

INRAE

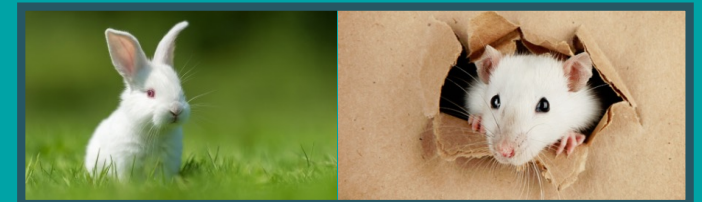
université
PARIS-SACLAY

EnVA
École nationale vétérinaire d'Alfort

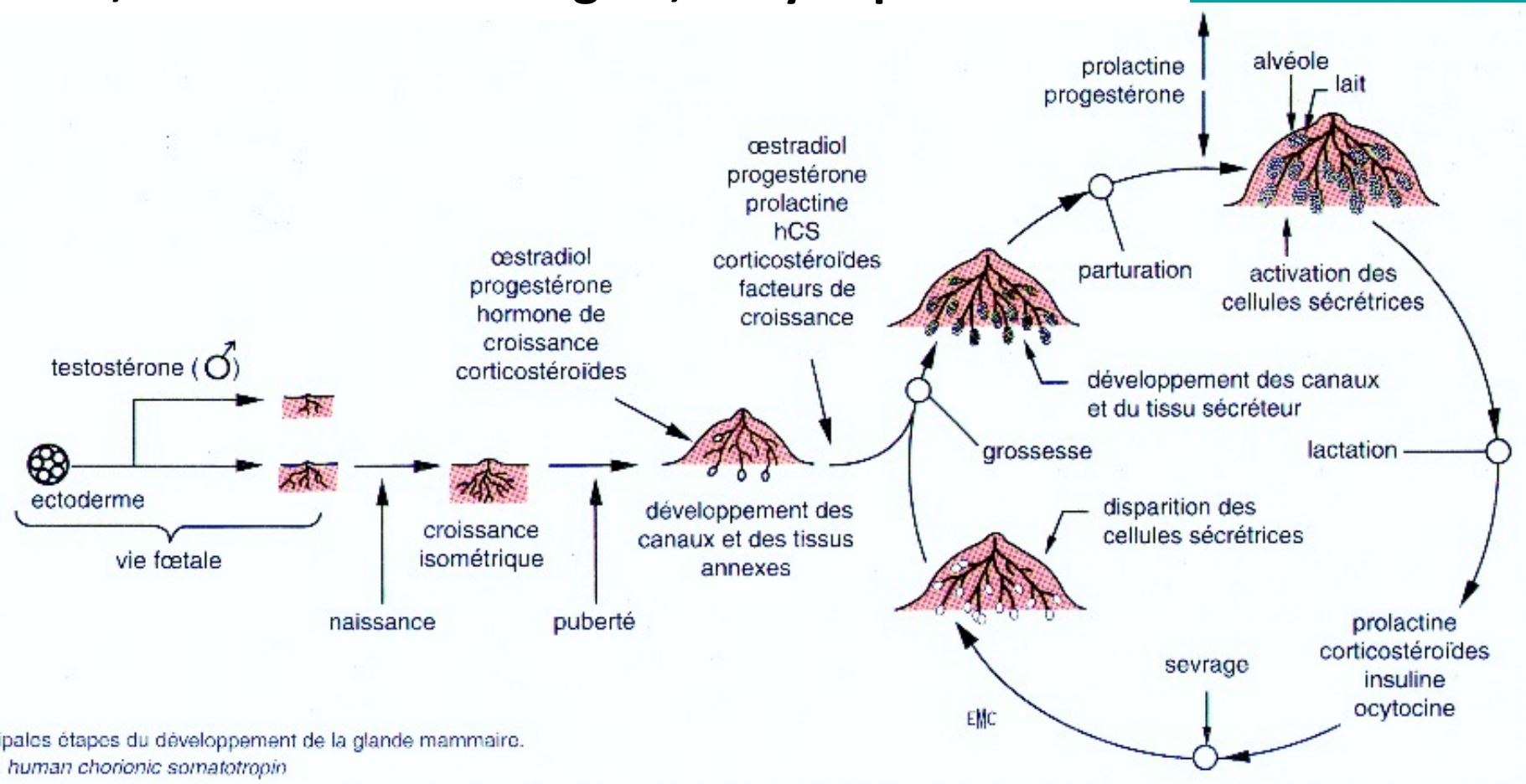
SAPS
Sciences Animales
PARIS SACLAY

De la glande mammaire à la transgénèse : Louis-Marie Houdebine, un biochimiste au cœur du vivant

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

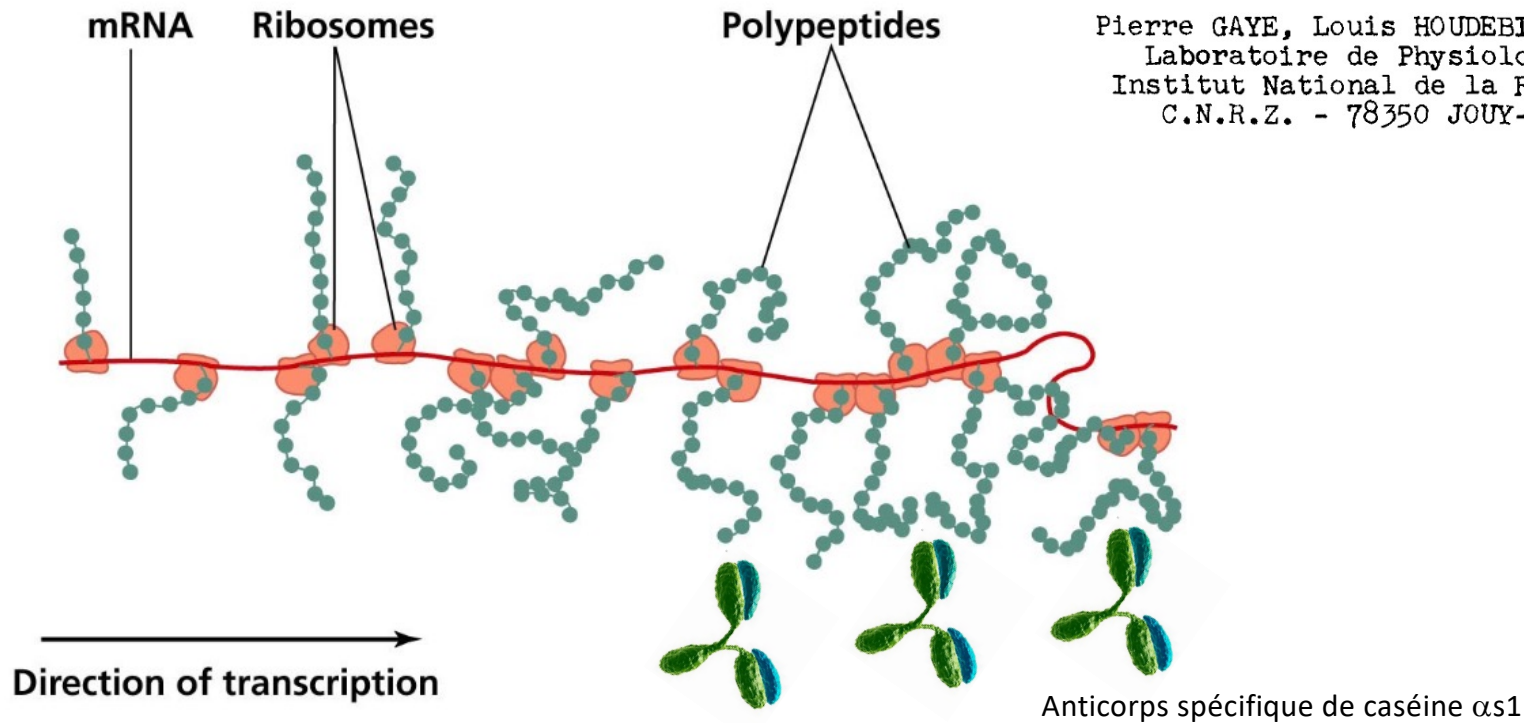


La glande mammaire, un développement dès la vie foetale, hormonalement régulé, et cyclique



