COMMISSION DE L'ÉTHIQUE DE LA SCIENCE ET DE LA TECHNOLOGIE

AVIS

POUR UNE GESTION ÉTHIQUE DES OGM

Novembre 2003

Document complémentaire :

VUE D'ENSEMBLE DES TECHNIQUES USUELLES EN TRANSGENÈSE ANIMALE

Jean-François Sénéchal

Août 2002

Québec

Vue d'ensemble des techniques usuelles en transgenèse animale

par
Jean-François Sénéchal

Pour la Commission de l'éthique de la science et de la technologie

Dans le cadre de la préparation de son avis

Pour une gestion éthique des OGM

août 2002

AVANT-PROPOS

La présente étude s'inscrit dans le cadre des travaux réalisés pour la préparation de l'avis de la Commission de l'éthique de la science et de la technologie : *Pour une gestion éthique des OGM* (2003).

Afin d'enrichir sa réflexion, la Commission a commandé à des partenaires du milieu universitaire (professeurs ou étudiants des cycles supérieurs) des études sur différents thèmes de la problématique des OGM : la transgenèse, le financement de la recherche, les représentations spirituelles et culturelles, les médias et l'alimentation.

Les études suivantes font donc partie des documents complémentaires à l'avis de la Commission qui sont déposés sur le site Internet de la Commission en guise de complément d'information (http://www.ethique.gouv.qc.ca) :

- **Isabelle Boucher :** « Les modifications génétiques chez les microorganismes »
- **Éric Dion :** « OGM végétaux »
- **Jean-François Sénéchal :** « Vue d'ensemble des techniques usuelles en transgenèse animale » et « Est-il possible de faire... sans la transgenèse? »
- **Guillaume Lavallée :** « Financement de la recherche dans le secteur des biotechnologies : le cas des OGM »
- **Jose Lopez Arellano :** « Les représentations véhiculées dans la culture amérindienne du Québec en ce qui a trait à l'alimentation, aux organismes génétiquement modifiés (OGM) et aux transformations que l'humain peut apporter à la nature »
- **André Beauchamp**[1] **:** « Le christianisme et les OGM »
- **Mikhaël Elbaz,** en collaboration avec **Ruth Murbach :** « Cuisine de Dieu – aliments profanes. Prohibitions alimentaires du judaïsme, organismes génétiquement modifiés et enjeux éthiques »
- **Charles-Anica Endo :** « Le bouddhisme et les OGM »
- **Ali Maarabouni :** « L'islam et les OGM »
- **Richard Lair et Alain Létourneau :** « Rapport de recherche sur la couverture médiatique au Québec en matière d'alimentation et d'OGM »

La CEST tient à souligner que le contenu de ces différentes études n'engage pas sa responsabilité comme organisme consultatif. Il lui apparaît cependant important de rendre ces documents publics afin d'en faire bénéficier les lecteurs qui souhaiteront explorer davantage quelques-uns des thèmes abordés dans l'avis de la Commission.

La Commission remercie les auteurs de ces études pour leur contribution à ses travaux.

1. À titre de théologien, le président de la Commission a gracieusement fourni ce texte sur le christianisme.

Vue d'ensemble des techniques usuelles en transgenèse animale

Au cours des trente dernières années, plusieurs techniques ont été développées pour manipuler génétiquement les animaux. Parmi ces techniques, on compte la transgenèse. Celle-ci se définit comme étant l'introduction par l'homme de matériel génétique extrinsèque (qu'on désigne communément par l'expression «transgène») dans le génome d'une cellule ou d'un organisme».

D'une manière générale, les techniques de transgenèse se divisent en deux groupes. En premier lieu, certaines techniques permettent d'insérer le transgène à un endroit très précis du génome. À l'opposé, d'autres ne le permettent pas. Dans ce cas, le transgène s'insère aléatoirement à l'intérieur du génome. Il convient toutefois de souligner que l'endroit où s'insère le transgène dans le génome possède une importance considérable. L'endroit d'insertion peut en effet profondément influencer l'écart entre les résultats obtenus par la manipulation génétique et les résultats souhaités[2].

