

La transgénèse animale: Outil de connaissances et d'applications en santé



**Production de
protéines
pharmaceutiques
dans le lait**

Lapin



**Connaissances sur
la régulation (en
cis) de l'expression
des gènes**

Transgénèse et santé

Santé Animale

Induire une résistance à certains pathogènes
Comprendre l'origine d'une résistance

Santé Humaine

Domaine des xénogreffes
Métabolisme lipidique

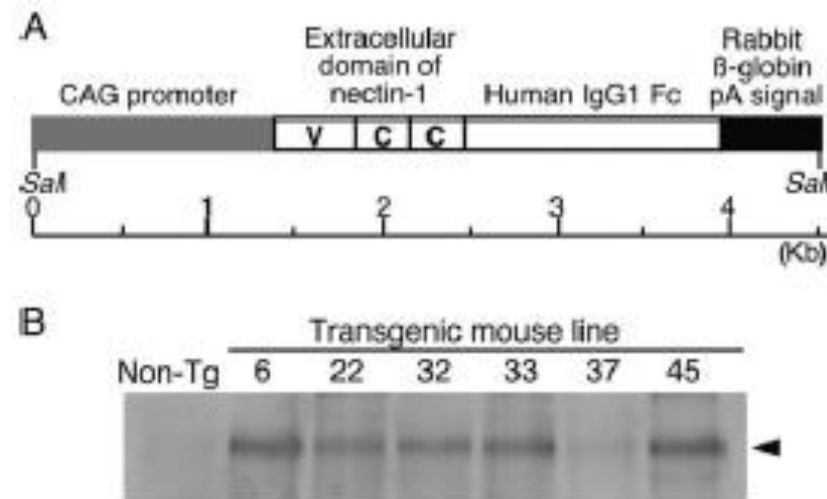
Transgénèse et Modèles en santé animale

**Outils pour induire une résistance à
certains pathogènes ?**

Virus d'Aujeszky

Virus d'Aujeszky (Herpes): Provoque avortements, mortalité des porcelets (proche 100%), symptômes respiratoires chez adulte... Pas de traitement. France indemne depuis 2008.

Bloquer l'entrée du virus par expression du récepteur sous forme circulante ?



Line	Copy no.	PHveCig In serum, $\mu\text{g/ml}$	Body weight, g	Litter size
6	1	$1,820.5 \pm 188.3$	16.2 ± 1.8^a (4)	8.0 ± 1.9^d
22	4	258.0 ± 100.5	18.9 ± 2.3^b (3)	7.4 ± 1.9^d
32	20	742.9 ± 47.9	$18.3 \pm 1.6^{b,c}$ (8)	6.0 ± 1.0^d
33	3	$1,283.0 \pm 370.8$	$17.1 \pm 1.2^{b,c}$ (7)	7.6 ± 1.7^d
37	50	5.0 ± 1.9	$17.5 \pm 1.6^{b,c}$ (6)	7.2 ± 1.3^d
45	2	$1,180.1 \pm 279.9$	$18.2 \pm 1.6^{b,c}$ (8)	3.8 ± 2.2
C57BL/6	0	1.2 ± 0.6	$17.4 \pm 1.5^{b,c}$ (8)	6.2 ± 1.3^d

