

CHAPITRE V

TRANSGENESE

I. Transgénique

Le terme de « transgénique » est devenu, ces dernières années, de plus en plus présent que ce soit dans la littérature scientifique ou dans l'actualité. Il est apparu pour la première fois dans une publication scientifique en 1981 où il était utilisé pour qualifier des souris obtenues suite à une micro-injection de gènes dans un des pronucléi.

Le terme de « transgénique » s'applique à des organismes vivants, qu'ils appartiennent au règne végétal ou animal, dans lesquels ont été transférés des gènes étrangers d'origine animale ou végétale à leur patrimoine héréditaire propre. Le gène étranger, appelé « transgène », se transmet à la descendance selon un mode mendélien.

Dans un récent rapport de l'ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods ou centre européen pour la validation des méthodes alternatives) sur l'utilisation des animaux transgéniques dans l'Union Européenne, une définition des techniques de transgénèse est également donnée : « la technique de transgénèse implique l'introduction de matériel génétique fonctionnel (ADN) au niveau de cellules germinales d'un organisme ».

Le fait qu'il soit dit que l'ADN est introduit au niveau des cellules germinales sous-entend la notion de transmission héréditaire de cette nouvelle information génétique. Mais la définition la plus récente des animaux ou végétaux transgéniques est suggérée par Beardmore : ce sont des « organismes contenant des séquences intégrées d'ADN cloné (transgène), transférées en utilisant des techniques de génie génétique ». Cette définition est la plus générale et elle fait directement référence à la science à la base de cette révolution : le génie génétique.

II. Organismes Génétiquement Modifiés (OGM)

Bien que le terme de « transgénique » soit présent dans le langage courant, ce terme est absent de la législation applicable dans le cas de l'utilisation de tels organismes. Dans la législation, que ce soit au niveau européen ou au niveau français, il est fait mention d'« organismes génétiquement modifiés ». Mais il est vrai que cette définition est plus générale car d'une part elle englobe des techniques autres que celles utilisées en transgénèse (c'est-à-dire toutes les

techniques de manipulation de l'ADN) et d'autre part elle concerne la globalité du règne vivant (animal ou végétal).

Par « organisme génétiquement modifié », il est entendu « organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaison naturelles ».

Par le terme d'organisme, on entend « toute entité biologique non cellulaire, cellulaire, ou multicellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique. Cette définition englobe les micro-organismes, y compris les virus ». Cette définition provient de la loi française de référence dans le cas de l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés, la loi n°92-654 du 13 juillet 1992.

II.1. Une bactérie infectant naturellement les végétaux supérieurs

La transgénèse consiste à ajouter un nouveau gène dans un organisme. La possibilité de régénérer une plante entière à partir de quelques cellules végétales est d'un grand intérêt lors de ces transgénèses. Une des techniques les plus utilisées en transgénèse végétale est l'utilisation d'une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie en forme de bâtonnet, de la famille des Rhizobiacées. Elle se développe dans le sol. Elle est attirée par des composés phénoliques dégagés par les plantes dicotylédones lorsqu'elles sont blessées. Au niveau de cette blessure, *Agrobacterium* est capable de se fixer sur les cellules du végétal. À la suite de ce contact, ces cellules végétales se multiplient de manière importante, donnant naissance à une formation tumorale. Elle est en général située au niveau du collet, d'où le nom de cette formation : la galle du collet (crown gall). Les cellules de la galle libèrent des composés chimiques particuliers dans le milieu : les opines, molécules formées de deux acides aminés couplés. Les bactéries *Agrobacterium* présentes près de la galle, dans le sol, sont capables d'utiliser alors ces opines comme source d'azote, mais aussi de carbone et d'énergie.

Agrobacterium tumefaciens est donc capable d'induire, chez une plante dicotylédone, la formation d'une galle lui fournissant un substrat. Depuis 1974, on sait que cette induction est due au transfert d'un petit ADN plasmidique depuis la bactérie jusque dans le génome des cellules de la plante.