Dans le tableau qui suit, les techniques de transgenèse présentées sont regroupées en fonction de leur cible d'intégration, soit aléatoire ou précise. S'y ajoutent, au bas du tableau, quelques techniques qui, sans nécessairement répondre à la définition de transgenèse, sont néanmoins impliquées indirectement dans le processus de transgenèse.

Par ailleurs, au-delà des techniques utilisées afin de concevoir un animal transgénique, la nature et la portée de la modification génétique opérée doivent également se comprendre à la lumière de la composition du transgène. En effet, le transgène est un message envoyé à la cellule par l'homme. Comprendre le contenu de ce message, c'est comprendre les résultats envisagés et espérés par l'expérimentateur. Ces transgènes abritent une somme d'informations extrêmement variables, ne serait-ce que par la quantité d'ADN qui les constitue. Ce message peut être petit, abrégé, long, très long, précis, imprécis, simple, compliqué, etc. Parmi les transgènes pouvant être utilisés, on compte un plasmide3, une construction génétique4, un chromosome5, un adénovirus6, etc. Ainsi, l'examen de la composition du transgène fournit d'importants indices en vue de comprendre ce qui se passe lorsqu'un animal est manipulé génétiquement. Ce dernier point n'est pas traité dans le présent document

2. Martin, D. I. & Whitelaw, E. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays* **18**, 919-23 (1996).
3. Plasmide : ADN circulaire de bactérie, extra chromosomale (non nécessaire à sa survie) dont la réplication est autonome.
4. Transgène le plus communément utilisé pour la transgenèse. Il se compose principalement de deux parties : le promoteur et la partie codante. Le promoteur est la partie règle l'expression du transgène. La partie codante, est celle qui indique la protéine à produire.
5. Chromosome : Structure génétique dont la réplication est autonome. Le génome humain complet est contenu dans 23 chromosomes.
6. Adénovirus : Transgène formé d'un promoteur viral et d'ADN.

Tableau 1 : Vue d'ensemble des techniques usuelles en transgenèse animale

Intégration aléatoire du transgène

Micro-injection :
La micro-injection consiste à introduire le transgène de façon mécanique, c'est-à-dire à l'aide de micro instruments, à l'intérieur d'un ovule fraîchement fécondé soit environ dix heures après sa fécondation {Gordon *et al.*, 1980}.

Utilisation de vecteurs viraux et rétroviraux :
La survie de certains virus est liée à leur capacité à intégrer leur propre matériel génétique au bagage génétique d'un hôte donné pour vivre ensuite à ses dépens. Une technique de transgenèse utilisée consiste donc à tirer avantage de cette aptitude «invasive» du virus. Pour ce faire, le virus est modifié de façon à ce qu'il puisse livrer un transgène à l'intérieur de la cellule qu'il infectera. Cette construction génétique formée d'un promoteur viral et d'ADN est nommée «adénovirus». L'adénovirus peut infecter un ovule, une cellule en culture {Schnieke *et al.*, 1983} ou des cellules *in vivo* quand il est injecté directement dans le tissu ciblé {Kaneda *et al.*, 2001; Ghazizadeh *et al.*, 2000}.

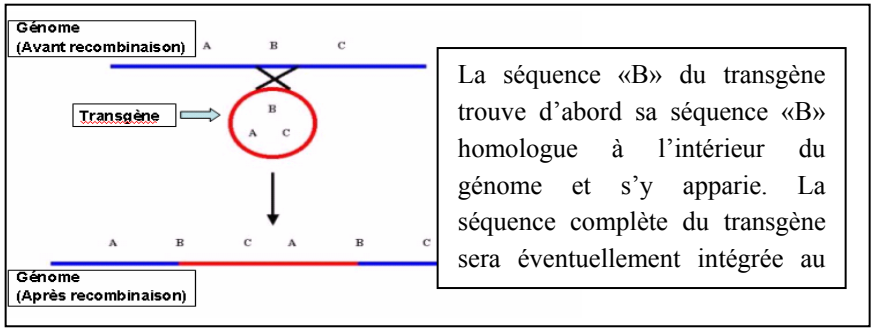
Le spermatozoïde comme véhicule (*sperm-médiated gene transfer*) :
La technique consiste à récolter des spermatozoïdes et à les baigner dans une solution contenant le transgène de façon à ce que le transgène pénètre dans le spermatozoïde. Les spermatozoïdes ayant intégré le transgène sont ensuite utilisés pour une insémination artificielle {Lavitrano *et al.*, 1989}. Il est également possible de faire pénétrer le transgène dans les spermatozoïdes *in vivo*. Il s'agit d'injecter directement dans les testicules la solution contenant le transgène {Sato *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2000}.

