées est que l'UE devrait encourager et soutenir les laboratoires et les entreprises à préparer les OGM dont les Européens ont besoin. Il est difficile d'évaluer l'impact du projet Pégasus sur les citoyens et les décideurs de l'UE. L'approche des USA est différente. Tous les partenaires impliqués dans l'obtention d'AGM ont écrit un rapport commun résumant les engagements de chacun d'eux (BIO Guidance, 2009). On peut s'attendre à ce que la stratégie des USA ait un impact plus fort sur la société que le projet Pégasus. En effet, l'approche de l'UE repose sur l'idée qu'il n'est pas certain que les AGM deviennent une réalité commerciale et qu'il est donc préférable d'en éviter l'usage. L'approche des USA est beaucoup plus positive car elle repose sur l'hypothèse que les AGM sont inévitables car utiles et qu'il est préférable de trouver les meilleures conditions pour les utiliser.

L'acceptation du clonage animal appliqué à l'élevage est négative bien que les rapports des experts ont conclu à l'innocuité des produits issus des clones (EFSA, 2008). La Commission Européenne n'a pas donné son agrément essentiellement en raison de l'avis négatif du Comité d'Éthique Européen qui a jugé inacceptable le mal-être qu'impose cette technique aux animaux. De manière inattendu, les consommateurs des USA non pas soutenu le clonage en tant que technique d'élevage. Les citoyens des USA considèrent que le clonage représente une technique trop drastique imposée aux animaux pour des avantages limités.

Cette observation doit être pertinente car l'acceptation des AGM apparaît faible des deux côtés de l'Atlantique (Vazquez-Salat *et al.* 2012 ; Vazquez-Salat et Houdebine, 2013a,b). Une des raisons peut être que le clonage est actuellement fréquemment utilisé pour obtenir des animaux de ferme transgéniques. Les arguments qui ont poussé au refus du clonage sont probablement aussi ceux qui s'appliquent aux AGM. Ces refus s'appuient probablement sur une méfiance du progrès et sur l'idée très exagérée, surtout dans l'UE, que toutes ces innovations ne sont faites que pour augmenter les bénéfices d'entreprises multinationales.

5. Références

- ACTA. London, UK. Genetically Modified Insects: What Next? (2010). www.mi2g.com/cgi/mi2g/press/190610.php
- Anower J, Wagner S, McCracken J, Wells DN, and Laible G. (2012). Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free, high-casein milk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109: 16811–16816. doi: 10.1073/pnas.1210057109.
- AquAdvantage Salmon. Draft Environmental assessment. FDA, 4 May (2012). pp1–145.
- Assuring animal welfare: from societal concerns to implementation. Second Welfare Quality® stakeholder conference. 3–4 May 2007, Berlin Germany. Edited by I. Veissier, B. Forkman and B. Jones ISBN number 978–90–78240–02–0
- Aten QT, Jensen BD, Susan Tamowski S, A M, Howell LL, SH. (2012). Nanoinjection: pronuclear DNA delivery using a charged lance. *Transgenic Res*. 21: 1279–1290.
- Ayares D. (2009). Genetic modification of pigs for xenotransplantation. (2010). Meeting UC Davis Transgenic Animal Research Conference VII. Tahoe City, USA. *Transgenic Res*. Page 48.
- Bateman JR, Lee AM, Wu C. (2006). Site-Specific Transformation of *Drosophila* via ϕ C31 Integrase-Mediated Cassette Exchange Genetics. 173: 769–777.
- Bian, Q. & Belmont, A.S. (2010). BAC TG-EMBED: one-step method for high-level, copy-number-dependent, position-independent transgene expression. *Nucleic Acids Res*. 38(11), e127. doi: 10.1093/nar/gkq178.
- BIO Guidance on Genetically Engineered Animal Stewardship. (2009). *Biotechnology Industry Organization*
- Bösze Zs, Houdebine LM. (2006). Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Science*. 14: 1–14.