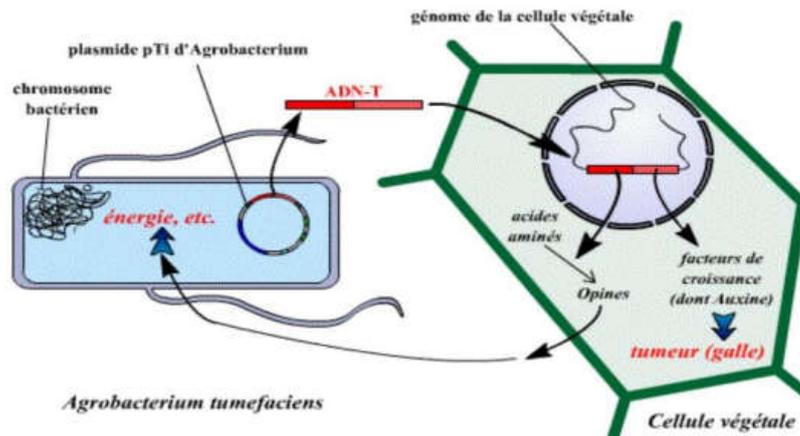


Figure 1. *Agrobacterium* transfère un fragment d'ADN (l'ADN-T) dans le génome de la plante. Les échelles ne sont pas respectées.

Une bactérie potentiellement utilisable en transgénèse *Agrobacterium tumefaciens* (tout comme, d'ailleurs, d'autres bactéries de la famille des Rhizobiacées) est donc capable d'injecter un ADN dans une cellule végétale où il s'insère dans le génome chromosomique. Cet ADN, qui peut circuler ainsi d'un organisme à un autre, est un fragment de plasmide (ADN circulaire bactérien de petite taille) : le plasmide pTi. *Agrobacterium* réalise donc, naturellement, une transgénèse d'une partie de ses gènes (grâce à pTi) dans un organisme végétal. L'ADN qui est ainsi transféré est nommé ADN-T. Il a donc été rapidement proposé, une fois ce mécanisme connu, de le détourner dans un but de transgénèse. Pour cela, il « suffit » de remplacer l'ADN-T par un autre ADN portant un gène d'intérêt, par exemple.

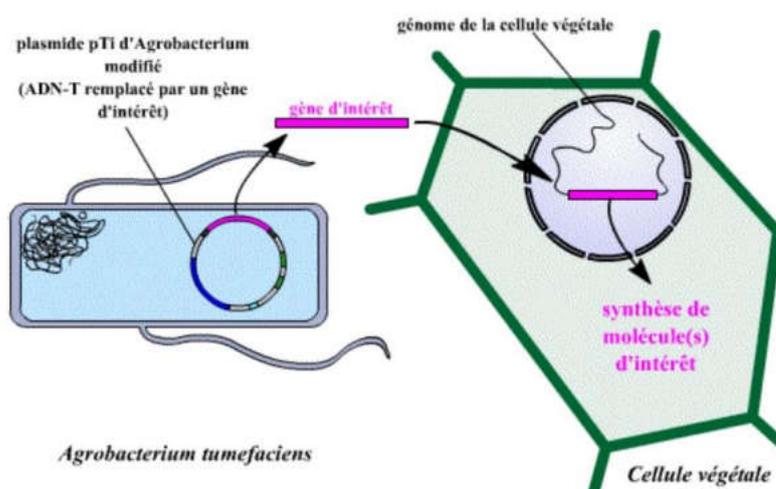
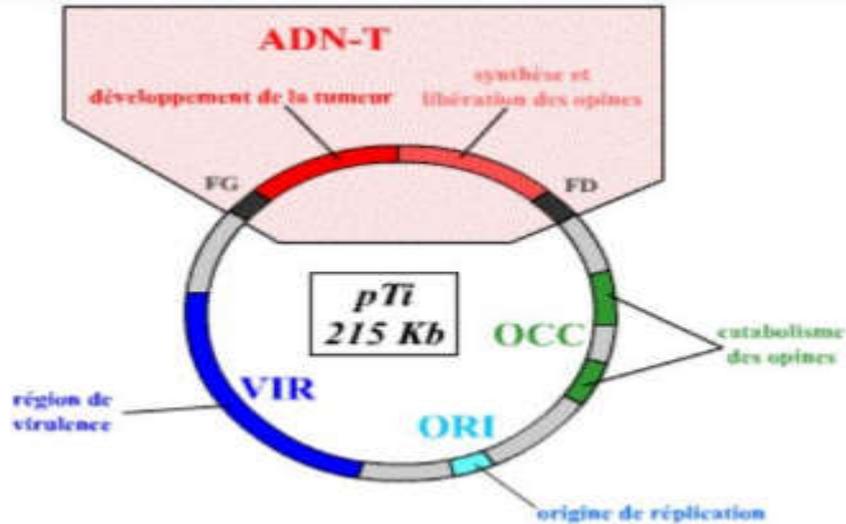


Figure 2. Le remplacement de l'ADN-T par un gène d'intérêt permet d'envisager une technique de transgénèse.