Transfection :
Il est possible d'introduire le transgène à l'intérieur du bagage génétique d'une cellule en faisant simplement baigner cette cellule dans un milieu contenant le transgène. Certaines techniques complémentaires facilitent cette transfection.

> **Électroporation :** La technique d'électroporation consiste à mettre en présence «l'ADN à introduire» et «la cellule réceptrice» dans un même milieu. Un léger choc électrique, traversant le milieu de culture, provoque une ouverture des membranes cellulaires ce qui permet à l'ADN de pénétrer à l'intérieur de la cellule.
> **Fragilisation chimique :** Certains agents chimiques peuvent être employés afin de fragiliser la membrane cellulaire. Cette opération a pour but faciliter le passage du transgène à l'intérieur de la cellule
> **Autres :** L'ajout d'enzymes de restriction et de liposomes facilite également ce passage

Intégration du transgène à un endroit précis du génome

Recombinaison homologue :
La technique de recombinaison homologue permet à un gène étranger de se substituer très précisément à un gène ciblé ou de s'intégrer à un endroit très précis du génome {Clark *et al.*, 2000}. Lorsque la recombinaison homologue a pour conséquence d'inactiver la fonction d'un gène, le terme «Knock Out» est employé. Lorsque la recombinaison permet l'intégration d'un nouveau gène ou la duplication d'un gène existant, le terme «Knock in» est employé.



La séquence «B» du transgène trouve d'abord sa séquence «B» homologue à l'intérieur du génome et s'y apparie. La séquence complète du transgène sera éventuellement intégrée au

Parmi les systèmes de recombinaison homologue, deux d'entre eux sont plus fréquemment utilisés : le système «Cre-Lox» et le système «FLP-FRT».

> **Système Cre-Lox :** La stratégie Cre-Lox se base sur l'habilité d'une enzyme (Cre recombinase) à supprimer tout fragment d'ADN se trouvant entre des séquences précises d'ADN (LoxP). Par recombinaison homologue, une première manipulation génétique permet d'insérer des sites LoxP à chaque extrémité d'un gène donné. Une deuxième étape permet d'insérer dans le génome de la cellule modifiée la séquence de la «Cre recombinase». Lorsque la «Cre recombinase» sera sécrétée, la section d'ADN comprise entre les sites loxP sera supprimée et sa fonction génétique sera inactivée.
> **Système FLP-FRT :** Le système FLP-FRT est semblable au système Cre-Lox. Avec ce système c'est la FLP recombinase qui supprime tout fragment d'ADN se trouvant entre des séquences précises d'ADN (FRT)

Autres techniques impliquées indirectement dans la transgenèse animale

Culture et transformation cellulaire :

La culture cellulaire peut être utilisée en transgenèse animale. La technique consiste à ajouter le transgène au milieu de culture cellulaire de façon à ce que les cellules, qui croissent dans ce milieu, intègrent ce transgène à leur bagage génétique. Évidemment, cette technique ne peut conduire, à elle seule, à la création d'animaux transgéniques. Cependant, des techniques comme la «création de chimère» et le «clonage par transfert nucléaire» permettent aujourd'hui de créer un animal transgénique à partir de cette cellule génétiquement modifiée.