Table 2. Survival rates of mice after the challenge with α -herpesviruses

Line	Transgenic mice, %	Control littermates, %	Virus	Dose	Route
6	100 (5/5)	14 (2/14)	PRV YS-81	20 LD ₅₀	I.p.
22	100 (12/12)	0 (0/12)	PRV YS-81	20 LD ₅₀	I.p.
32	100 (10/10)	14 (1/7)	PRV YS-81	20 LD ₅₀	I.p.
33	86 (6/7)	0 (0/9)	PRV YS-81	20 LD ₅₀	I.p.
37	100 (10/10)	25 (1/4)	PRV YS-81	20 LD ₅₀	I.p.
45	100 (6/6)	8 (1/12)	PRV YS-81	20 LD ₅₀	I.p.
22	100 (7/7)	0 (0/1)	PRV Kojnock	20 LD ₅₀	I.p.
32	100 (7/7)	14 (1/7)	PRV Kojnock	20 LD ₅₀	I.p.
6	100 (6/6)	14 (1/7)	HSV-1 VR-3	20 LD ₅₀	I.p.
6	50 (9/18)	0 (0/9)	PRV YS-81	10 LD ₅₀	I.n.
22	78 (18/23)	10 (2/21)	PRV YS-81	10 LD ₅₀	I.n.
32	61 (11/18)	8 (1/12)	PRV YS-81	10 LD ₅₀	I.n.
33	65 (11/17)	12 (1/8)	PRV YS-81	10 LD ₅₀	I.n.
37	90 (9/10)	8 (1/12)	PRV YS-81	10 LD ₅₀	I.n.
45	100 (9/9)	10 (1/10)	PRV YS-81	10 LD ₅₀	I.n.
37	100 (12/12)	10 (1/10)	PRV Chiba-03	10 LD ₅₀	I.n.



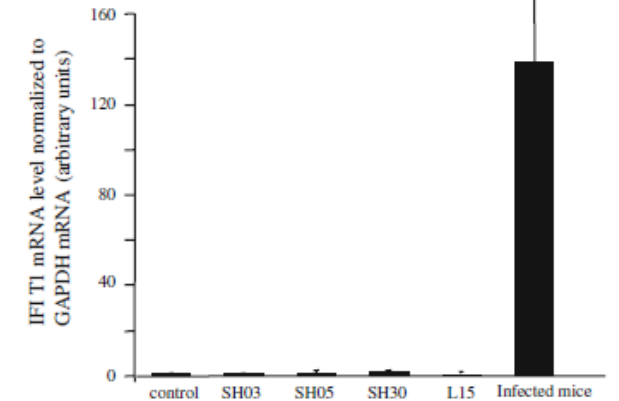
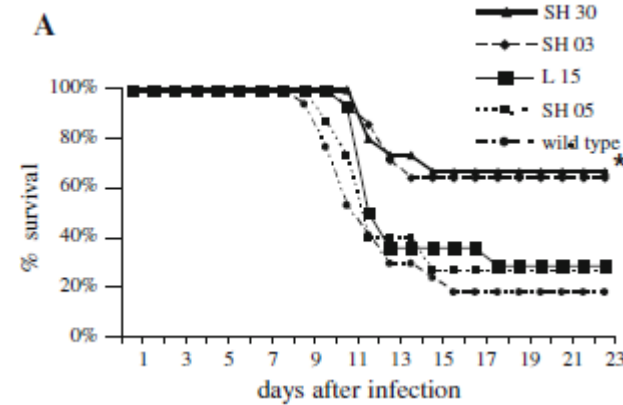
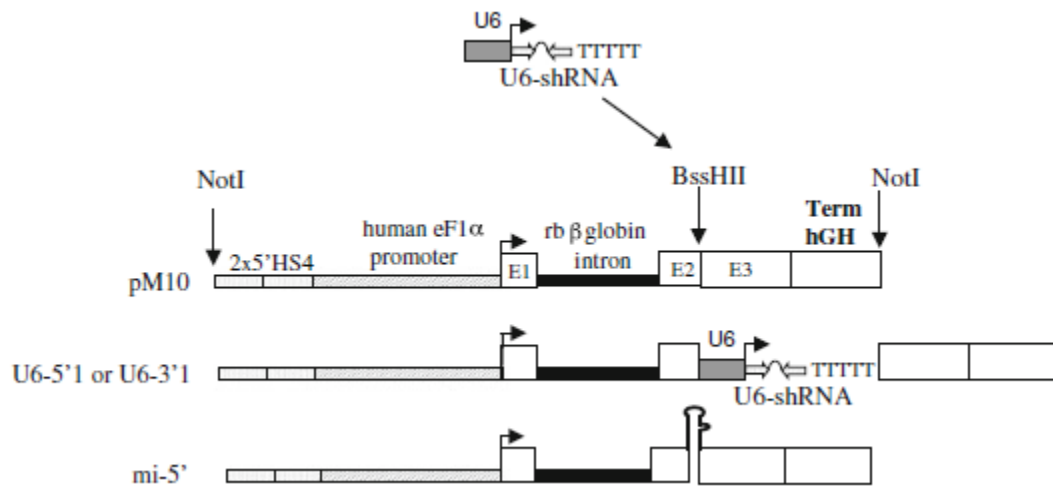
Protection: inhibition infection (ganglions trigéminés nerfs crâniens), mais...

[Transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/herpesvirus entry mediator C as a model for pseudorabies-resistant livestock.](#) Ono E, Amagai K, Taharaguchi S, Tomioka Y, Yoshino S, Watanabe Y, Cherel P, Houdebine LM, Adam M, Eloit M, Inobe M, Uede T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 16;101(46):16150-5. doi: 10.1073/pnas.0405816101. Epub 2004 Nov 8.

Virus d'Aujesky

Bloquer la réplication du virus. Approche ARNi: shRNA et miRNA ?

Cible: gène IE (Immediate Early)



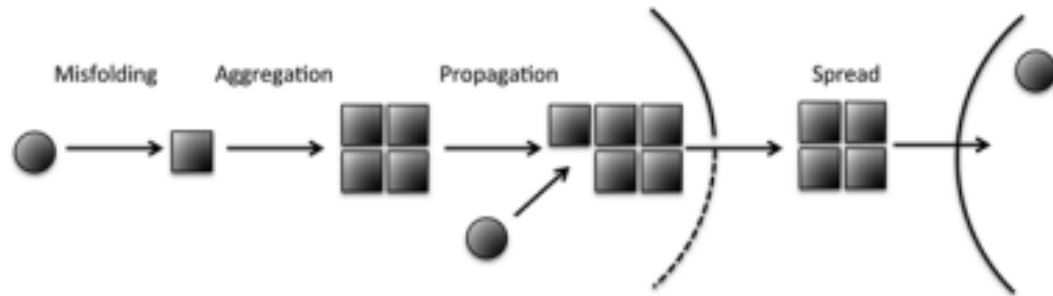
Acquisition d'une résistance (modérée) par expression d'ARNi contre le PRV, sans réaction immunitaire innée avant infection

[Viral infection resistance conferred on mice by siRNA transgenesis.](#) Daniel-Carlier N, Sawafta A, Passet B, Thépot D, Leroux-Coyau M, Lefèvre F, Houdebine LM, Jolivet G. *Transgenic Res.* 2013 Jun;22(3):489-500. doi: 10.1007/s11248-012-9649-4. Epub 2012 Sep 9.

**Comprendre l'origine de la résistance
apparente aux Prions des lapins**

Maladies à Prions

Prion: agent infectieux (ATNC) constitué en tout ou partie par la protéine PrP cellulaire anormalement repliée
Origine de la pathologie: génétique, sporadique ou infectieuse



Species	Disease	Cause
Humans	Creutzfeldt Jakob disease	Sporadic or familial
	Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome	Familial
	Fatal familial insomnia	Familial
	Sporadic fatal insomnia	Sporadic
	Kuru	Acquired
	Variant CJD	Acquired
Sheep/goats	Iatrogenic CJD	Acquired
	Scrapie	Acquired
	Atypical scrapie	Sporadic
Cattle	Bovine spongiform encephalopathy	Acquired
	Atypical BSE	Sporadic
Deer/elk	Chronic wasting disease	Acquired
Mink	Transmissible spongiform encephalopathy	Acquired
Exotic ungulates/feline species	Various	Acquired