- Boulanger L, Passet B, Pailhoux E, Vilotte JL. (2012). Transgenesis applied to goat: current applications and ongoing research. *Transgenic Res*. 21: 1183–1190. doi: 10.1007/s11248–012–9618-y.
- 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. *Nature Biotechnol*. 21: 157–162.
- Bronson SK, Smithies O. (1994). Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J of Biol Chem*. 26: 27155–27158.
- Brundige DR, Maga EA, Klasing KC, Murray JD. (2009). Consumption of pasteurized human lysozyme transgenic goats' milk alters serum metabolite profile in young pigs. *Transgenic Res*. DOI 10.1007/s11248–009–9334–4
- Capecchi MR. (1989). The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics* 5: 70–76.

- Chang P.Y., Benecke H., Le Marchand-Brustel Y., Lawitts J., Moller D.E. (1994). Expression of a dominant-negative mutant human insulin receptor in the muscle of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 16034–16040.
- Corby-Harris V, Drexler A, Watkins de Jong L, Antonova Y, Pakpour N, Ziegler R, Ramberg F, Lewis EE, Brown JM, Luckhart S, Riehle MA. (2010). Correction: Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *PLoS Pathog*. 6. doi: 10.1371/annotation/738ac91f-8c41-4bf5-9a39-bddf0b777a89.
- Daniel-Carlier N, Sawafta A, Passet B, Thépot D, Leroux-Coyau M, Lefèvre F, Houdebine LM, Jolivet G. Viral infection resistance conferred on mice by siRNA transgenesis. *Transgenic Res*. (in press).
- Deng W, Yang D, Zhao B, Ouyang Z, Song J, Fan N, Liu Z, Zhao Y, Wu Q, Nashun B, Tang J, Wu Z, Gu W, Lai L. (2011). Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer. *PLoS One*. 6:e 19986. doi: 10.1371/journal.pone.0019986.
- Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ. (2001). Deletion of the alpha(1, 3)galactosyltransferase (GGTA1) and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nature Biotechnol*. 19: 559–562.
- Deredec A, Godfray HC, Burt A. (2011). Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: E874–80. doi: 10.1073/pnas.1110717108.
- Devlin RH, Sakhrani D, Tymchuk WE, Rise, ML, Goh B. (2009). Domestication and growth hormone transgenesis cause similar changes in gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Proc. Natl Acad. of Sci. USA* 106: 3047–3052.
- Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. (2012). The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res*. 21: 327–349. doi: 10.1007/s11248-011-9537-3.
- Draft Environmental Assessment and Preliminary Finding of No Significant Impact Concerning a Genetically Engineered Atlantic Salmon. (2012). Federal Register. 77 (247): 76050.
- Dunham RA. (2009). Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation *Comp Immunol, Microbiol & Infect Dis*. 32: 139–161.
- Duranthon V, Beaujean N, Brunner M, Odening KE, Santos AN, Kacs Kovics I, Hiripi L, Weinstein EJ, Bosze Z. (2012). On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Res*. 21: 699–713. doi: 10.1007/s11248-012-9599-x.
- Editorial. The ‘3Is’ of animal experimentation .(2012). *Nature Genetics* 44: 611.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2008). Draft “Scientific opinion on food safety, animal health and welfare and environmental impact of animals derived from cloning by somatic cell nucleus transfer (SCNT) and their offspring and products obtained from those animals.(http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/sc_opinion_clon_public_consultation.pdf. Accessed 23.06.08) *The EFSA J*. 747: 1–49.