ISOLATION OF ACTIVE MESSENGER RNA FOR α_s CASEIN
FROM BOUND POLYRIBOSOMES OF MAMMARY GLAND

Pierre GAYE, Louis HOUEBINE and Robert DENAMUR
Laboratoire de Physiologie de la Lactation
Institut National de la Recherche Agronomique
C.N.R.Z. - 78350 JOUY-EN-JOSAS - FRANCE



**La glande mammaire, organe capable de synthétiser
des quantités massives de protéines**



Published in final edited form as:

Nature. 1982 December 16; 300(5893): 611–615.

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes

Richard D. Palmiter^{*}, Ralph L. Brinster[†], Robert E. Hammer[†], Myrna E. Trumbauer[†], Michael G. Rosenfeld[‡], Neal C. Birnberg[§], and Ronald M. Evans[§]



« This approach has implications for studying the biological effects of growth hormone, as a way to accelerate animal growth, as a model for gigantism, as a means of correcting genetic disease, and as a method of farming valuable gene products. »



INRAE

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

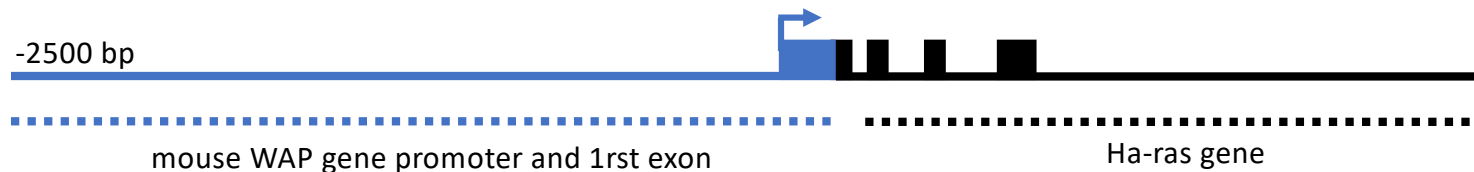
Plusieurs équipes publient des résultats très encourageants en utilisant les promoteurs des gènes de protéines du lait de souris : WAP (Whey Acidic Protein) ou caséines

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 84, pp. 1299–1303, March 1987
Developmental Biology

Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: Tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice

(whey acidic protein gene/whey acidic protein-ras transgene/Y chromosome integration/mammary gland tumors/salivary gland tumors)

ANNE-CATHERINE ANDRES*, CORA-ANN SCHÖNENBERGER*, BERND GRONER*[†], LOTHAR HENNIGHAUSEN[‡],
MARIANNE LEMEUR[§], AND PIERRE GERLINGER[§]



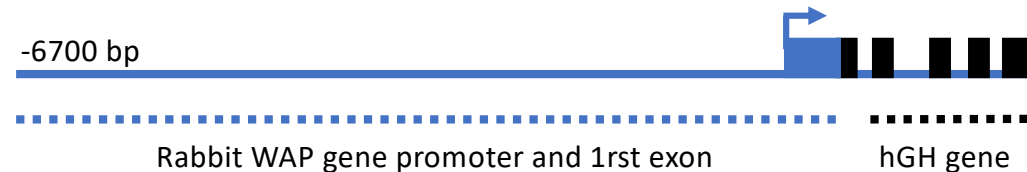
Quelques milliers de paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription suffisent pour conférer une expression spécifique de la glande mammaire et uniquement pendant la lactation

Il faut utiliser les promoteurs des gènes des protéines du lait!

Il faut isoler chez le lapin les promoteurs de gènes de protéines du lait

- Isoler les cDNA
- Isoler les gènes, cartographier les régions : les enzymes de restriction, seules possibilités pour isoler et sous-cloner un fragment de gène
- Utiliser ces fragments en transgénèse

Chez la souris : utilisation de plusieurs milliers de paires de bases de promoteur du gène de la **WAP de lapin**



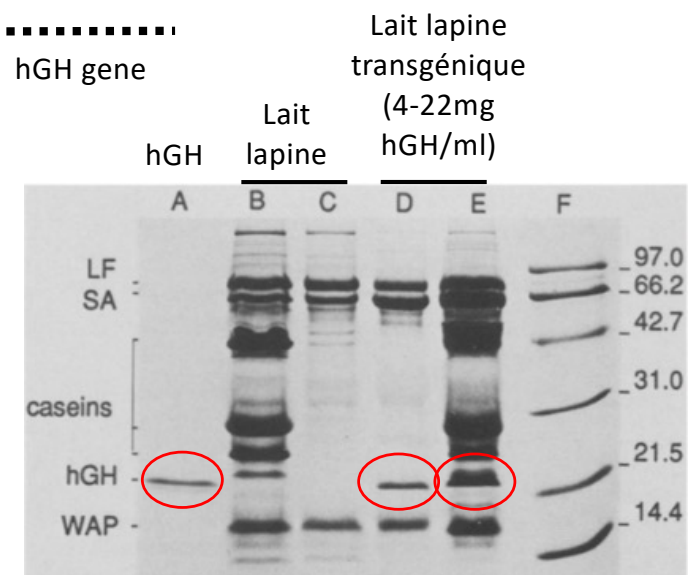
Transgenic Research 3, 79-89 (1994)

High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland

EVE DEVINOY^{*1}, DOMINIQUE THÉPOT¹, MARIE-GEORGES STINNAKRE¹, MARIE-LOUISE FONTAINE¹, HENRI GRABOWSKI¹, CLAUDINE PUISSANT¹, ANDRÉA PAVIRANI² and LOUIS-MARIE HOUEBINE¹

¹Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy en Josas Cedex, France (Fax: +33-1 34 65 22 73)

²Transgène S.A., 11 rue de Molsheim, 67082 Strasbourg Cedex, France



Il faut isoler chez le lapin les promoteurs de gènes de protéines du lait

- Isoler les cDNA
- Isoler les gènes, cartographier les régions : les enzymes de restriction, seules possibilités pour isoler et sous-cloner un fragment de gène
- Utiliser ces fragments en transgénèse

Chez la souris : utilisation de plusieurs milliers de paires de bases de promoteur du gène de la **WAP de lapin**

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
27.08.2003 Bulletin 2003/35

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/00**, C12N 15/85,
C12N 15/18, C12N 5/10,
A01K 67/027, C12N 15/12,
C07K 14/00

(21) Numéro de dépôt: **92401635.5**

(22) Date de dépôt: **12.06.1992**

(54) **Production d'une protéine d'intérêt dans le lait d'un mammifère transgénique**



INRAE

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

Il faut isoler chez le lapin les promoteurs de gènes de protéines du lait

- Isoler les cDNA
- Isoler les gènes, cartographier les régions : les enzymes de restriction, seules possibilités pour isoler et sous-cloner un fragment de gène
- Utiliser ces fragments en transgénèse

