



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

RESTREINTE

20170

DP/ID/SER.A/1643  
19 avril 1993  
Original : FRANCAIS

78

PROGRAMME BIOTECHNOLOGIQUE DANS LE CADRE DE TÜBITAK  
GEBZE, TURQUIE

DP/TUR/87/042/11-03

TURQUIE

Rapport technique : Description et évaluation des activités développées\*

établi par le Gouvernement de la République de Turquie  
par l'Organisation des Nations Unies pour le développement industriel,  
organisation chargée de l'exécution pour le compte  
du Programme des Nations Unies pour le développement

d'après l'étude de M. Ricardo Cibotti,  
Consultant de l'ONUDI

Fonctionnaire en charge de la coordination : M. Arnaud Atger  
Service des industries chimiques

Organisation des Nations Unies pour le développement industriel  
Vienne

---

\* Document n'ayant pas fait l'objet d'une mise au point rédactionnelle.

**TABLE DES MATIERES**

	<b>PAGES</b>
- I) <b>Résumé</b> .....	2
- II) <b>Introduction</b> .....	3
- III) <b>Rapport d'activité</b> .....	4
A) <b>Analyse de la situation au début de la mission..</b>	4
B) <b>Les erreurs techniques</b> .....	4
C) <b>Les mises au point techniques</b> .....	4
D) <b>Les discussions scientifiques</b> .....	5
E) <b>Conclusion</b> .....	5
- IV) <b>Recommandations</b> .....	5
- <b>Annexes</b> .....	6
<b>Annexe A: Programme de spécialisation dans les</b> <b>techniques de production de souris Tg....</b>	6
<b>Annexe B: Liste du matériel et équipement proposé..</b>	7
<b>Annexe C: Commentaires de l'ONUDI sur le rapport</b> <b>de mission de l'expert</b> .....	8

I) RESUME DU RAPPORT DE LA MISSION EFFECTUEE PAR  
DR. R.CIBOTTI A TÛBITAK (DP/TUR/87/042/11-03)

La mission effectuée à Gebze (Turquie) du 24 Février au 11 Mars 1993 avait pour objectif de consolider les capacités technologiques de TÛBITAK dans le domaine de la production de souris transgéniques (Tg). Cette mission est la troisième effectuée à TÛBITAK avec des objectifs similaires, mais c'est la première effectuée sous la responsabilité du Dr. R. cibotti.

Dans le but d'accomplir rapidement et avec succès ma mission, mon approche fût la suivante:

- 1) analyser le travail déjà accompli par le personnel sur le terrain (staff-Tg) après deux missions ONUDI, afin d'évaluer quels étaient les aspects techniques à renforcer.
- 2) écouter attentivement l'analyse de la situation telle que décrite par les responsables du département de Biologie, et tenter d'expliquer ma démarche de travail.
- 3) après une synthèse approfondie des informations recueillies, proposer avec souplesse, une méthode de travail efficace, ayant des objectifs clairs, crédibles, réalistes et pouvant être atteints à court terme.
- 4) suivre chaque étape expérimentale en corrigeant et en analysant les erreurs commises par le personnel, en effectuant souvent les mises au point nécessaires.
- 5) informer les responsables du département au sujet de l'évolution de la mission.

Les recommandations principales que je tiens à formuler aux responsables du département de Biologie, après une connaissance précise de la situation sur le terrain sont les suivantes:

1) Sélectionner rigoureusement le staff-Tg en fonction des qualifications techniques et intellectuelles nécessaires en accord avec la complexité des technologies employées.

2) Poursuivre et approfondir la formation du personnel. Dans ce sens je propose de recevoir en stage de spécialisation à Paris sous les auspices de l'ONUDI, Benan Dinçtürk, Ph.D. (en poste à TÛBITAK depuis huit mois) ayant fait preuve d'excellentes aptitudes techniques et intellectuelles.

D'autre part, je suggère aux responsables de l'ONUDI, en charge du projet, de bien vouloir considérer une nouvelle échéance pour la finalisation des objectifs (phase de consolidation des acquis suggérée).

Le projet de production de souris transgéniques à TÛBITAK se trouve après cette troisième mission à nouveau relancé. Les recommandations du consultant ne sont destinées qu'à le consolider, il serait donc utile de les prendre en considération.

## II) INTRODUCTION :

Depuis cinq ans, les responsables et le staff du département de Biologie à TÖBITAK tentent de dominer la technologie de production de souris transgéniques (Tg). Ce département a pour principal objectif l'assimilation d'une série de techniques biotechnologiques. On peut citer comme autre exemple, la production d'anticorps recombinants. Ces technologies devront être principalement utilisées au service de la recherche appliquée dans les domaines de l'étude de la  $\beta$ -Thalassémie (maladie des hématies), ou bien en recherche fondamentale dans le domaine des gènes suppresseurs du cancer.