II.2. Le plasmide pTi

Le plasmide pTi est un petit plasmide, de 215 000 paires de bases. Ce plasmide comporte plusieurs régions : Tableau 2. Les différentes régions du plasmide pTi



ADN-T	<p><i>Région transférée de la bactérie à la cellule végétale.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cette région est flanquée de deux zones de bordures (FD à droite et FG à gauche), importantes pour la réalisation du transfert. • L'ADN-T comporte une région permettant le développement de la tumeur (galle) chez la plante infectée. • L'ADN-T comporte aussi les gènes permettant la synthèse et la libération des opines par les cellules végétales.
VIR	<p><i>Région de virulence.</i></p> <p>Cette région comporte une série de gènes, qui permettent la fixation de la bactérie aux cellules végétales et le transfert de l'ADN-T.</p>
OCC	<p><i>Région de catabolisme des opines.</i></p> <p>Cette région permet à la bactérie d'utiliser les opines libérées par le végétal suite à son infection par l'ADN-T.</p>
ORI	<p><i>Région de réplication.</i></p> <p>Cette région permet au plasmide de se multiplier dans la bactérie.</p>

Figure 3. Le plasmide pTi

III. Les différentes méthodes de transgénèse

L'obtention d'animaux transgéniques repose, quelque soit la technique utilisée, sur les quatre mêmes principales étapes (voir Figure 4).

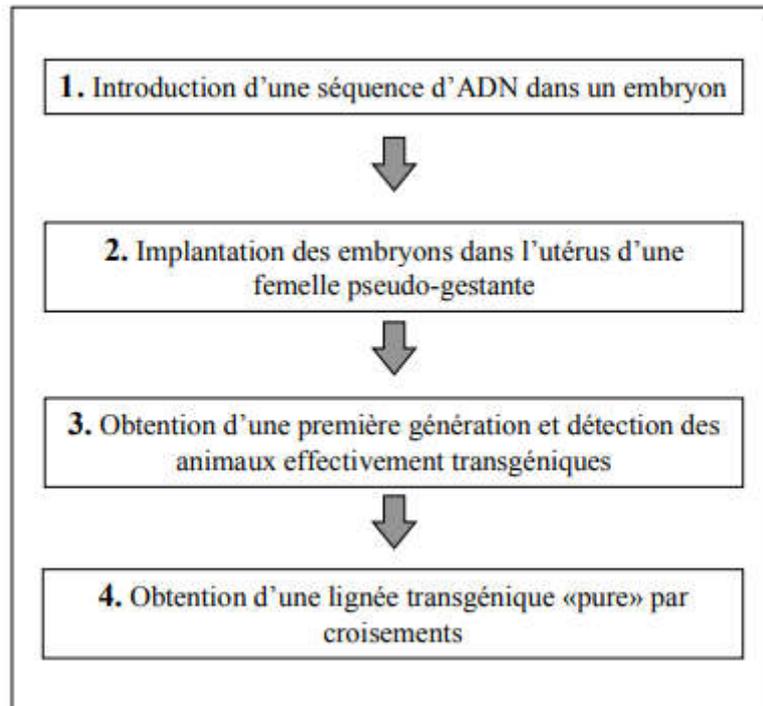


Figure 4 : Les principales étapes de l'obtention d'animaux transgéniques

Ces quatre étapes sont bien sûr précédées d'une étape de biologie moléculaire qui consiste en une étape d'isolement du gène d'intérêt (identification, séquençage éventuel). Chez la souris, trois techniques de transgénèse (ou plus exactement trois techniques d'introduction d'une séquence d'ADN dans un embryon) sont le plus communément utilisées (voir Figure 5) :

- la micro-injection pro-nucléaire d'ADN cloné dans des œufs fertilisés
- utilisation de vecteurs rétroviraux
- transfert ciblé de gènes dans les cellules embryonnaires via la recombinaison homologue.