Transmission intra-espèce

Héritabilité: locus Prnp (allèles PrP)



Transmission inter-espèce

Divergence PrP Prion (souche)/PrP hôte
Propriétés intrinsèques PrP hôte
Spécificité d'espèce

Obtention de lapins Tg exprimant la PrP^{VRQ} ovine (niveau physiologique)

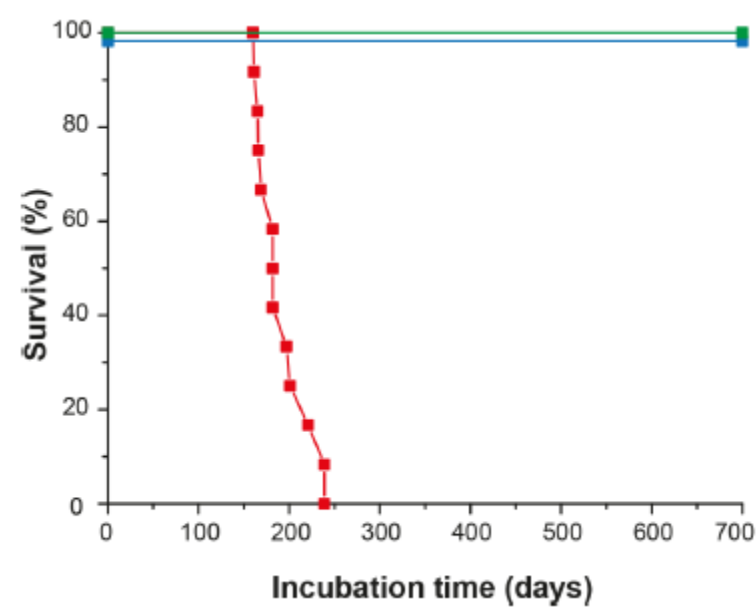
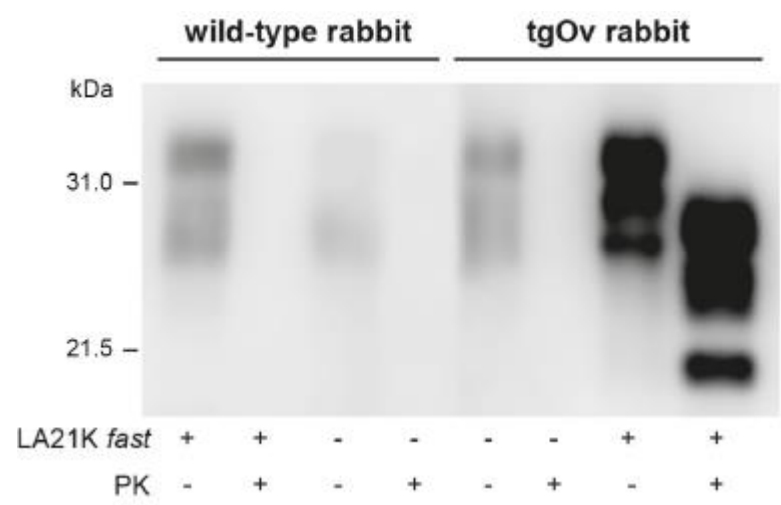


Table 1. Regional distribution of PrP^{res} and vacuolation in the brain of transgenic rabbits expressing ovine PrP challenged with LA21K fast prions.

Brain Regions	PrP ^{res} deposits	Spongiosis
Cortex	+++	-
Hippocampus	+++	+
Thalamus	+++	++
Cerebellum	+/-	+/-
Obex	+	+/-
Medulla oblongata	+	+



[Transgenic Rabbits Expressing Ovine PrP Are Susceptible to Scrapie.](#) Sarradin P, Viglietta C, Limouzin C, Andréoletti O, Daniel-Carlier N, Barc C, Leroux-Coyau M, Berthon P, Chapuis J, Rossignol C, Gatti JL, Belghazi M, Labas V, Vilotte JL, Béringue V, Lantier F, Laude H, **Houdebine LM**. PLoS Pathog. 2015 Aug 6;11(8):e1005077. doi: 10.1371/journal.ppat.1005077. eCollection 2015 Aug.