Chez la souris : utilisation de plusieurs milliers de paires de bases de promoteur du gène de la WAP de lapin

Chez le lapin : il faut mettre en place la méthode de **production de lapins génétiquement modifiés**

Uniquement par microinjection de l'ADN dans l'embryon unicellulaire

Pas de cellules ES utilisables pour la manipulation génétique chez cette espèce

C. R. Acad. Sci. Paris, t. 311, Série III, p. 275-280, 1990

275

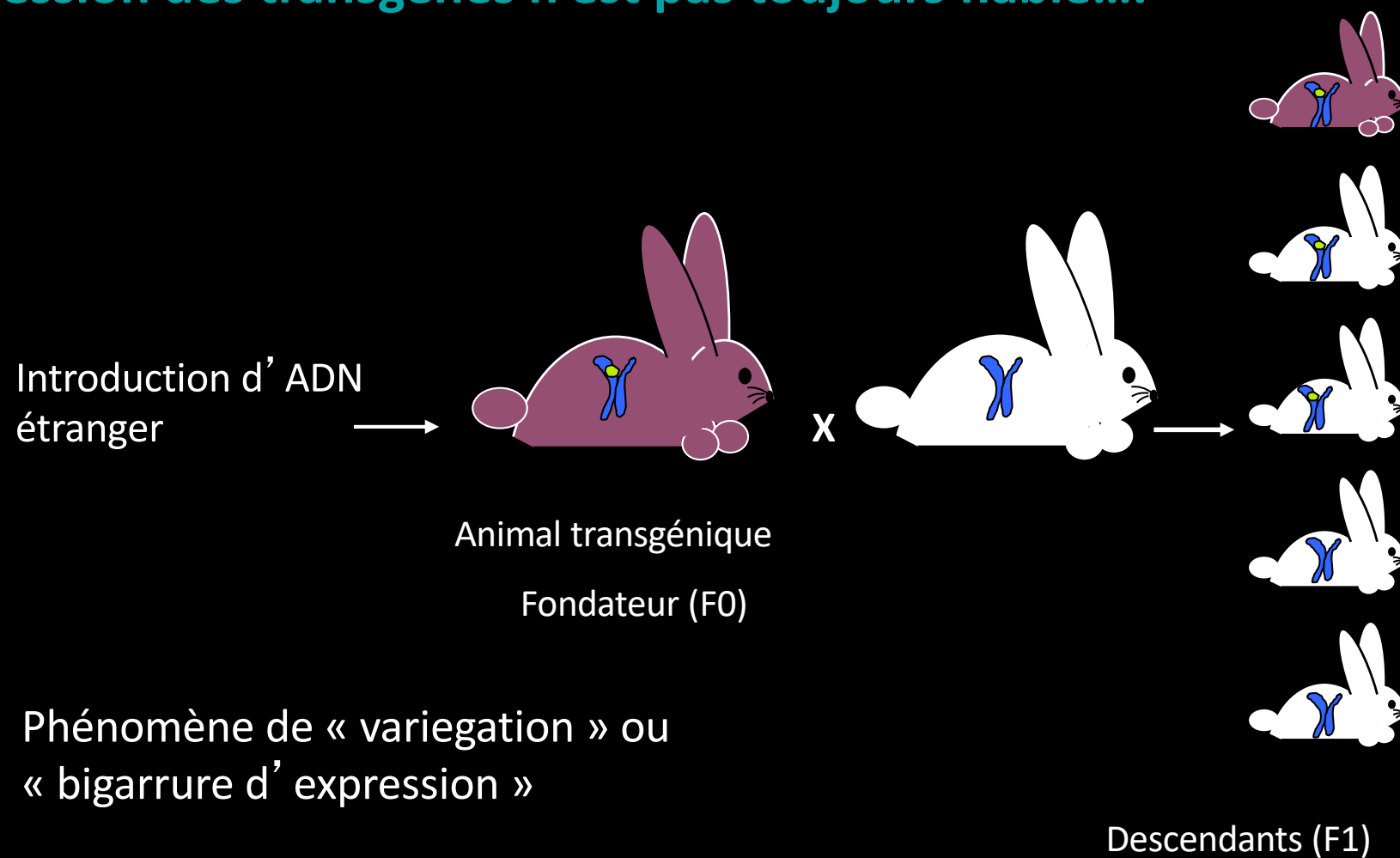
Biologie moléculaire/Molecular Biology

La production de protéines humaines dans le sang d'animaux transgéniques

Micheline MASSOUD, Rainer BISCHOFF, Wilfried DALEMANS, Hervé POINTU, Joe ATTAL, Huguette SCHULTZ, Daniel CLESSE, Marie-Georges STINNAKRE, Andrea PAVIRANI et Louis-Marie **HOUDEBINE**

Résumé – Le gène de l' α 1-antitrypsine humaine a été micro-injecté dans des embryons de lapin. Une lignée d'animaux transgéniques a ainsi pu être établie. L' α 1-antitrypsine humaine est présente dans le sang de tous les animaux à la concentration d'environ 1 mg/ml de plasma. La protéine humaine garde son activité et elle peut être séparée de l' α 1-antitrypsine de lapin. Cette expérience démontre qu'il est possible d'utiliser dans certains cas le sang d'animaux transgéniques comme source de protéines recombinantes.

L'expression des transgènes n'est pas toujours fiable....



L'expression des transgènes est aléatoire

- Expression non stable du transgène avec les générations
- Expression variable du transgène selon le site d'intégration

Reprod Nutr Dev (1996) 36, 555-563
© Elsevier/INRA

555

- Fuites d'expression

Original article

The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits

M Massoud ¹, J Attal ², D Thépot ², H Pointu ², MG Stinnakre ³,
MC Théron ², C Lopez ⁴, LM Houdebine ^{2*}

¹ Unité d'endocrinologie de l'embryon;

² Unité de différenciation cellulaire;

³ Laboratoire de génétique biochimique, Inra, 78352 Jouy-en-Josas cedex;

⁴ Institut national de la transfusion sanguine, 6, rue Alexandre-Cabanel, 75015 Paris, France

(Received 25 April 1996; accepted 26 July 1996)

Il faut améliorer les constructions!



INRAE

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

Des solutions existent!

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 88, pp. 478–482, January 1991
Genetics

Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice (gene expression/transgenic mice)

RICHARD D. PALMITER*, ERIC P. SANDGREN†, MARY R. AVARBOCK†, D. DIANE ALLEN*,
AND RALPH L. BRINSTER†

*Howard Hughes Medical Institute, Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, WA 98195; and †Laboratory of Reproductive Physiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104

Contributed by Richard D. Palmiter, October 11, 1990

Cell, Vol. 51, 975–985, December 24, 1987, Copyright © 1987 by Cell Press

Position-Independent, High-Level Expression of the Human β -Globin Gene in Transgenic Mice

Frank Grosveld, Greet Blom van Assendelft,
David R. Greaves, and George Kollias
Laboratory of Gene Structure and Expression
National Institute for Medical Research
The Ridgeway, Mill Hill
London NW7 1AA, England

Using MEL and K562 cells we have now identified four separate regulatory elements required for appropriate expression of the human β -globin gene: an acting globin-specific promoter element, a negative regulatory promoter element, and a downstream regulatory sequences (enhancers), or the gene and one approximately 800 bp downstream.

Il faut les mettre en œuvre rapidement...!!!