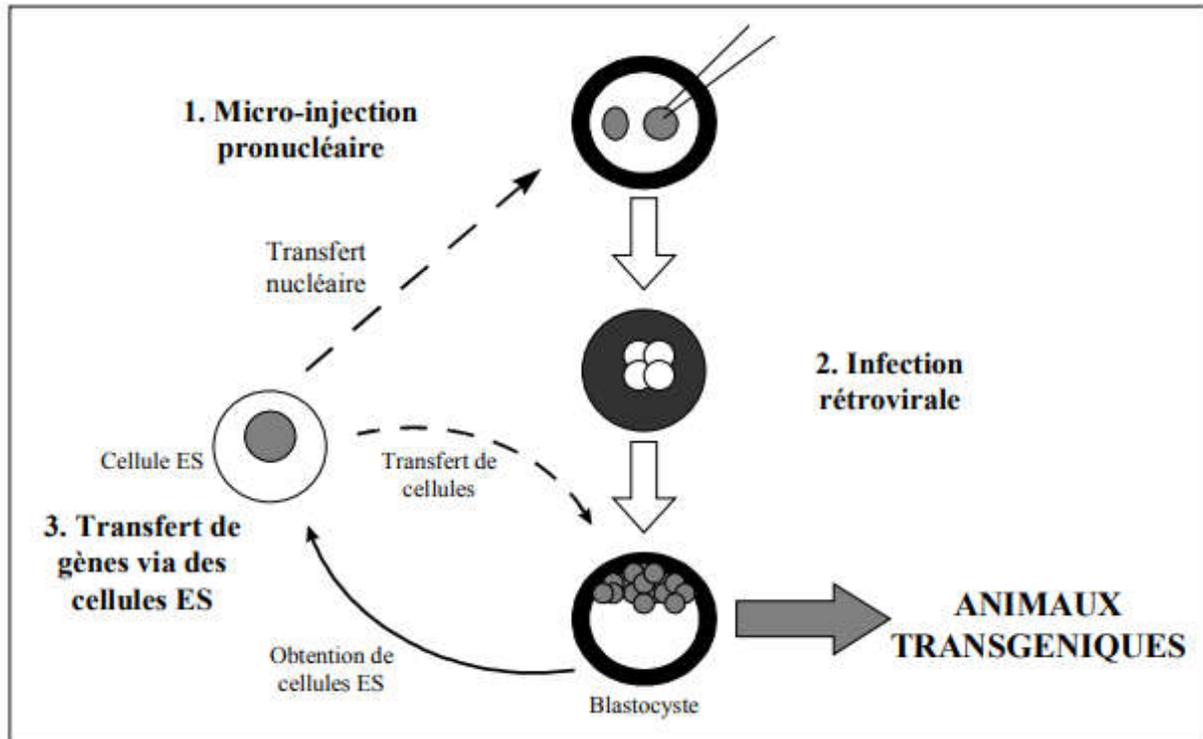


Figure 5 : Les 3 principales méthodes de transgénèse

D'autres méthodes sont également possibles mais elles sont encore peu utilisées (introduction de gènes dans les spermatozoïdes, injection de régions chromosomiques microdisséquées ou technique de ciblage par le système Cre-lox). Parmi les nouvelles méthodes, celle utilisant le système Cre-lox est la plus prometteuse car elle permet un ciblage tissulaire.