Travaux ultérieurs démontreront que la susceptibilité faible des lapins est bien liée à sa séquence PrP

Transgénèse et Modèles en santé humaine

**Optimisation de l'utilisation de la
transgénèse dans le cadre de la
xénogreffe**

The Organ Shortage Crisis in the U.S.

Number of patients on the waiting list versus patients that have received transplants in 2021, by organ



* Such as face, hands, and abdominal wall.

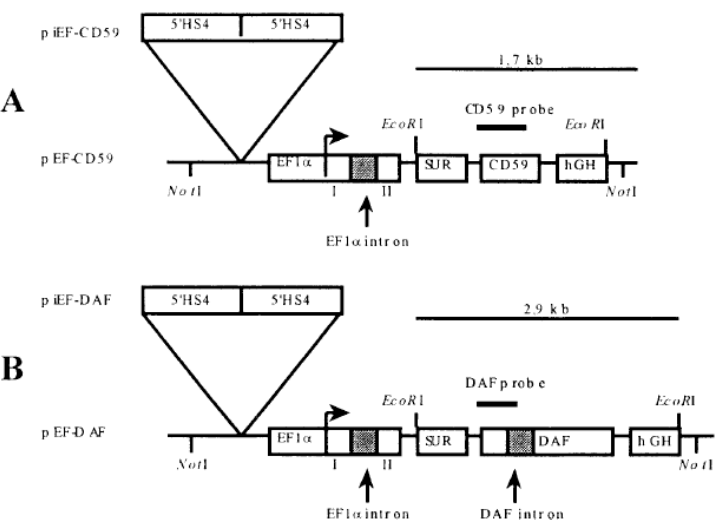
Source: Health Resources and Services Administration (HRSA)



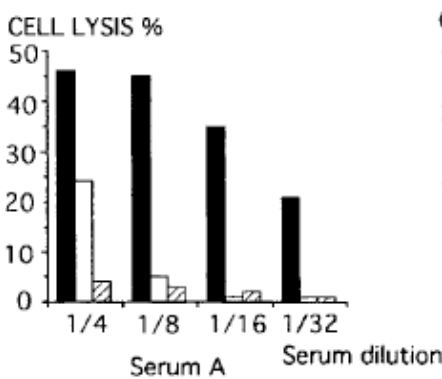
Eviter le rejet suraigu du greffon en inhibant l'activation du complément:

Expression des protéines inhibitrices CD55 (DAF) et CD59.

- Optimisation des constructions (ubiquiste et homogène)
- Production de modèles expérimentaux (lapins) plus appropriés que la souris



Transgenic lines	Detected transgene	Organs						
		Brain	Heart	Liver	Muscle	Lung	Spleen	Kidney
DCi.09	CD55	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	CD59	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
CDi.10	CD55	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	CD59	++++	++++	++	++	++++	++	++
Di.01	CD55	0	0	0	0	0	0	0
	CD55	+++++	+++++	++++	+++++	++++	+++++	++++



Test de cytotoxicité
Induite par sérum
Humain sur
cellules endothéliales
aortiques

Utilisation de ces mêmes constructions chez le porc:

- Obtention de 2 lignées transgéniques
- Expression des deux protéines dans les cellules endothéliales rénales
- Test de cytotoxicité induite par sérum de babouin ou humain sur cellules endothéliales aortiques ou rénales
Dilution du sérum à 50%: diminution de la létalité de 20 à 75 %
- Transplantation sur babouins (n=2) après néphrectomies (compatibles pour groupe sanguin ABO)
Sans traitement immunosuppresseur ou anticoagulant

Reins non Tg: rejet suraigu 24h après transplantation

Reins Tg: pas de rejet pendant 4-5 jours, créatinine normale, puis insuffisance rénale et coagulation intravasculaire disséminée (réjection vasculaire). Létalité à 6 jours.

[Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination.](#) Ménoret S, Plat M, Blanco G, Martinat-Botté F, Bernard P, Karam G, Tesson L, Renaudin K, Guillouet P, Weill B, Chéreau C, **Houdebine LM**, Soullillou JP, Terqui M, Anegon I. *Transplantation*. 2004 May 15;77(9):1468-71. doi: 10.1097/01.tp.0000111758.35048.ea.

	Genes	Full gene name	Inhibition of
Incompatibilities	<i>GGTA1</i> KO	α 1,3-Galactosyltransferase knockout	Hyperacute rejection (Dai et al. 2002)
	<i>CMAH</i> KO	N-acetylneuraminic acid hydroxylase knockout	Acute vascular rejection (Huh et al. 2016)
	<i>B4GALNT2</i> KO <i>B4GALNT2L</i> KO	β -1,4-N-galactosaminyltransferase-2 knockout	Acute vascular rejection (Byrne et al. 2018)
	<i>GHR</i> KO	Growth hormone receptor knockout	Organ overgrowth (Hinrichs et al. 2021)
	<i>SLAI</i> KO	Swine leukocyte antigen class I knockout	Cross-reactive HLA antibodies (Fischer et al. 2020a, b, c)
	<i>hCD46</i>	Human Membrane cofactor protein, MCP	Complement activation (Fischer et al. 2016)
	<i>hCD55</i>	Human Decay accelerating factor, DAF	Complement activation (Fischer et al. 2016)
	<i>hCD59</i>	Human MAC-inhibitory protein	Complement activation (Fischer et al. 2016)
	<i>hTM, THBD</i>	Human Thrombomodulin	Blood coagulation (Petersen et al. 2009; Kim et al. 2015)
	<i>hEPCR, PROCR</i>	Human Endothelial Protein C receptor	Blood coagulation (Navarro et al. 2011; Iwase et al. 2014)
	<i>hCD39, ENTPD1</i>	Human Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1	Platelet aggregation (Wheeler et al. 2012; Iwase et al. 2014)
	<i>hTFPI</i>	Human tissue factor pathway inhibitor	Blood coagulation (Iwase et al. 2014; Ji et al. 2015)
	<i>hA20, TNFAIP3</i>	Human TNF α -induced protein 3	Apoptosis and inflammation (Oropeza et al. 2009; Fischer et al. 2016)
	<i>hHO1, HMOX1</i>	Human Heme oxygenase 1	Apoptosis and inflammation (Ahrens et al. 2015; Rieblinger et al. 2018)
Cellular response	<i>hCD47</i>	Human Leukocyte surface antigen 47	Macrophages (Ide et al. 2007)
	<i>HLA-E/B2M</i>	Human Leukocyte antigen E/ Human beta 2 microglobulin	NK cells (Weiss et al. 2009)
	<i>CTLA4/LEA29Y</i>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen	T cells (PHELPS et al. 2009)
	<i>PDL-1</i>	Programmed cell death ligand 1	T cells (Buermann et al. 2018)
Viral safety	<i>PERV</i> KO	Porcine endogenous retrovirus knockout	Viral transmission (Niu et al. 2017)

[Xenotransplantation becoming reality](#). Fischer K, Schnieke A. Transgenic Res. 2022 Jun;31(3):391-398. doi: 10.1007/s11248-022-00306-w. Epub 2022 May 11.