Le présent rapport est rédigé par Ricardo Cibotti, Ph.D., travaillant actuellement à l'Institut Pasteur de Paris dans l'Unité 277 de l'INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), sous la direction du Professeur Philippe Kourilsky. Ce rapport concerne la troisième mission référencée DP/TUR/87/042/11-03 effectuée à TÖBITAK (Gebze, Turquie) du 24 Février au 11 Mars 1993, dans le but de contribuer au transfert de la technologie de production de souris transgéniques. Précisons que seule cette dernière mission a été effectuée sous ma responsabilité.

Les résultats obtenus sont les suivants:

Les conditions technologiques optimales pour la production des souris Tg ont été assimilés par une partie du staff-Tg. Les erreurs observées aux différentes étapes de cette technologie ont été corrigées. Les conditions matérielles et d'équipement ont été évaluées et quelques requêtes sont formulées dans ce rapport.

Deux séminaires ont été tenus. Le premier lié à l'analyse des conditions optimales permettant l'obtention des souris Tg fut restreint au staff-Tg. Le second, relatif à l'étude au moyen de souris Tg de la tolérance immunitaire, fut délivré à l'ensemble du département de Biologie, et nous avons relevé avec beaucoup d'intérêt les questions très pertinentes soulevées par l'assistance constituée notamment par de brillants Post-Doc.

Ce dernier point est à souligner, car il constitue l'un des aspects très positifs observés au niveau du département, la présence de Ph.D. formés en Europe et aux USA constituant un extraordinaire potentiel humain.

Un stage de spécialisation dans le domaine de la transgénèse a été sollicité à l'Institut Jacques Monod à l'Université de Paris VII et à l'Institut PASTEUR de PARIS pour Benan DİNÇTÖRK, Ph.D. par les responsables du département. Je suis prêt à soutenir cette démarche auprès de l'Université de PARIS et de l'Institut PASTEUR, et je sollicite les responsables de l'ONUDI afin que cette requête soit prise en considération.

### III) RAPPORT D'ACTIVITE.

#### A) Analyse de la situation au début de la mission.

L'obtention des souris Tg peut être schématiquement divisée en cinq grandes étapes:

- 1) production du transgène à microinjecter.
- 2) collecte des oeufs de souris et leur sélection.
- 3) la microinjection au niveau du pronucleus des oeufs de souris.
- 4) la transplantation des oeufs de souris au niveau de femelles adoptives pseudogestantes.
- 5) le criblage des souriceaux nés afin de détecter l'intégration du transgène au niveau du génome, grâce aux techniques de Southern Blot et de PCR.

Le consultant a immédiatement détecté une série d'erreurs techniques au niveau de la troisième étape, pour ce qui concerne la microinjection des oeufs de souris. Par ailleurs il a constaté que les étapes "moléculaires" (la première et la dernière) et les étapes 2 et 4 étaient correctement effectuées.

#### B) Les erreurs techniques.

Ceux qui connaissent en profondeur la technologie de production de souris transgéniques savent que la microinjection des oeufs de souris est l'étape la plus difficile à dominer. En effet, il faut produire des instruments de microinjection performants. Les pipettes de microinjection doivent posséder une pointe d'un diamètre ne dépassant jamais le micromètre (Hogan et Lacy) car le pronucleus doit être injecté avec un volume de transgène ne dépassant pas les 2 pl. Il est donc nécessaire, de faire preuve d'une grande précision dans le maniement de l'étireuse de pipettes, appareil permettant de produire des instruments avec de telles caractéristiques.

D'autre part le dispositif de contrôle du positionnement des oeufs (seringue reliée à une pipette de soutien) du laboratoire Transgène à TÜBITAK est inadapté et à remplacer absolument (voir en ANNEXE B la liste du matériel demandé). La défaillance de ce système complique énormément le positionnement du pronucleus mâle au niveau du plan équatorial de l'oeuf de souris. En synthèse cette étape de microinjection n'était absolument pas assimilée par le staff-Tg.