INRAE

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

Il faut répartir les travaux au sein de l'équipe

La production d'animaux génétiquement modifiés

- Création d'un atelier de production de souris et de lapins génétiquement modifiés au sein de l'équipe INRA de Jouy
- Collaboration avec La société TRANSGENE SA (Strasbourg, A Pavirani) puis création de BIOPROTEIN technologies (1998)

LMH, JPR, Marc LeBozec



INRAe

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

Il faut répartir les travaux au sein de l'équipe

Les études fondamentales -1

- Améliorer l'efficacité des transgènes = construire un « bon » transgène à l'aide des éléments régulateurs déjà identifiés

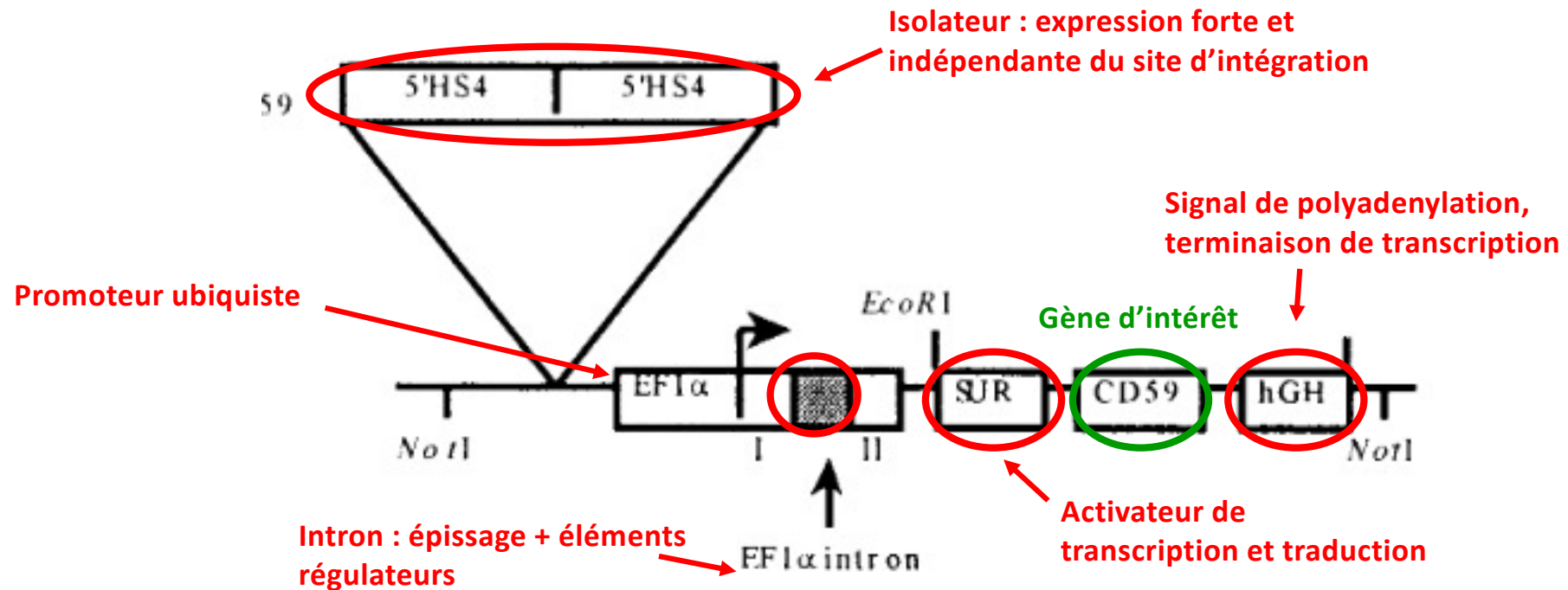


INRAE

Titre de la présentation

Date / information / nom de l'auteur

► le transgène = une somme de plusieurs éléments régulateurs autour du gène d'intérêt



Transgenic Research 8: 223–235, 1999.
© 1999 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

223

Association of the 5'HS4 sequence of the chicken β -globin locus control region with human EF1 α gene promoter induces ubiquitous and high expression of human CD55 and CD59 cDNAs in transgenic rabbits

Frédérique Taboit-Dameron¹, Benoit Malassagne², Céline Viglietta¹, Claudine Puissant¹, Mathieu Leroux-Coyau¹, Christiane Chéreau³, Joé Attal¹, Bernard Weill³ & Louis-Marie Houdebine^{1,*}

¹Laboratoire de Différenciation Cellulaire, Institut National de Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

²Laboratoire de Recherche Chirurgicale, Faculté Cochin-Port Royal, Université Paris V, France

³Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Cochin-Port Royal, Université Paris V, France

FEBS Letters 392 (1996) 220–224

FEBS 17422

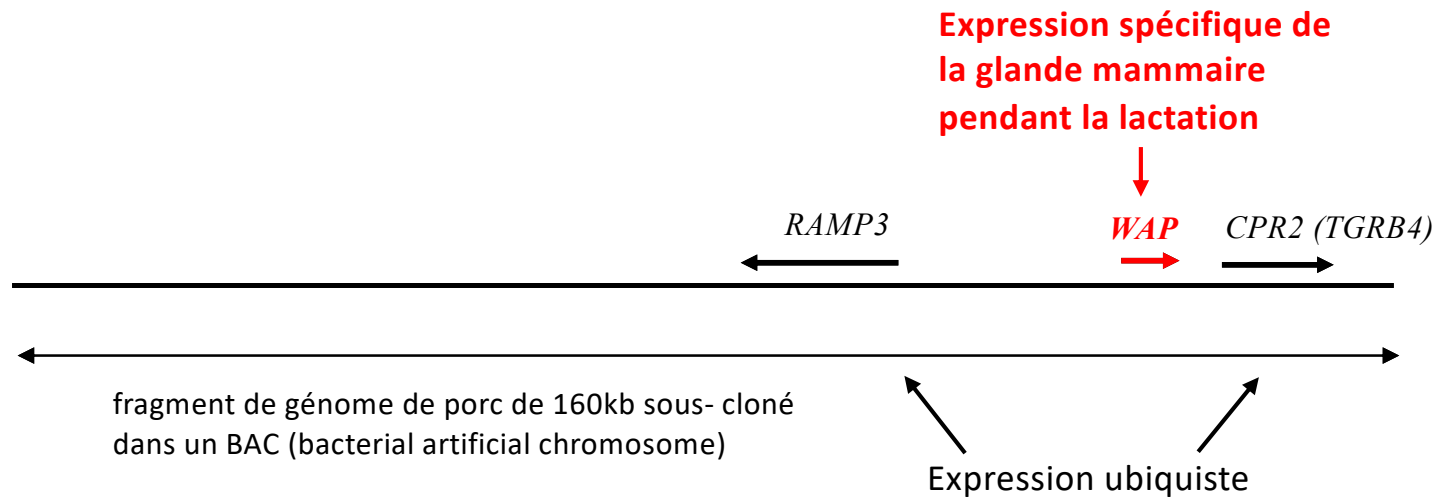
The RU5 ('R') region from human leukaemia viruses (HTLV-1) contains an internal ribosome entry site (IRES)-like sequence

Joé Attal^a, Marie-Claire Théron^a, Frédérique Taboit^a, Marco Cajero-Juarez^a, Guy Kann^b, Philippe Bolifraud^b, Louis Marie Houdebine^{a,*}

^aUnité de Différenciation Cellulaire, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

^bUnité de Recherche sur l'Endocrinologie du Placenta et la Périnatalité, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

➤ le transgène = un grand fragment d'ADN qui regroupe les éléments régulateurs de l'environnement du gène au sein du génome