- EFSA Panels on Genetically Modified Organisms (GMO) and Animal Health and Welfare (AHAW). (2012a) Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals and on animal health and welfare aspects. *The EFSA J*. 10: 2501
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) (2012b) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. *The EFSA J*. (in press)
- EFSA Background Paper on transgenic farm animals. (A multi-author review). In press by EFSA (European Food Safety Authority)
- Fahrenkrug SC, Blake A, Carlson DF, Doran T, Van Eenennaam A, Faber D, Galli C, Gao Q, Hackett PB, Li N, Maga EA, Muir WM, Murray JD, Shi D, Stotish R, Sullivan E, Taylor JF, Walton M, Wheeler M, Whitelaw B, Glenn BP. (2010). Precision genetics for complex objectives in animal agriculture. *J Anim Sci*. 88: 2530–2539. doi: 10.2527/jas.2010-2847.
- Gannon F. (2007). Animal rights, human wrongs? Introduction to the Talking Point on the use of animals in scientific research. *EMBO Rep*. 8(6): 519–20.

- Garrels W, Mátés L, Holler S, Dalda A, Taylor U, Petersen B, Niemann H, Izsvák Z, Ivics Z, Kues WA. (2011). Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. *PLoS One*. 6: e23573.
- Giraldo P, Rival-Gervier S, Houdebine L M, Montoliu L. (2003). The potential benefits of insulators on heterogenous constructs in transgenic. *Transgenic Res*. 12: 751- 755.
- GM calves bred to beef up flavor. (2012). www.globaltimes.cn/content/726991.shtml -
- Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnol*. 19: 741–745.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, *et al.* (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 7380–7384.
- Hakimov HA, Walters S, Wright TC, Meidinger RG, Verschoor CP, Gadish M, Chiu DK, Strömviik MV, Forsberg CW, Golovan SP. (2009). Application of iTRAQ to catalogue the skeletal muscle proteome in pigs and assessment of effects of gender and diet dephytinization. *Proteomics*. 9: 4000–4016. doi: 10.1002/pmic.200900049.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315: 680–683.
- Hamra FK. (2010). Enter the rat. *Nature* 467, 161–162.
- Han JY. (2009). Germ cells and transgenic chicken. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 32: 61–80.
- Hauschild-Quintern J, Petersen B, Queisser AL, Luca-Hahn A., Schwinzer R., Niemann H. (2013). Gender non-specific efficacy of ZFN mediated gene targeting in pigs. *Transgenic Res*. 22: 1–3.
- Hiripi L, Negre D, Cosset FL, Kvell K, Czömpöly T, Baranyi M, Gócza E, Hoffmann O, Bender B, Bosze Z. (2010). Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. *Transgenic Res*. 19: 799–808.
- Honaramooz A, Megee S, Zeng W, Destrempe MM, Overton SA, Luo J, Galantino-Homer H, Modelski M, Chen F, Blash S, Melican DT, Gavin WG, Ayres S, Yang F, Wang PJ, Echelard Y, Dobrinski I. (2008). Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. *FASEB J*. 22: 74–82.
- Houdebine LM. (2009a) Design of expression cassettes for the generation of transgenic animals (including insulators). In *Rat Genomics: Methods in Molecular Biology*, Vol 597 Edited by I Anegon. Humana Press, a part of Springer Science +Business Media, LLC2010. pp55–69.
- Houdebine LM. (2009b) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 32: 107–121.
- Houdebine LM, Attal J. (1999). Internal ribosome entry sites (IRESs): Reality and use. *Transgenic Res*. 8: 157–177.
- Houdebine LM. (2003). *Animal Transgenesis and Cloning*. Wiley and Sons Publisher. 250 pages.
- Houdebine LM. (2010). Meeting report: UC Davis Transgenic Animal Research Conference VII. Tahoe City, USA. *Transgenic Res*. 19: 127–130.
- Houdebine, LM. (2011). Production of human polyclonal antibodies by transgenic animals. *Adv Biosci and Biotechnol* 2: 138–141.
- Houdebine LM, D'Aoust MA. (2011). La production de protéines biosynthétiques à usages thérapeutiques. In *Biotechnologies végétales. Environnement, alimentation, santé*. Editions Vuibert. Edité par A Ricroch, Y Dattée et M Fellous. pp 223–231.