#### C) Les mises au point techniques.

Le consultant a expliqué et réalisé la mise au point de l'étireuse de pipettes afin de produire des instruments adaptés aux contraintes imposés par le matériel biologique. Il a longuement expliqué comment évaluer les caractéristiques des aiguilles de microinjection et comment les moduler. Il a suivi l'évolution et la progression de tous ces aspects sous l'angle de l'assimilation de la formation par le staff-Tg. Il a par la suite changé le

dispositif de contrôle du positionnement des oeufs avec les moyens disponibles sur place (ce qui malheureusement est loin d'être suffisant). Par la suite, l'explication de la méthode nécessaire pour microinjecter le pronucleus avec succès a été donnée, ainsi bien évidemment que le guidage de l'évolution du staff-Tg dans ce domaine. Il a suivi jour après jour, les progrès effectués par une partie du staff, en assistant et intervenant rapidement lorsque des "pannes" se déclaraient.

D'autre part, le consultant a suivi les expériences de criblages de souriceaux. Il a proposé des méthodes de travail nouvelles et plus rapides, notamment la PCR, et il a rédigé les protocoles de travail en analysant tous les facteurs sensibles. Deux expériences ont été effectuées sous son contrôle. Il a décidé par ailleurs, grâce aux communications par ordinateur, de continuer de suivre les futures expériences.

#### **D) Les discussions scientifiques.**

Des discussions scientifiques ont été tenues principalement avec les Ph.D. travaillant à TÜBITAK et notamment avec Benan Dinçtürk. Les sujets abordés étaient liés à la création de modèles biologiques en utilisant des souris transgéniques. Plusieurs possibilités sont en cours d'analyse et seront développées au futur.

#### **E) Conclusion.**

Des progrès considérables ont été réalisés par une partie du staff. Les erreurs effectuées ont été corrigées. Il est maintenant établi, pour le personnel formé, dans quelles conditions les expériences de microinjections et de criblages doivent être effectuées afin d'obtenir rapidement des souris Tg.

#### **IV) RECOMMANDATIONS.**

Les recommandations principales que je tiens à formuler auprès des responsables du département de Biologie de TÜBITAK, après une connaissance précise de la situation sur le terrain sont les suivantes:

1) Que l'accent soit mis sur une sélection très rigoureuse du staff-Tg en appelé à développer ces techniques de pointe, fonction des qualifications techniques et intellectuelles nécessaires en accord avec la complexité des technologies employées.

2) Poursuivre et approfondir la formation du personnel. Dans ce sens, je propose de recevoir en stage de spécialisation à Paris et sous les auspices de l'ONUDI, Benan Dinçtürk, Ph.D., en poste à TÜBITAK depuis huit mois. Celle-ci a fait preuve d'excellentes conditions techniques et intellectuelles.

D'autre part, je suggère aux responsables de l'ONUDI, en charge du projet, de bien vouloir considérer une nouvelle échéance pour la finalisation des objectifs (phase de consolidation des acquis suggérée).

## ANNEXE A

**Programme de spécialisation dans les techniques de  
production de souris transgéniques:**

Un stage de 2 à 3 semaines est proposé au Dr. Benan DİNÇTÜRK afin de consolider sa formation dans les techniques de microinjection d'oeufs de souris. Ce stage pourra-être effectué à l'Institut J. MONOD dépendant de l'Université de PARIS VII et à l'Institut PASTEUR de PARIS. Ce stage sera principalement réalisé dans le Laboratoire de Régulations Immunitaires dirigé par C. KANELLOPOULOS. Les dates proposés sont les suivantes; du 1er au 30 Avril 1993 ou bien du 1er au 30 Juillet 1993.



## ANNEXE B

**Matériel et équipement proposé par le consultant:**

Objectif Zeiss 40X pour microscope Zeiss 35M, prix approximatif 20 000 FF. Il est essentiel d'acheter ce produit, car l'objectif Zeiss 20X n'est pas suffisamment puissant pour réaliser correctement les microinjections.

Seringue Hamilton de 1ml, pour dispositif de soutien des oeufs (Holdings pipettes). Il est de même important et même absolument nécessaire d'améliorer le système de soutien des oeufs (prix approximatif 200 FF).

ANNEXE CCommentaires techniques du Backstopping Officer,  
sur la base du travail du Dr. R. Cibotti

Le rapport décrit le travail effectué par l'expert durant sa courte mission à Gebze.

Dr. Cibotti a effectué un état de la situation pour ce qui concerne le développement de la technologie transgénique et il a recommandé un certain nombre d'actions pour un complément d'assistance technique effectuée sous l'égide du PNUD/ONUDI.