➤ Toutes les lignées expriment le transgène

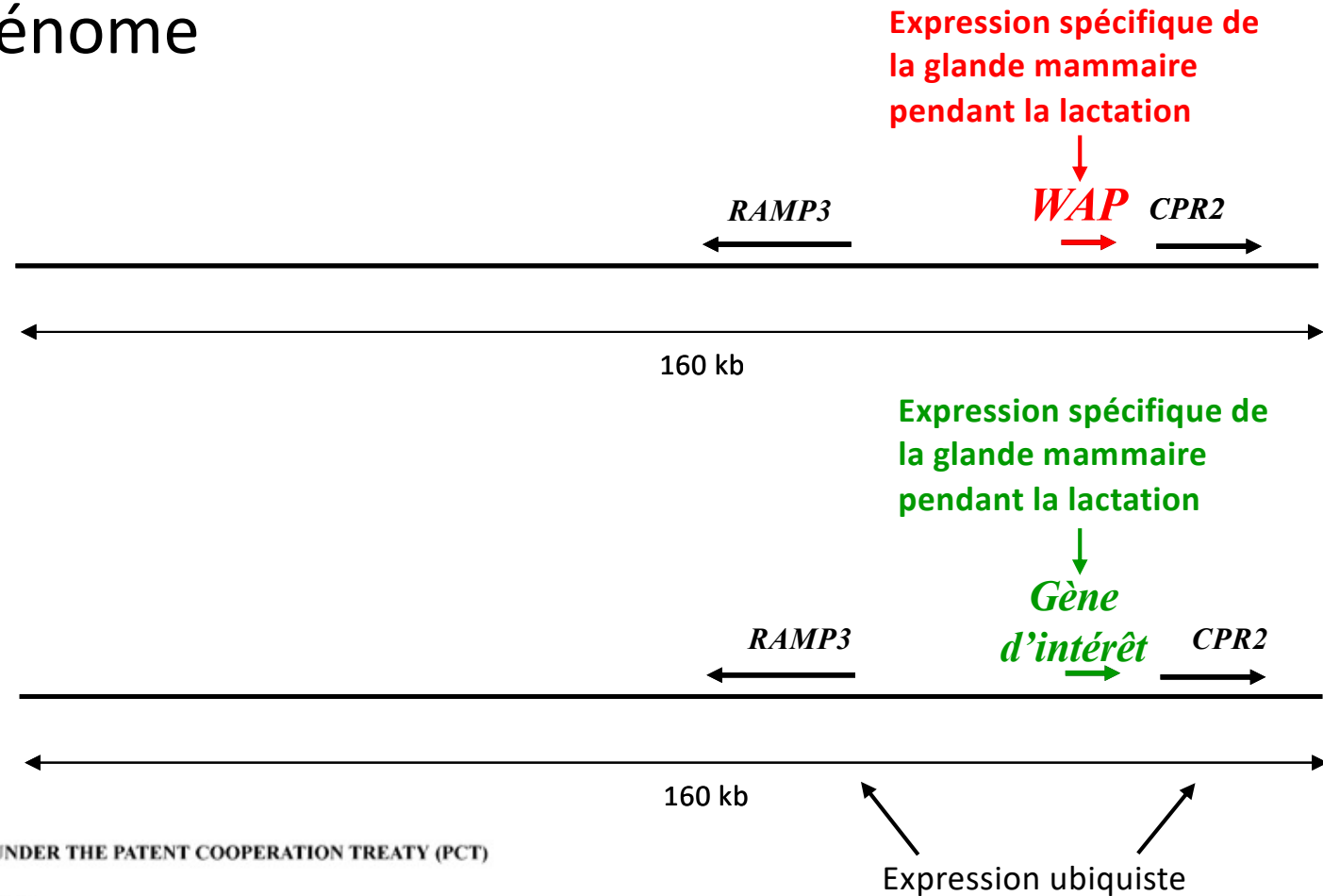
➤ Le niveau d'expression est proportionnel au nombre de copies intégrées

MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 63:161–167 (2002)

Position-Independent and Tissue-Specific Expression of Porcine Whey Acidic Protein Gene From a Bacterial Artificial Chromosome in Transgenic Mice

SYLVIE RIVAL-GERVIER,* CÉLINE VIGLIETTA, CAROLINE MAEDER, JOE ATTAL, AND LOUIS-MARIE HOUEBINE
Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Jouy-en-Josas, France

➤ le transgène = un grand fragment d'ADN qui regroupe les éléments régulateurs de l'environnement du gène au sein du génome



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



PCT



(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

(10) International Publication Number
WO 02/052023 A2

Position-independent and tissue specific expression of a transgene in milk of
transgenic animals

Quelques principes pour construire des gènes chimères qui feront de « bons » transgènes



Transgenic Research 9: 305–320, 2000.

© 2000 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

305

Transgenic animal bioreactors

Louis Marie Houdebine

Unité de Biologie du Développement et Biotechnologie, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France, Tél.: 33 1 34 65 25 40; Fax: 33 1 34 65 22 41; E-mail: houdebine@biotec.jouy.inra.fr

Key words: Recombinant proteins, transgenic



Journal of Biotechnology 98 (2002) 145–160



www.elsevier.com/locate/jbiotec

The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression

Louis-Marie Houdebine *

Biologie du Développement et Biotechnologies, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy en Josas Cedex, France

Received 10 July 2001; received in revised form 28 January 2002; accepted 11 February 2002



INRA

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

Les études fondamentales -2

► Analyse du fonctionnement des promoteurs de gène

La littérature regorge de publications qui décrivent les facteurs de transcription impliqués

Le laboratoire voisin de Jean Djiane étudie la prolactine et les voies de signalisation induites par l'action de cette hormone au niveau de ses récepteurs dans la cellule mammaire

Les thèmes des recherches des deux laboratoires sont donc très complémentaires

Il faut s'investir dans ce domaine!

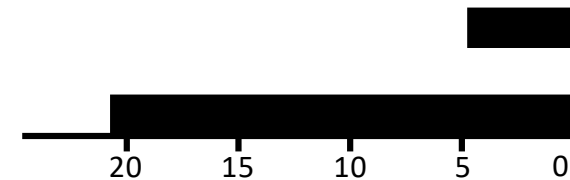
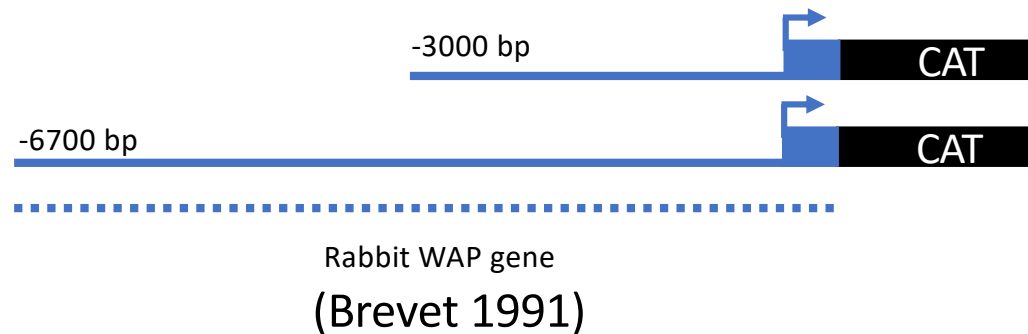


INRAE

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

Les études fondamentales -2

- Analyse du fonctionnement des promoteurs de gène : trouver les éléments régulateurs dans l'environnement des gènes des protéines du lait