- Houdebine, L.M. (2012). A review on the book: Shirley Pease and Thomas L. Saunders (eds): *Advanced protocols for animal transgenesis: an ISTT manual* Springer Protocols, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2011, Hardcover, 684 pp, ISBN-13: 978–3642207914 *Transgenic Res*. 21:1143–1148. DOI 10.1007/s11248–011–9583-x
- Isaacs AT, Jasinskiene N, Tretiakov M, Thiery I, Zettor A, Bourgouin C, James AA. (2012). Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: E1922–30. doi: 10.1073/pnas.1207738109.

- Kokoza V, Ahmed A, Woon Shin S, Okafor N, Zou Z, Raikhel AS. (2010). Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 8111–8116. doi: 10.1073/pnas.1003056107.
- Lai L., Kang J .X., Li R., Wang J., Witt W.T., Yong H.Y., Hao Y., Wax D.M., Murphy C.N., Rieke A., Samuel M., Linville M.L., Korte S.W., Evans R.W., Starzl T.E., Prather R.S., Dai Y. (2006). Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnol.* 24: 435–436.
- Larochelle N, Stucka R, Rieger N, Schermelleh L, Schiedner G, Kochanek S, Wolf E, Lochmüller H. (2011). Genomic integration of adenoviral gene transfer vectors following transduction of fertilized mouse oocytes. *Transgenic Res.* 20: 123–135.
- Lee AY, Lloyd KC. (2011). Rederivation of transgenic mice from iPS cells derived from frozen tissue. *Transgenic Res.* 20:167–175.
- Lee HL, Vasan S, Ahmad NW, Idris I, Hanum N, Selvi S, Alphey L, Murad S. (2013). Mating compatibility and competitiveness of transgenic and wild type *Aedes aegypti* under contained semi-field conditions. *Transgenic Res.* 22: 47–57. doi: 10.1007/s11248-012-9625-z.
- Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks D, P. *et al.* (2010). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.*, 2010, 1–14 doi:10.1093/nar/gkq704
- Li T, Xu D, Zuo B, Lei M, Xiong Y, Chen H, Zhou Y, Wu X. (2013). Ectopic overexpression of porcine DGAT1 increases intramuscular fat content in mouse skeletal muscle. *Transgenic Res.* 22: 187–194. doi:10.1007/s11248-012-9633-z.
- Lillico S, Vasey D, King T, Whitelaw B. (2011). Lentiviral transgenesis in livestock. *Transgenic Res.* 20: 441–442.
- Liu T, Liu L, Wei Q, Hong Y. (2011). Sperm nuclear transfer and transgenic production in the fish medaka. *Int J Biol Sci.* 7(4): 469–475.
- Liu X, Li N, Hu X, Zhang R, Li Q, Cao D, Liu T, Zhang Y, Liu X (2013). Efficient production of transgenic chickens based on piggyBac. *Transgenic Res.* 22(2): 417–423. doi: 10.1007/s11248-012-9642-y.
- Long, X. and Miano J.M. (2007). Remote control of gene expression. *J Biol Chem.* 282: 15941–15945.
- Lyall J, Irvine RM, Sherman A, McKinley TJ, Núñez A, Purdie A, Outtrim L, Brown IH, Rolleston-Smith G, Sang H, Tiley L. (2011). Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens. *Science* 331: 223–226.
- Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, Sang HM, McGrew MJ. (2012). Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: E1466–1472.
- Marh J, Stoytcheva Z, Urschitz J, Sugawara A, Yamashiro H, Owens JB, Stoytchev I, Pelczar P, Yanagimachi R, Moisyadi S. (2012). Hyperactive self-inactivating piggyBac for transposase-enhanced pronuclear microinjection transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(47): 19184–19189. doi: 10.1073/pnas.1216473109.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823–826. doi:10.1126/science.1232033.