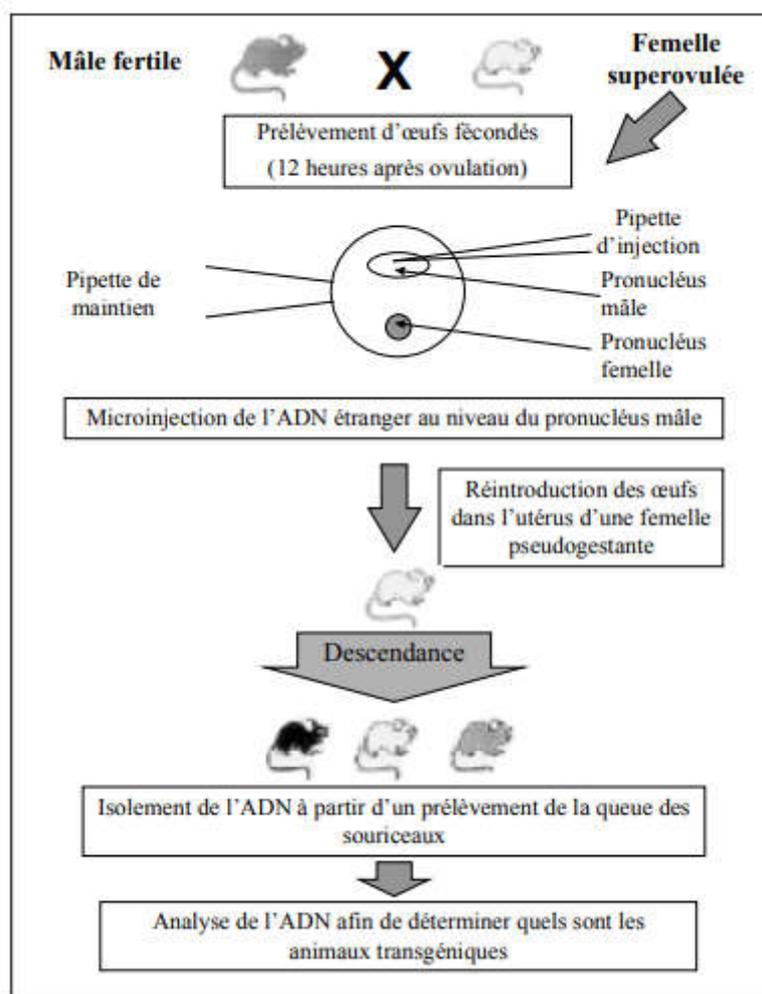


Figure 6 : Les principales étapes principales de l'obtention de souris transgéniques par micro-injection pronucléaire

III. 1ère étape : Préparation de la solution d'ADN injectée

Une séquence d'ADN déterminée est clonée (c'est-à-dire reproduite à l'identique un grand nombre de fois) ce qui permet l'obtention d'une solution d'ADN. Cette solution sera ensuite microinjectée au niveau d'un des pronucléi. L'efficacité de la micro-injection dépend des propriétés et de la qualité (e.g. pureté) de la solution injectée.

Il a été montré que plus le nombre de copies d'ADN est grand, plus le taux d'intégration de l'ADN est important. Cependant, une préparation trop concentrée donc trop visqueuse peut augmenter le risque de mort de l'embryon au moment de l'injection. De plus, l'ADN linéaire s'intègre plus efficacement que l'ADN circulaire.

Il est recommandé d'éliminer toute séquence inutile, notamment les séquences provenant du vecteur de clonage au moyen d'enzymes de restriction.

Mais certaines séquences, au contraire, se sont révélées importantes dans la régulation de l'expression du transgène : c'est le cas des introns (qui sont de larges séquences non codantes) qui ont une influence importante sur le fonctionnement des gènes introduits par micro-injection. Il est donc recommandé d'injecter l'ADN sous sa forme génomique plutôt que sous sa forme d'ADNc (ADN complémentaire qui est obtenu par transcription reverse à partir de l'ARN messager et qui ne comprend pas les introns).

III. 2. 2ème étape : Récolte des œufs fertilisés

Le choix de la souris donneuse est important : il est nécessaire de choisir une lignée avec un bon rendement en œufs, mais il est également essentiel que ces œufs survivent bien à la micro-injection.

Des femelles prépubères sont stimulées hormonalement par deux injections intrapéritonéales successives d'hormones à 46-48 heures d'intervalle (il est impératif de respecter ce délai) :

- une première injection de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin : gonadotropine sérique). Cette hormone en se substituant à l'hormone gonadotrope hypophysaire à effet FSH (Follicle-Stimulating Hormone ou hormone folliculotrope) stimule le développement des follicules mûrs.

- une seconde injection de hCG (human Chorionic Gonadotropin : gonadotropine chorionique humaine). Cette hormone, en mimant l'effet de la LH (Luteinizing Hormone ou hormone lutéinisante) parachève la maturation folliculaire et favorise l'ovulation.

Suite à ce traitement, un accouplement entre ces femelles et des mâles fertiles est réalisé. L'apparition, après quelques heures, d'un bouchon vaginal, chez 80 à 90% des femelles, est le signe que l'accouplement a effectivement eu lieu.

Il a été montré que le rendement est plus élevé dans le cas d'œufs hybrides (c'est-à-dire issus d'un croisement de 2 souches pures) plutôt que dans le cas d'œufs de souche pure. Brinster et son équipe ont montré que ce rendement était huit fois plus élevé avec des souris hybrides (C57BL/6xSJL) qu'avec des souris C57BL/6).

Douze heures après l'accouplement, les femelles sont sacrifiées et les oviductes contenant habituellement chacun entre 10 à 15 œufs sont prélevés. Ainsi, entre 20 et 30 œufs peuvent être récoltés par souris.