Première greffe réussie d'un cœur de cochon humanisé sur un patient

Article publié le 15 janvier 2022 par Julie Kern

Des médecins de Baltimore au Maryland ont réalisé, avec succès, une xénogreffe unique en son genre. Un cœur de cochon génétiquement modifié a été greffé sur un homme de 57 ans souffrant d'une maladie cardiaque en phase terminale.

Revivacor:

4 invalidations

6 transgénèses additives

Xénogreffe de cœur de cochon : le receveur décédé à cause d'un virus porcin ?

Par Coralie Lemke le 06.05.2022 à 16h56

🕒 Lecture 5 min.

Le premier patient à avoir bénéficié d'une greffe de cœur de cochon génétiquement modifié serait décédé après une infection due à un virus porcin présent dans l'organe au moment de la transplantation.

🏥 SANTÉ

La révolution des greffes d'organes issus d'animaux

Par Hugo Jalinière le 14.05.2022 à 12h00

🕒 Lecture 6 min.

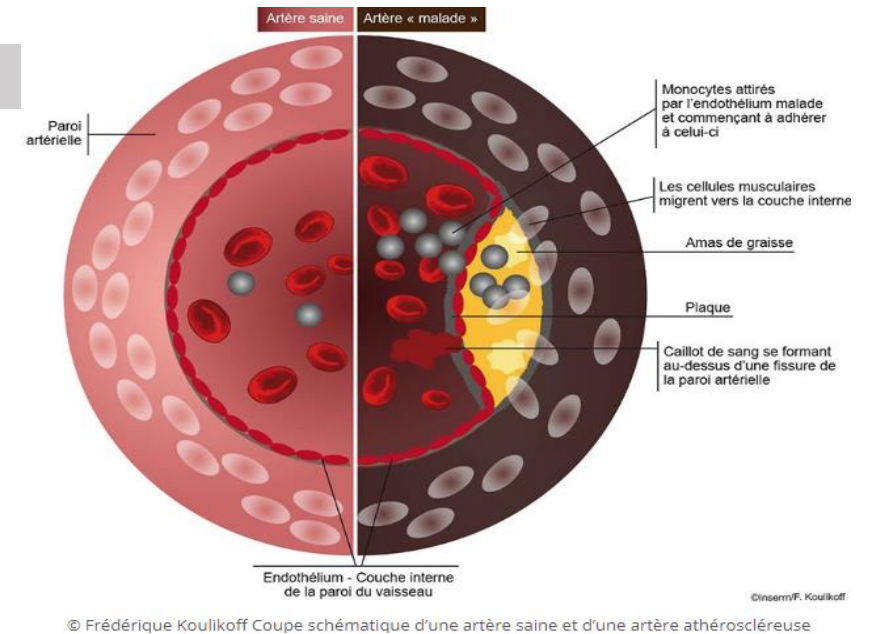
Un Américain a vécu deux mois avec un cœur de porc génétiquement modifié pour le rendre compatible avec le système immunitaire humain. Une première qui confirme les promesses de la xénogreffe. De quoi pallier à terme la pénurie de greffons humains.

**Le lapin,
animal modèle pour le métabolisme
lipidique:**

**Identification de gènes clés de
résistance à des Pathologies
Humaines**

Athérosclérose

Cause importante de mortalité au niveau mondial: 18 millions de décès dans le monde 2016