- Malphettes L., Fussenegger M. (2006). Improved transgene expression fine-tuning in mammalian cells using a novel transcription-translation network. *J Biotechnol.* 124: 732–746.
- Mátés L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z. (2009) Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet.* 41: 753–761.
- Maxmen A. (2012). Transgenic fish wins US regulatory backing. A fast-growing salmon moves closer to approval after a fishy delay. *Nature.* doi:10.1038/nature.2012.12130
- Mephram, TB, Combes RD, Balls M, Barbieri O, Blokhuis HJ, Costa P, Crilly RE, de Cock Buning T, Delpire VC, O'Hare MJ, Houdebine LM, van Kreijl CF, van der Meer M, Reinhardt CA, Wolf E, van Zeller AM. (1998). The Use of Transgenic Animals in the European Union: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 28. *Altern Lab Anim.* 26: 21–43.

- [Metzger D., Chambon P.](#) (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24: 71–80.
- Miao K, Guo M, An L, Xu XL, Wu H, Wang D, Wu ZH, Tian JH. (2011). A new method to efficiently produce transgenic embryos and mice from low-titer lentiviral vectors. *Transgenic Res.* 20 : 357–363.
- Minorikawa S, Nakayama M. (2011). Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and BAC engineering via VCre/VloxP and SCre/SloxP systems. *Biotechniques.* 50: 235–246. doi: 10.2144/000113649.
- Metzger D., Chambon P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24: 71–80.
- Montoliu L, Whitelaw CB. (2011). Using standard nomenclature to adequately name transgenes, knockout gene alleles and any mutation associated to a genetically modified mouse strain. *Transgenic Res.* 20: 435–40. doi: 10.1007/s11248-010-9428-z.
- Moreira PN, Pozueta J, Pérez-Crespo M, Valdivieso F, Gutiérrez-Adán A, Montoliu L. (2007). Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Res.* 16: 163–168.
- Mussolino C, Cathomen T (2013). RNA guides genome engineering. *Nature Biotechnol* 31: 208–209. doi: 10.1038/nbt.2527.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T. et al. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnol.* 26: 101–106.
- Nature Methods (2012) 9, 28–34. A special issue containing six reviews on ZFN and TALEN.
- Niemann H, Kuhla B, Flachowsky G. (2011). Perspectives for feed-efficient animal production. *J Anim Sci.* 89: 4344–4463. doi: 10.2527/jas.2011-4235.
- Nottle MB, Nagashima H, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, Mellfattrick SM *et al.* (1999). Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In *Transgenic Animals in Agriculture* (J.D. Murray, A.M. Oberbauer & M.M. McGloughlin, eds), CABI Publ, New York USA, 145–156.
- Ono E, Amagai K, Taharaguchi S, Tomioka Y, Yoshino S, Watanabe Y, Chérel P, Houdebine LM, Adam M, Eloit M, Inobe M, Uede T. (2004). Transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/herpesvirus entry mediator C as a model for pseudorabies- resistant livestock. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 101:16150–16155.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs micro-injected with metallothionein-growth hormone fusion gene. *Nature* 300: 611–615.
- Park TS, Han JY. (2012). piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 109: 9337–9341.
- Pirottin D, Grobet L, Adamantidis A, Farnir F, Herens C, Daa Schrøder H, Georges M. (2005). Transgenic engineering of male-specific muscular hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 6413–6418.
- Petersen B, Carnwath JW, Niemann H. (2009). The perspectives for porcine-to-human xenografts. *Compl Immunol Microbiol Infect Dis.* 32: 91–105.
- Platenburg GJ, Kootwijk EAP, Kooiman PM, Woloshuk SL, Nuijens JH, Krimpenfort PJA. (1994). Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res.* 3: 99–108.
- Prather RS, Shen M, Dai Y. (2008). Genetically Modified Pigs for Medicine and Agriculture. *Biotechnol Genet Enginee Reviews.* 25: 245–266.