Expression du gène CAT dans les cellules primaires mammaires de lapines transfectées

Molecular and Cellular Endocrinology, 81 (1991) 185–193
© 1991 Elsevier Scientific Publishers Ireland, Ltd. 0303-7207/91/\$03.50

185

MOLCEL 02613

Hormone responsive elements within the upstream sequences of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene direct chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter gene expression in transfected rabbit mammary cells

E. Devinoy, R. Maliénou-N'Gassa, D. Thépot, C. Puissant and L.M. Houdebine

Unité de Différenciation Cellulaire, Institut National de la Recherche Agronomique, 78 352 Jouy-en-Josas, France

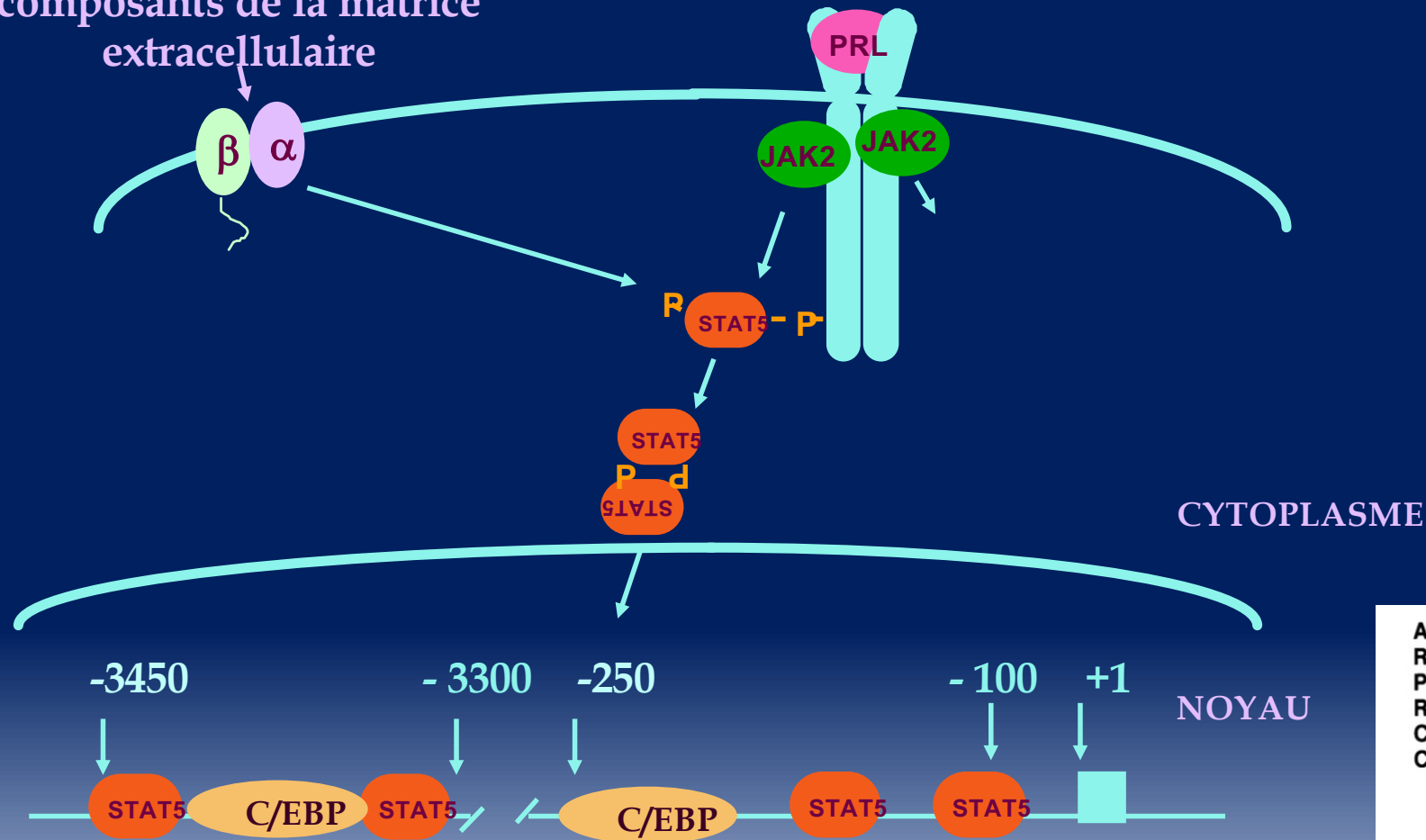
(Received 5 April 1991; accepted 2 July 1991)

Il n'existe pas de lignée de cellules mammaires capables de synthétiser des protéines du lait

L'isolement et la Transfection des cellules primaires mammaires sont loin d'être aisées

Voies de transduction induites par les hormones lactogènes et la matrice extracellulaire : activation du facteur STAT5

composants de la matrice extracellulaire



A Combination of Distal and Proximal Regions Is Required for Efficient Prolactin Regulation of Transfected Rabbit α_{s1} -Casein Chloramphenicol Acetyltransferase Constructs

Sandra Pierre, Geneviève Jolivet, Eve Devinoy, and Louis-Marie Houdebine

Unité de Différenciation Cellulaire
Institut National de la Recherche Agronomique
78352 Jouy-en-Josas, France

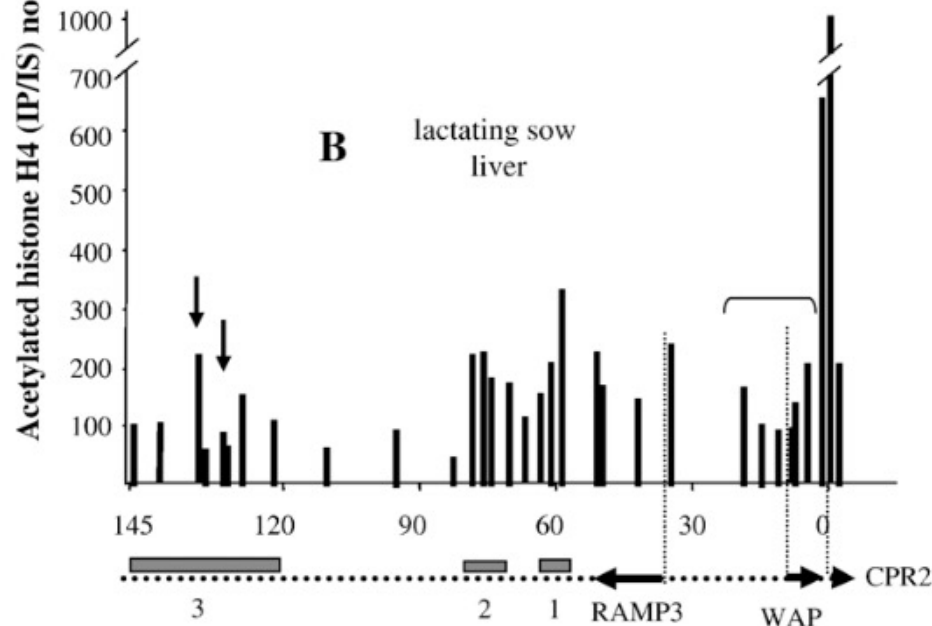
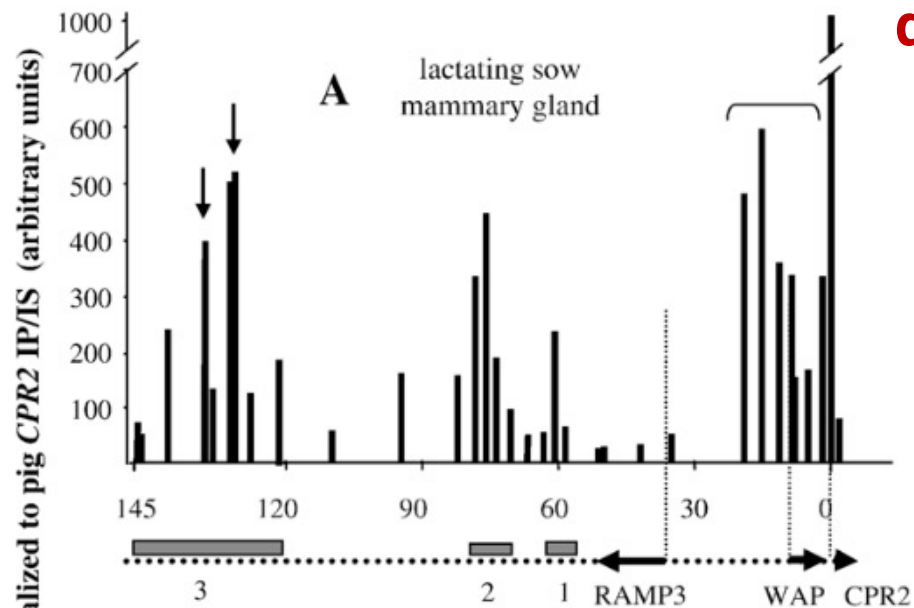
In the rabbit, α_{s1} -casein is the major casein secreted in the milk. Transcription of the α_{s1} -casein gene is factor-binding site 1720-1730, 1994)