Ces œufs fécondés peuvent être conservés pendant 3 à 36 heures dans un milieu de culture. Ils sont incubés à 37°C dans une atmosphère à 5,4% de CO₂ sur un milieu avec un pH équilibré. Les œufs subissent ensuite un traitement avec une hyaluronidase qui les libère de leur gaine de cellules folliculaires. Puis finalement ils sont « lavés » par passages successifs dans le milieu de culture afin d'éliminer toute trace résiduelle d'enzyme pouvant avoir un effet néfaste pour eux.

III. 3. 3ème étape : Micro-injection

Cette étape nécessite à la fois une technique particulière et un appareil spécial.. Cette technique nécessite de la dextérité et de l'entraînement pour la personne qui la réalise et se fait sous microscope inversé (voir Figure 7).

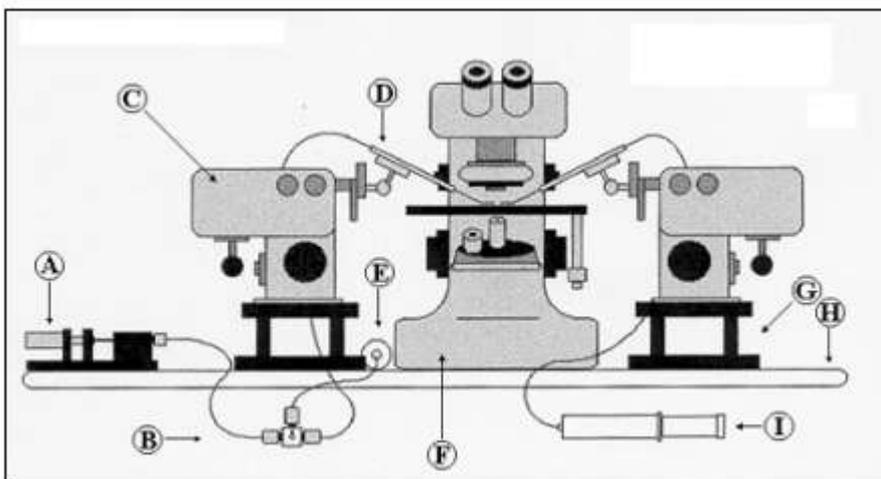


Figure 7 : Schéma d'un appareil pour micro-injection

- A. Micromètre avec vis hydraulique (Micrometer / Hydraulic Drive Unit)
- B. Robinet 3 voies (3-way stopcock valve)
- C. Micromanipulateur (Micromanipulator)
- D. Porte-aiguilles avec micro-injecteur et micropipette de contention (Needle holder / Instrument collar)
- E. Seringue de 60 ml avec embout (60 ml luer end syringe)
- F. Microscope inversé (Inverted light stereomicroscope)
- G. Support du micro-manipulateur (Micromanipulator stands)
- H. Plateau de base ("Bread-board" instrument base)
- I. Seringue en verre de 60 ml (Glass 60 ml syringe)

La micro-injection se fait généralement une fois que le pronucléus mâle est visible et observable. L'intégration du transgène se fait vraisemblablement lors de la réplication de l'ADN. Cependant en raison de la dégradation de l'ADN, il est préférable de ne pas réaliser la micro-injection trop tôt avant la réplication. En outre, il paraît judicieux de ne pas microinjecter après la première réplication (c'est-à-dire au stade 2 cellules soit 11 à 20 heures après la fécondation). Ainsi, il semblerait préférable d'injecter avant la première réplication, c'est en tout cas le moment choisi par la plupart des expérimentateurs.

Quelques œufs sont déposés dans une boîte de Pétri contenant une goutte de milieu recouverte d'huile de paraffine, par exemple, afin d'éviter toute évaporation.

Une micropipette de contention (ou holding pipette) permet le maintien et le positionnement correct des œufs par aspiration. Une autre permet l'injection de l'ADN préalablement préparé. La manipulation de ces deux micropipettes se fait grâce à des micromanipulateurs.

A ce stade de développement de l'œuf, les deux pronuclei sont bien visibles. Le pronucléus mâle étant le plus gros et le plus près de la surface, la micro-injection se fait à ce niveau (voir Figure 8). Un picolitre de liquide, contenant entre 100 et 1000 copies du transgène, est alors injecté : le nucleus se dilate avec doublement du volume.