Création de chimère :

Il est possible de créer un animal transgénique par une étape transitoire de création de chimère. La technique consiste à modifier génétiquement des cellules durant leur passage en culture cellulaire, à sélectionner les cellules qui ont intégré le transgène à leur bagage génétique et à transférer l'une de ces cellules modifiées dans un embryon dont le stade de développement est précoce {Capecchi *et al.* 1989}. À cette étape, l'embryon est déjà formé de centaines de cellules. La cellule génétiquement modifiée cohabitera donc avec toutes ces cellules, de sorte que l'embryon devient chimérique. En effet, il est désormais constitué de cellules de deux origines distinctes (cellule, d'un individu X, modifiée *in vitro* et cellule d'un individu Y qui a fournit l'embryon). Si l'embryon possédait, par exemple, 99 cellules avant l'insertion de la cellule modifiée, alors 1 % des cellules de cet embryon une fois développé seront également génétiquement modifiées. L'expérimentateur souhaitera que, parmi ce 1 % de cellules porteuses du transgène, il y ait des cellules germinales (cellules qui participent à la reproduction). Plus la cellule transférée sera totipotente (capacité de certaines cellules de se différencier en n'importe quel tissu de l'organisme), plus elle aura de chance de contribuer à la formation des cellules germinales {Nagy *et al.*, 1993}. Lors de la reproduction, un animal chimérique peut engendrer une progéniture génétiquement modifiée à la condition que, lors de la fécondation, la cellule germinale (ovule ou spermatozoide) participant à la création de l'embryon fasse parti du 1% des cellules germinales génétiquement modifiés.

Clonage (transfert embryonnaire) :

Le transfert nucléaire {Campbell *et al.*, 1996} est une technique qui permet de transférer le bagage génétique d'une cellule, peu importe le stade de son développement {Wilmut *et al.*, 1997}, à l'intérieur d'un ovule énucléé, c'est-à-dire vidé de son bagage génétique. En combinant les techniques de transformation de cellules en culture et de transfert embryonnaire, l'efficacité de la transgenèse a augmenté considérablement {Schnieke *et al.*, 1997}. La stratégie combinée consiste à modifier des cellules lors de leur passage en culture, à prendre le bagage génétique de l'une de ces cellules génétiquement modifiées pour l'insérer dans un ovule énucléé. L'animal résultant du développement de cet embryon ainsi créé sera formé de cellules dont le bagage génétique sera identique à celui de la cellule initiale génétiquement modifiée.

Liste des articles cités

1. Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A. & Wilmut, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* **380**, 64-66 (1996).

2. Capecchi, M.R. Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-1292 (1989).

3. Clark Aj, Burl S, Denning C & Dickinson P Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Research. 2000, 9: 4 5, 263 275; Many ref.* (2000).

4. Ghazizadeh, S. & Taichman, L.B. Virus-mediated gene transfer for cutaneous gene therapy. *Hum Gene Ther* **11**, 2247-2251 (2000).

5. Kaneda, Y. Improvements in gene therapy technologies. *Mol Urol* **5**, 85-89 (2001).

6. Lavitrano, M. et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* **57**, 717-723 (1989).

7. Martin, D.I. & Whitelaw, E. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays* **18**, 919-923 (1996).

8. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8424-8428 (1993).

9. Sato, M., Ishikawa, A. & Kimura, M. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible in vivo gene transfer system via epididymal spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **61**, 49-56 (2002).

10. Schnieke, A., Harbers, K. & Jaenisch, R. Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the alpha 1(I) collagen gene. *Nature* **304**, 315-320 (1983).

11. Schnieke, A.E. et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* **278**, 2130-2133 (1997).

12. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. & Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813 (1997).

13. Yamazaki, Y., Yagi, T., Ozaki, T. & Imoto, K. In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J Exp Zool* **286**, 212-218 (2000).