INRAE

Hommage à Louis-Marie Houdebine
Geneviève Jolivet

La manipulation des grands fragments d'ADN est loin d'être aisée

Analyse de la structure de la chromatine pour caractériser des régions régulatrices



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Gene 401 (2007) 97–107

GENE
www.elsevier.com/locate/gene

Distal control of the pig whey acidic protein (WAP) locus in transgenic mice

Soraya Saidi^{a,1}, Sylvie Rival-Gervier^{a,1,2}, Nathalie Daniel-Carlier^a, Dominique Thépot^a,
Caroline Morgenthaler^a, Céline Viglietta^a, Sonia Prince^a, Bruno Passet^b,
Louis-Marie Houdebine^a, Geneviève Jolivet^{a,*}

^a INRA, UMR1198 CNRS-ENVA Biologie du développement et reproduction, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas, France

^b Laboratoire de génétique biochimique et de cytogénétique, UR 339, INRA, 78350, Jouy-en-Josas, France

Les autres projets abordés au laboratoire de LM Houdebine

► Recherches sur les molécules lactogènes issues de plantes

Reprod. Nutr. Develop. (1989) 29, 139-146
© Elsevier/INRA

139

Article de recherche

Mise en évidence d'un facteur stimulant la sécrétion de prolactine et de l'hormone de croissance dans les drèches de brasserie

L. Sawadogo, H. Sepehri et L. M. Houdebine

Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Unité de différenciation cellulaire, INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France

► Etudes des *protein Kinase* mammaires, activées par la prolactine

Biochemical Pharmacology, Vol. 52, 1719-1727, 1996.
Copyright © 1996 Elsevier Science Inc.



ISSN 0006-2952/96/\$15.00 + 0.00
PII S0006-2952(96)00523-0

The Effect of Prolactin on Casein Kinase II, MAP Kinase and PKC in Rabbit Mammary Cells and Nb₂ Rat Lymphoid Cells

Vanio Mitev, Mahasti Bayat-Sarmadi,
Mustapha Lemnaouar, Claudine Puissant and Louis-Marie Houdebine*
UNITÉ DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE, INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE ARGONOMIQUE, 78352 JOUY EN JOSAS, FRANCE

► Tentatives d'immortalisation de cellules mammaires



INRAE

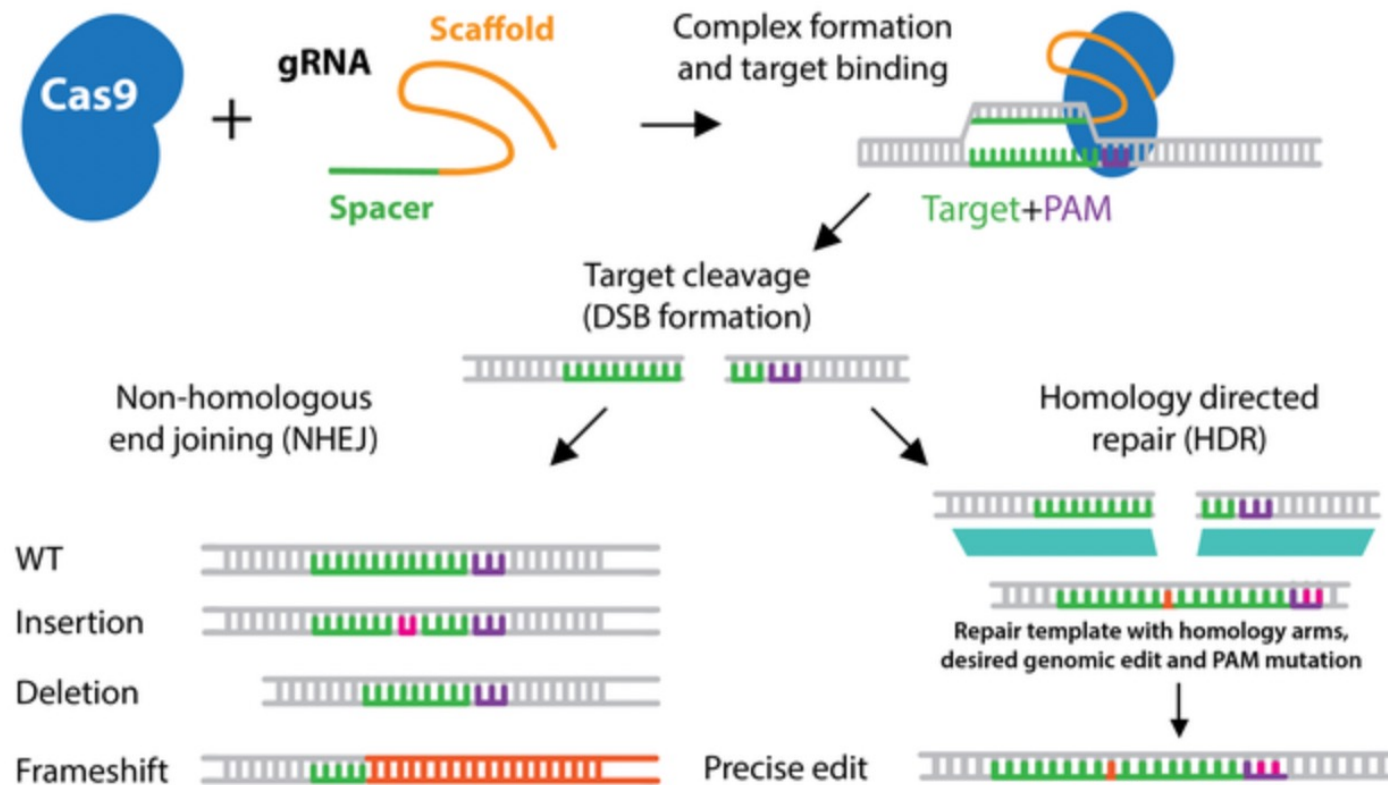
Titre de la présentation

Date / information / nom de l'auteur

Et maintenant?