Rappelons ici qu'un animal transgénique est un animal dans le génome duquel un gène étranger a été inséré au stade de l'oeuf ou de l'embryon. L'oeuf est réimplanté dans l'utérus d'une femelle de la même espèce. Ces séquences étrangères, appelées transgènes, sont ensuite transmises d'une façon stable d'une génération à l'autre. Cette technologie d'introduction de gènes dans la lignée germinale de mammifères constitue l'une des avancées majeures de la biologie. Cela fait maintenant dix ans que les premières souris transgéniques "supermice", exprimant le gène de l'hormone de croissance, ont fait la couverture de la revue Nature. **Depuis, créer une souris transgénique, demeure l'objectif de nombreux laboratoires, mais les obstacles techniques demeurent nombreux dans le développement de cette technologie sophistiquée.** Ces dernières années, les publications scientifiques relatant l'utilisation d'animaux transgéniques se sont multipliées. Cette technologie a permis, entre autres, d'identifier les éléments impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, de dévoiler un peu plus les mécanismes moléculaires responsables de développement et de la différenciation d'un organisme, de mieux comprendre l'action d'oncogènes dans la carcinogénèse. En effet, ces processus physiologiques complexes ne peuvent être correctement étudiés qu'à travers la complexité d'un organisme vivant. De plus, la technologie des transgéniques offre des possibilités intéressantes pour l'étude des maladies humaines. Les progrès récents de la biologie moléculaire laissent présager la création, dans un avenir proche, de modèles murins de maladies génétiques humaines et, dans un avenir plus lointain, l'utilisation de **modèles animaux plus appropriés car phyllogénétiquement plus proches de l'homme. Ces modèles animaux expérimentaux sont indispensables non seulement pour la compréhension de la maladie, mais aussi pour la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.**

Les grandes lignes des propositions et recommandations suggérées par Dr. Cibotti ont été exposées en détail lors de sa mission ; des solutions concrètes sont d'ailleurs incluses dans ce rapport, en particulier pour ce qui a trait aux actions de formation indispensables à la réussite de ce projet et permettant de solutionner en partie les problèmes mis à jour.

Enfin, sur le plan d'une utilisation à moyen ou long terme par TUBITAK des

transgéniques, il convient de souligner que les applications de celles-ci pourront aller de l'étude de l'expression génétique en recherche fondamentale jusqu'à la mise au point de modèles animaux pour des maladies humaines ou encore à leur utilisation en production.

A mentionner aussi que dans le domaine de l'étude de la régulation de l'expression génétique, les transgéniques permettent de comprendre les bases de l'activation des gènes au cours du développement, notamment de localiser les éléments responsables de la spécificité tissulaire et temporelle de l'expression des gènes. La plupart des souris transgéniques obtenues par micro-injection expriment le transgène d'une manière appropriée par rapport aux éléments de régulation le contrôlant.

Grâce aux transgéniques, l'étendue et la localisation des séquences jouant un rôle dans l'expression génétique ont pu être identifiées, révélant une grande variation d'un gène à l'autre. Les régions promotrices sont contenues dans quelques centaines de pb (gènes de l'insuline et de l'élastase) à plus de 10 kb (gènes de l'albumine et de l' $\alpha$ -fétoprotéine). Des éléments régulateurs peuvent être situés en 3' du site d'initiation de la transcription (gène de la  $\beta$ -globine).

En matière d'étude du cancer, la stratégie souvent utilisée pour les transgéniques, consiste à étudier les conséquences de l'expression d'oncogènes dans un animal, notamment le spectre des tissus susceptibles de transformation tumorale pour chaque oncogène, leur effet sur la croissance et l'effet de coopération. En plaçant des oncogènes sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un type cellulaire, des tumeurs apparaissent dans les cellules où il est actif. Les souris transgéniques, véritables modèles animaux pour certains cancers, constituent un outil intéressant pour les essais de médicaments potentiels.

Modèles de maladies génétiques, les modèles animaux de maladies génétiques humaines étaient obtenus au hasard jusqu'à présent. Il est maintenant possible de produire de tels modèles, soit par mutation insertionnelle, surexpression d'une protéine mutante ou recombinaison homologue. L'insertion d'un transgène rétroviral dans le gène du collagène de type I, par exemple, a permis de reproduire dans la souris un phénotype similaire à celui de l'ostéogenèse imparfaite. La surexpression d'une protéine toxique ou mutante capable d'inhiber la fonction d'un gène, peut aussi permettre de reproduire un état maladif.

En résumé, nous pensons que les travaux de TÜBITAK et l'orientation donnée au projet demeure un "challenge" extrêmement intéressant. Le transfert de gènes offrant de multiples possibilités dans tous les domaines de la recherche: fondamentale, pharmaceutique et médicale. La perspective d'obtenir des modèles animaux expérimentaux pour toute maladie humaine, mais aussi l'espoir de guérir certaines maladies par thérapie génique se rapproche à grand pas.