- Pursel VG, Wall RJ, Mitchell AD, Elsasser TH, Solomon MB, Coleman ME, *et al.*(1999). Expression of insulin-like growth factor-I in skeletal muscle of transgenic pigs. In *Transgenic Animals in Agriculture* (Murray J.D., Oberbauer A.M., McGloughlin M.M. eds), CABI Publ, New York, USA, 131–144.
- Rabbit Biotechnology. Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models. (2009). Springer (Publisher) Houdebine, Louis-Marie; Fan, Jianglin (Eds.) <http://www.springer.com/biomed/book/978-90-481-2226-4>
- Reh WA, Maga EA, Collette NM, Moyer A, Conrad-Brink JS, Taylor SJ. (2004). Hot topic: using a stearoyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 87: 3510–3514.
- Rémy S, Tesson L, Menoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegon I. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals *Transgenic Res.* 19: 363–371.

- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology* doi: 10.1038/nbt.2170.
- Ripoll P.J., Turquois V., Lebouris C., Delprat J., Martin K., Chabert C., Baty A., Houdebine L. M. (2010). Knockdown of milk protein genes in transgenic rabbits. UC Davis Transgenic Animal Research Conference VII. Tahoe City, USA. *Transgenic Res.* 19: 146.
- Ritchie WA, King T, Neil C, Carlisle AJ, Lillico S, McLachlan G, *et al.* (2009). Transgenic Sheep Designed for Transplantation Studies *Mol Reprod Develop.* 76: 61–64.
- RNAi: Multi-author review. (2009). *Nature.* 457(7228)
- Robl JM, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y. (2007). Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology.* 67: 127–133.
- Rostovskaya M, Fu J, Obst M, Baer I, Weidlich S, Wang H, Smith AJ, Anastassiadis K, Stewart AF. (2012). Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells. *Nucleic Acids Res.* 40(19): e150. doi: 10.1093/nar/gks643.
- Saeki K, Matsumoto K, Kinoshita M, Suzuki I, Tasaka Y, Kano K. *et al.* (2004). Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proc of the Natl Acad Sci USA.* 101: 6361–6366.
- Scolari F, Siciliano P, Gabrieli P, Gomulski LM, Bonomi A, Gasperi G, Malacrida AR. (2011). Safe and fit genetically modified insects for pest control: from lab to field applications. *Genetica* 139: 41–52. DOI 10.1007/s10709-010-9483-7
- Sioud M. (2006). Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 12: 167–176.
- Subbaraman N. (2011). Science snipes at Oxitec transgenic- in brief mosquito trial. *Nature Biotechnol.* 29: 9–11.
- Sumiyama K, Kawakami K, and Yagita K. (2010). A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. *Genomics* 95: 306–311.
- Suster M L, Sumiyama K, Kawakami K (2009). Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *BMC Genomics* 10: 477–483. doi:10.1186/1471-2164-10-477.
- Tabashnik BE, Sisterson MS, Ellsworth PC, Dennehy TJ, Antilla L, Liesner L, Whitlow M, Staten RT, Fabrick JA, Unnithan GC, Yelich AJ, Ellers-Kirk C, Harpold VS, Li X, Carrière Y. (2010). Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. *Nature Biotechnol.* 28 : 1304–1307.
- Taboit-Dameron F, Malassagne B, Viglietta C, Puissant C, Leroux-Coyau M, Chéreau C, Attal J, Weill B, Houdebine LM. (1999) 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.* 8: 223–235.
- Tiscornia G., Singer O., Ikawa M. and Verma I.M. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sciences U S A.* 100: 1844–1848.
- Tyack SG, Jenkins KA, O'Neil TE, Wise TG, Morris KR, Bruce MP, McLeod S, Wade AJ, McKay J, Moore RJ, Schat KA, Lowenthal JW, Doran TJ. (2013). A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Res.* 22(6): 1257–1264. doi: 10.1007/s11248-013-9727-2.