Liste des articles complémentaires consultés

1. Bernstein, E., Denli, A. M. & Hannon, G. J. The rest is silence. *Rna* **7**, 1509-21 (2001).

2. Bilbao, G., Feng, M., Rancourt, C., Jackson, W. H., Jr. & Curiel, D. T. Adenoviral/retroviral vector chimeras: a novel strategy to achieve high-efficiency stable transduction in vivo. *Faseb J* **11**, 624-34 (1997).

3. Brackett, B. G., Baranska, W., Sawicki, W. & Koprowski, H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 353-7 (1971).

4. Chan, A. W., Homan, E. J., Ballou, L. U., Burns, J. C. & Bremel, R. D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14028-33 (1998).

5. Co, D. O. et al. Generation of transgenic mice and germline transmission of a mammalian artificial chromosome introduced into embryos by pronuclear microinjection. *Chromosome Res* **8**, 183-91 (2000).

6. Etches, R. J. et al. Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken genome. *Poult Sci* **72**, 882-9 (1993).

7. Folger, K. R., Wong, E. A., Wahl, G. & Capecchi, M. R. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol* **2**, 1372-87 (1982).

8. Gandolfi, F. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Transgenic Res* **7**, 147-55 (1998).

9. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. & Ruddle, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7380-4 (1980).

10. Horan, R., Powell, R., McQuaid, S., Gannon, F. & Houghton, J. A. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch Androl* **26**, 83-92 (1991).

11. Houdebine, L. M. [Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals]. *Rev Fr Transfus Hemobiol* **36**, 49-72 (1993).

12. Houdebine Lm. Transgenic animals: generation and use. *Harwood academic publishers* (1997).

13. Houdebine Lm. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research. 2000, 9: 4 5, 305 320; Many ref.* (2000).

14. Inoue, K. et al. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differ Dev* **29**, 123-8 (1990).

15. Jaenisch, R. & Mintz, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1250-4 (1974).

16. Khillan, J. S. Chimeric animals and germline transmission. *Methods Mol Biol* **136**, 465-76 (2000).

17. Maione, B., Lavitrano, M., Spadafora, C. & Kiessling, A. A. Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev* **50**, 406-9 (1998).

18. Matzke, M. A., Mette, M. F. & Matzke, A. J. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* **43**, 401-15 (2000).

19. McWhir J, Garnsworthy Pc & Wiseman J. Practical applications of genetic engineering in animals. *Recent advances in animal nutrition 1998. 1998, 137 151; 12 ref. PUBLISHER INFORMATION: Nottingham University Press; Nottingham; UK* (1998).

20. Nagy, A. & Mar, L. Creation and use of a Cre recombinase transgenic database. *Methods Mol Biol* **158**, 95-106 (2001).

21. Nickoloff, J. A. & Reynolds, R. J. Electroporation-mediated gene transfer efficiency is reduced by linear plasmid carrier DNAs. *Anal Biochem* **205**, 237-43 (1992).

22. Niemann, H. & Kues, W. A. Transgenic livestock: premises and promises. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 277-93 (2000).

23. Perry, A. C. et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* **284**, 1180-3 (1999).

24. Schiestl, R. H. & Petes, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7585-9 (1991).

25. Seo, B. B. et al. Co-injection of restriction enzyme with foreign DNA into the pronucleus for elevating production efficiencies of transgenic animals. *Anim Reprod Sci* **63**, 113-22 (2000).

26. Sokol, D. L. & Murray, J. D. Antisense and ribozyme constructs in transgenic animals. *Transgenic Research* **5**, 363-371 (1996).

27. Stice, S. L., Strelchenko, N. S., Keefer, C. L. & Matthews, L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* **54**, 100-10 (1996).

28. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 2**, 1101-13 (1986).

29. Wakita, T. [Construction of HCV transgenic mice with Cre/loxP switching expression system]. *Uirusu* **48**, 9-18 (1998).

30. Wall, R. J. New gene transfer methods. *Theriogenology* **57**, 189-201 (2002).

31. Zimmer, A. & Gruss, P. Production of chimaeric mice containing embryonic stem (ES) cells carrying a homoeobox Hox 1.1 allele mutated by homologous recombination. *Nature* **338**, 150-3 (1989).