► amélioration du fonctionnement des transgènes

Utilisation des nouvelles technologies de modifications ciblées du génome



Et maintenant?

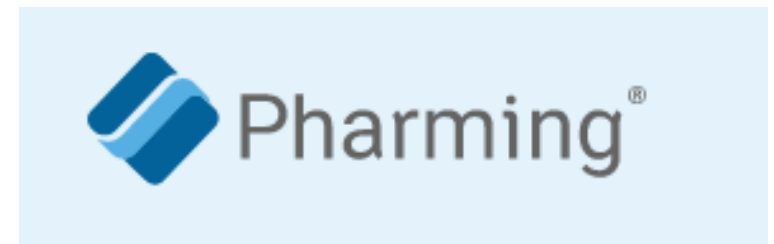
► La transgénèse chez le lapin

Technologie

- Uniquement par microinjection dans l'embryon unicellulaire
- Les nouvelles technologies CRISPR/Cas9 sont très efficaces, possibilité de mutations ciblées dans le génome

Les divers Ateliers transgénèse « lapins »

- Bioprotein Technologies : rachat par le groupe Pharming



- Atelier de Jouy-en-Josas : Plusieurs lignées en analyse
- Les autres ateliers : USA, Chine, Pays-Bas (Pharming),

➤ Production de protéines médicaments dans le lait d'animaux transgéniques

ATryn® - Antithrombine recombinante humaine



Chèvres transgéniques obtenues par microinjection de l'ADN ou par clonage par transfert de noyau de cellule somatique

Promoteur du gène β -caséine de chèvre
Production : 1 à 2g/l; 2l/jour

Traitement des déficiences d'antithrombine

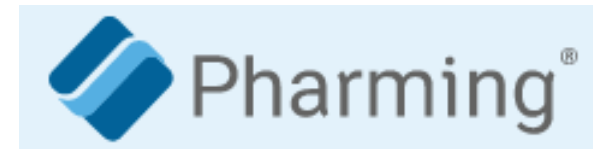
Glycosylation différente

Demie-vie : 10h au lieu de >56h

Première publication : 1998

Autorisation d'utilisation en Europe (2009) et aux USA (2010) **mais autorisation retirée par l'EMA en 2016**

RUCONEST - Inhibiteur recombinant de l'estérase C1 humaine



Lapins transgéniques obtenus par microinjection

Promoteur du gène caséine α -s1 bovine
Production : plus de 10g/l; 200ml/jour

Traitement des patients atteints d'angioedème héréditaire dû à un déficit d'expression du gène d'inhibiteur de l'estérase C1

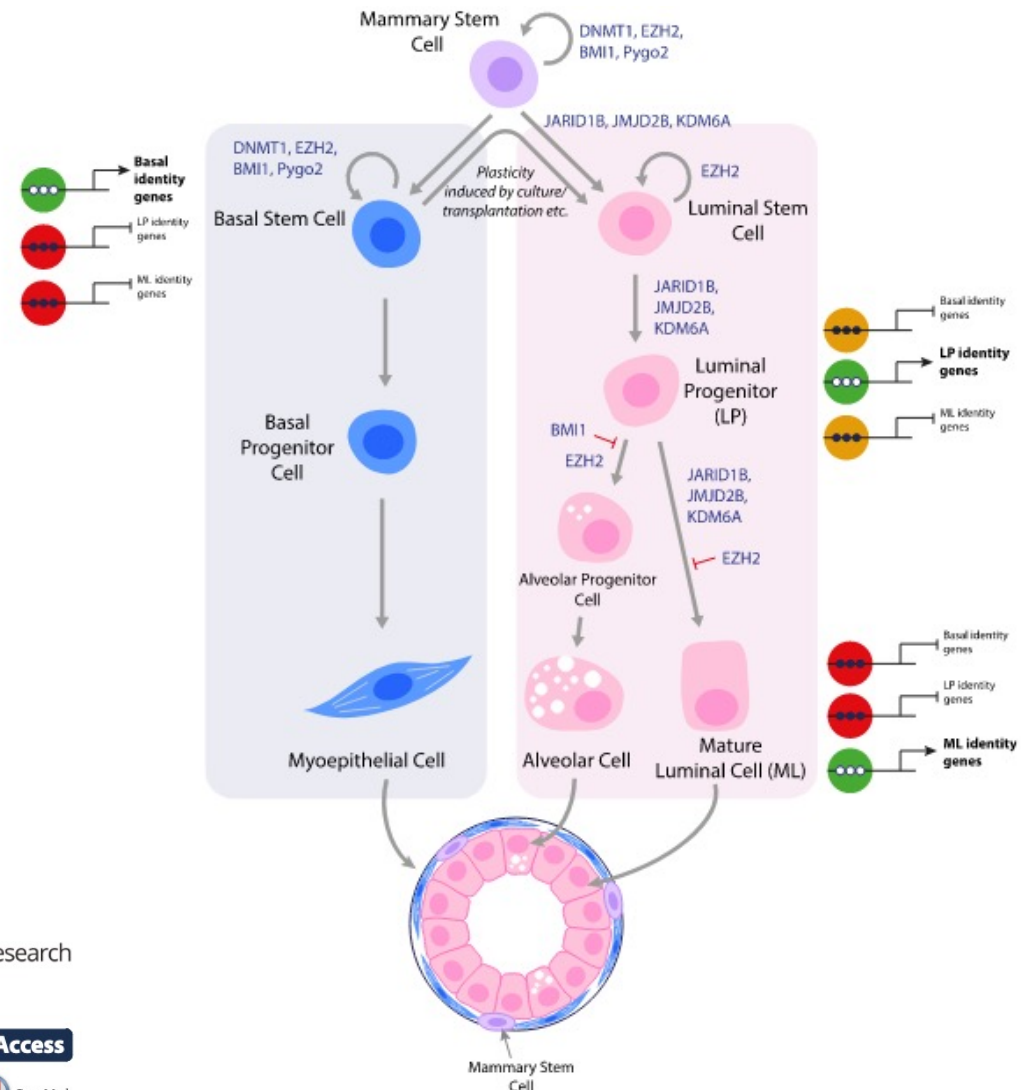
Vérifier l'absence de réaction médiée par IgE contre des allergènes de lapin.

Première publication : 2003

Autorisation : octobre 2010

Et maintenant?

► La différenciation de la cellule mammaire



Holliday et al. *Breast Cancer Research* (2018) 20:100
<https://doi.org/10.1186/s13058-018-1031-x>

Breast Cancer Research

REVIEW

Open Access

Epigenomics of mammary gland development



Holly Holliday^{1,2}, Laura A. Baker^{1,2}, Simon R. Junankar^{1,2}, Susan J. Clark^{2,3} and Alexander Swarbrick^{1,2*}

L'équipe LMH

Joe Attal
Nathalie Daniel-Carlier
Eve Devinoy
Geneviève Jolivet
Marie-Louise Fontaine
Mathieu Leroux-Coyau
Micheline Massoud
Caroline Maeder
Sonia Prince
Claudine Puissant
Hervé Pointu
Sylvie Rival-Gervier
Marie-George Stinnakre
Marie-Claire Théron
Dominique Thépot
Céline Viglietta
.....?

Les étudiants, thésards,
stagiaires

Le personnel de Bioprotein Technologies

Marc Le Bozec
Pierre-Jean Ripoll
Véronique Turquois
Eric Soler

Et aussi **les très nombreux autres collègues**, INRA ou autre, de tous pays, collaborateurs, partenaires de projets.....