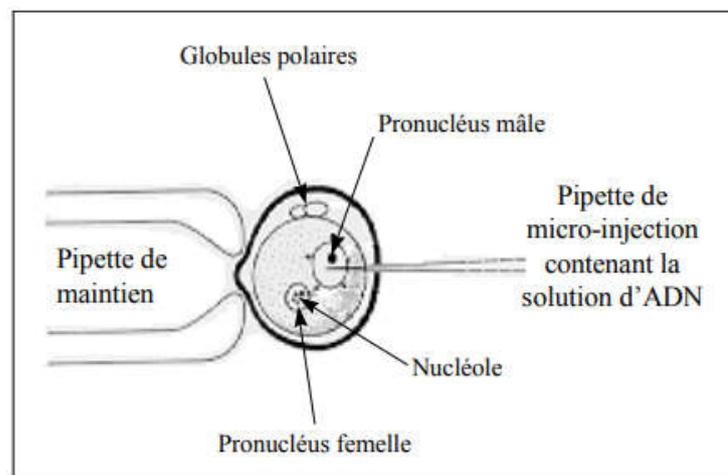


Figure 8 : Micro-injection pronucléaire

Tous les 20 œufs, les micropipettes doivent être changées et il est déconseillé de garder plus de 30 minutes les œufs au niveau de la chambre d'injection.

Les œufs injectés sont ensuite placés dans une étuve à 37°C à 5,4% de CO₂ jusqu'au moment de leur réimplantation. La réimplantation peut se faire directement après la micro injection ou le lendemain en maintenant les œufs en culture.

III.4. 4ème étape : Réimplantation

Les œufs sont réimplantés dans une mère porteuse mais pour que le développement embryonnaire se déroule correctement, le terrain hormonal de ces femelles doit être adéquat.

Pour cela, la veille de la micro-injection, des femelles en œstrus sont accouplées avec des mâles infertiles. Ces mâles ont été préalablement stérilisés par vasectomie (section chirurgicale du canal déférent). Il est également possible d'utiliser des mâles génétiquement stériles. Les femelles présentant le lendemain un bouchon vaginal feront partie du pool de mères porteuses.

La réimplantation est une opération chirurgicale, sous anesthésie générale, réalisée sous un microscope. Les œufs sont introduits au niveau de l'ampoule de l'oviducte (20 œufs si l'implantation se déroule le jour de la micro-injection, environ 15 œufs si ils ont été conservés in vitro).

Le temps de gestation est de 20 jours à partir de la date de l'implantation. Mais le nombre d'œufs se développant à terme est faible et les mères porteuse n'ayant pas mis bas au 20ème jour seront sacrifiées.

Ensuite les souriceaux (environ 5 à 6 par portées) sont adoptés par des femelles nourrices (choisies en fonction de leurs bonnes caractéristiques maternelles).

III.5. 5ème étape : Identification des souriceaux transgéniques

Une fois que la première génération de souris est obtenue, il est nécessaire de savoir quelles sont les souris ayant intégré le transgène. Pour cela, une petite quantité d'ADN des animaux est nécessaire : en général, des fragments de queue sont prélevés sur les animaux encore jeunes. Ensuite les transgènes sont identifiés par la technique de transfert de Southern (ou Southern-Blot) ou par PCR (Polymerase Chain Reaction : réaction de polymérisation en chaîne) sur ces fragments.

Pour la technique de Southern, l'ADN est déposé sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon et une hybridation avec une sonde marquée et spécifique du transgène est réalisée. Mais

le taux de faux-positifs pour cette méthode est important car il est nécessaire que l'ADN utilisé soit d'une pureté suffisante.

De plus, la détection des animaux mosaïques peut être difficile en raison du faible nombre de copies du transgène. Dans le cas de la PCR, la quantité d'ADN peut être plus faible : la salive ou des fragments obtenus suite au marquage des animaux peuvent être suffisants. De plus, cette méthode peut ne pas être pratiquée à partir d'ADN purifié car une étape d'amplification de l'ADN est incluse dans la technique. Elle est également plus sensible et permet donc de détecter des animaux mosaïques. Ainsi la PCR apparaît comme la méthode la plus simple et la plus rapide.

IV. Utilisation des animaux transgéniques en expérimentation animale

La transgénèse en permettant de bénéficier de l'expression d'un gène particulier au sein d'un organisme complexe est devenue un outil remarquable pour toute recherche qu'elle soit fondamentale ou appliquée.