- Urschitz J, Kawasumi M, Owens J, Morozumi K, Yamashiro H, Stoytchev I, Marh J, Dee JA, Kawamoto K, Coates CJ, Kaminski JM, Pelczar P, Yanagimachi R, Moisyadi S. (2010). Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 8117–8122.
- USA FDA. (2009). Guidance for Industry: Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs. (Revised 17 May 2011). Food and Drug Administration (USA FDA), Maryland, USA. Available at <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM113903.pdf>.
- van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature.* 441: 766–769.
- van de Lavoie MC, EJ, PA, J, DR, WD, TS, RJ. (2012). Interspecific Germline Transmission of Cultured Primordial Germ Cells. *PLoS One.* 7: e35664

- Van Eenennaam A.L., Muir W.M. (2011). Transgenic salmon: a final leap to the grocery shelf? *Nat Biotechnol* 29: 706–710.
- Van Reenen CG. (2009). Assessing the welfare of transgenic animals. In *Ethics of Science and Technology Assessment*. Springer-Verlag. Heidelberg Berlin New York, pp 119–143.
- Vazquez-Salat, N, Houdebine, LM. (2013). Will GM animals follow the GM plant fate? *Transgenic Res.* 22: 5–13. DOI 10.1007/s11248-012-9648-5
- Vàzquez-Salat N, Salter B, Smets G, Houdebine LM. (2012). The current state of GMO governance: Are we ready for GM animals? *Biotechnol Advances.* 30: 1336–1343.
- Wall RJ, Powell A, Paape M., Kerr DE, Bannermann DD, Pursel VG *et al.* (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnol* 23: 445–451.
- Wall RJ, Laible G, Maga E, Seidel G Jr., Whitelaw B. (2009). Animal productivity and genetic diversity: cloned and transgenic animals – animal agriculture's future through biotechnology. *Issue Paper – Council for Agricultural Science and Technology Part 8*. No. 43: 16 pp.
- Wang J, Yang P, Tang B, Sun X, Zhang R, Guo C, Gong G, Liu Y, Li R, Zhang L, Dai Y, Li N. (2008). Expression and characterization of bioactive recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows. *J Dairy Sci.* 91: 4466–4476. doi: 10.3168/jds.2008-1189.
- Wheeler MB, Bleck GT, Donovan SM. (2001). Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. *Reproduction Supplement.* 583: 313–324.
- [Woods I.G.](#), [Schier A.F.](#) (2008). Targeted mutagenesis in zebrafish. *Nature Biotechnology.* 26, 650–651.
- Wu X, Ouyang H, Duan B, Pang D, Zhang L, Yuan T, Xue L, Ni D, Cheng L, Dong S, Wei Z, Li L, Yu M, Sun QY, Chen DY, Lai L, Dai Y, Li GP. (2012) Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. *Transgenic Res.* 21: 537–543. DOI 10.1007/s11248-011-9554-2
- Xu J, Zhao J, Wang J, Zhao Y, Zhang L, Chu M, Li N. (2011). Molecular-based environmental risk assessment of three varieties of genetically engineered cows. *Transgenic Res.* 20: 1043–1054. doi: 10.1007/s11248-010-9477-3.
- Yang P, Wang J, Gong G, Sun X, Zhang R, Du Z. *et al.* (2008). Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS One* 3: e3453
- Yong HY, Hao Y, Lai L, Li R, Murphy CN, Rieke A, Wax D, Samuel M, Prather RS. (2006). Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm. *Mol Reprod Develop.* 73: 595–599.
- Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. (2011). A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U SA.* 108: 1531–1536.
- Zhao J, Xu J, Wang J, Zhao Y, Zhang L, He J, Chu M, Li N. (2012). Impacts of human lysozyme transgene on the microflora of pig feces and the surrounding soil. *J Biotechnol.* 161: 437–444. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.018.