Les applications des techniques de transgénèse, dans le domaine de la recherche médicale, sont nombreuses et variées. En recherche fondamentale, elle permet l'étude de l'expression et du rôle des gènes au sein d'un organisme complexe. Dans le cadre des études biomédicales, elle rend possible la création de nouveaux modèles de maladies. Plus récemment, des animaux transgéniques sont développés pour la production de protéines thérapeutiques ou d'organes pour des xéno-transplantations.

Tout ceci est sans oublier les nombreuses applications agronomiques de la transgénèse : la lutte contre les maladies, l'amélioration des performances des animaux de rente, la modification de la composition du lait, etc.. .

L'utilisation des animaux transgéniques est de plus en plus importante, elle a augmenté, au Royaume-Uni, pendant la période 1990-1996 de 525%. Cette augmentation est d'autant plus impressionnante que l'on assiste parallèlement à une diminution du nombre d'animaux utilisés en recherche, de manière générale, notamment en France.

V. L'AGROINFILTRATION

Les bactéries génétiquement modifiées produisent plus facilement et surtout plus rapidement, des protéines à usage pharmaceutique ou industriel que les plantes transformées. Or les bactéries sont incapables d'ajouter des sucres (glycosylation) lesquels sont

indispensables au fonctionnement de nombreuses protéines. Ainsi la plupart des protéines médicaments sont synthétisées dans des cellules animales en culture ce qui revient excessivement cher.

Produire ces protéines complexes dans les plantes est déjà une réalité mais reste un challenge international. Cette technique est en effet beaucoup moins onéreuse en raison de la grande quantité de protéines d'intérêt produites. Néanmoins, il peut être intéressant d'utiliser une plante non transformée comme support d'expression d'une bactérie transformée.

En mettant en contact des plantes ou des parties de plantes avec des *Agrobacterium* modifiées, il est possible d'intégrer transitoirement le gène d'intérêt préalablement introduit dans la bactérie. La plante exprime alors la protéine désirée. Ce sont les cellules somatiques qui assurent cette expression et non les cellules germinales. En effet, les plantes sont utilisées avant la reproduction et il n'y a donc pas d'insertion et de transmission de transgène possible.

L'intérêt de la production par les plantes de protéines à usage industriel ou thérapeutique est triple : production de protéines à grande échelle, coût extrêmement réduit et absence de contamination par des pathogène animaux ou humains (prions et virus, par exemple). Cette technique est également utilisée en recherche pour déterminer la fonction des gènes via le phénotype associé.

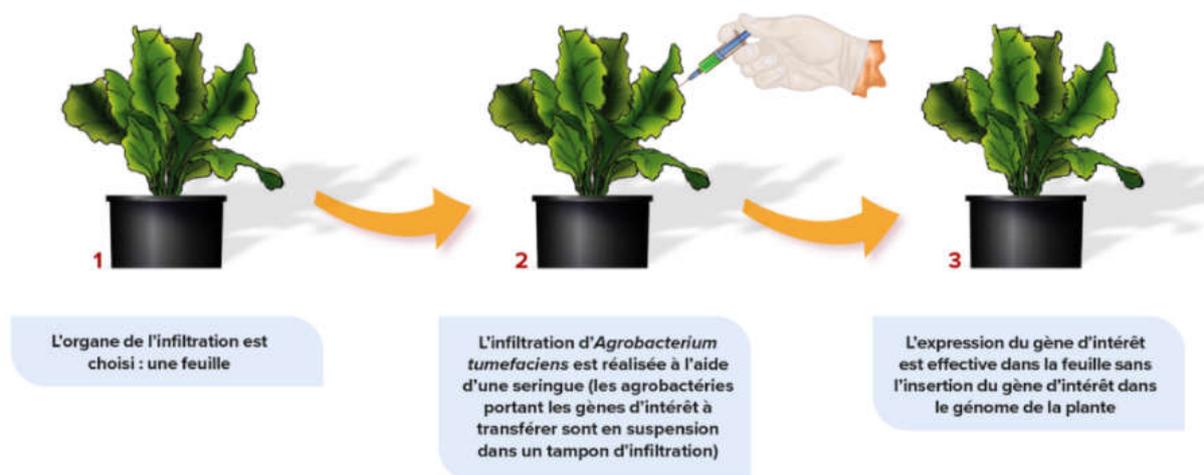


Figure 9 : Agroinfiltration : expression localisée et temporaire d'un gène d'intérêt