Lapin comme animal modèle d'athérosclérose

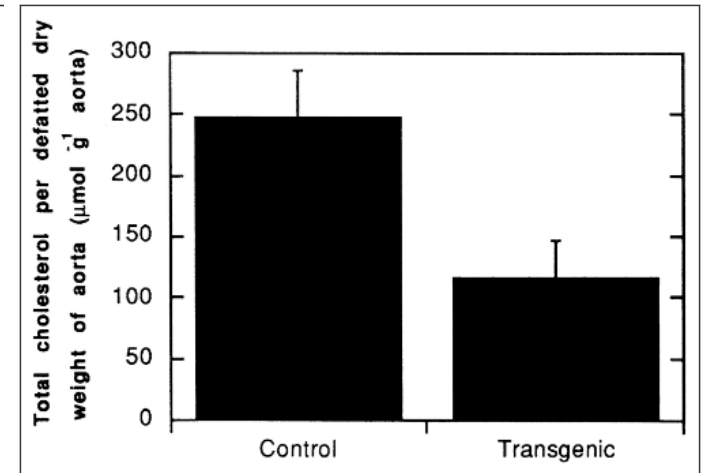
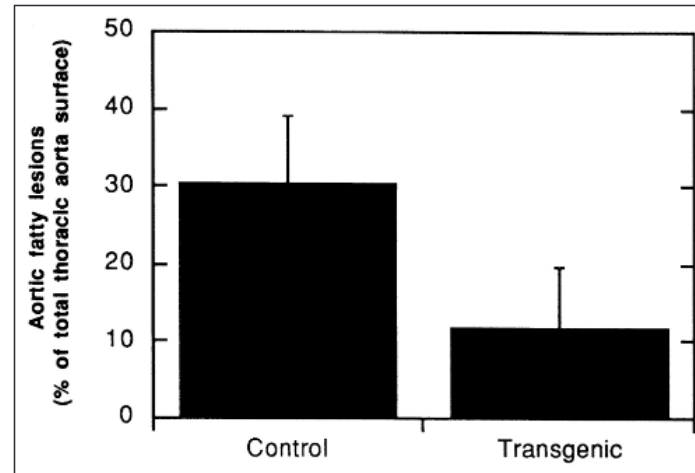
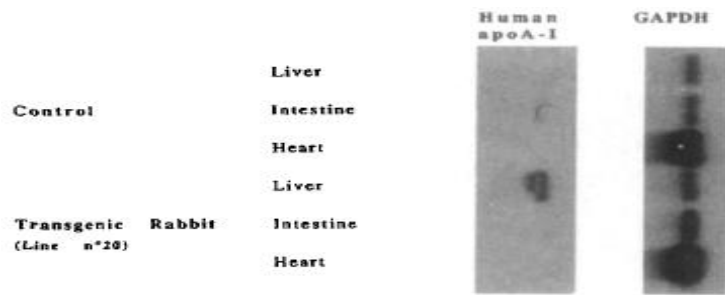
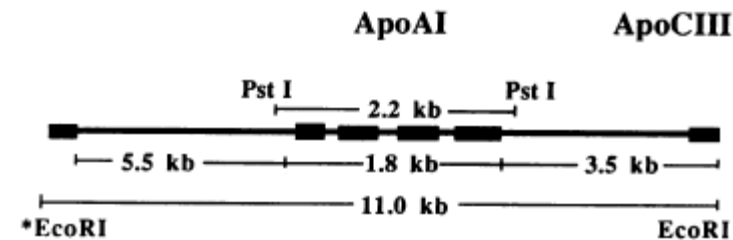
Comme l'homme mais pas la souris, le lapin développe une athérosclérose suite à une alimentation riche en cholestérol (proximité physiologique).

Ignatowski, A. Über die Wirkung des tierischen Eiweißes auf die Aorta und die parenchymatösen Organe der Kaninchen.

Virchows Arch. path Anat. 198, 248–270 (1909).

Anitschkow N. and Chalатов S. Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes, translated by Mary Z. Pelias, 1913. Arteriosclerosis. 1983 Mar-Apr;3(2):178-82.

Athérosclérose : rôle bénéfique de l'Apolipoprotéine A-I ?



[*Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits.*](#) Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, Tailleux A, Fievet C, Fruchart JC, **Houdebine LM**, Deneffe P. *Circulation*. 1996 Aug 15;94(4):713-7. doi: 10.1161/01.cir.94.4.713.

[*Human apolipoprotein C1 transgenesis reduces atherogenesis in hypercholesterolemic rabbits.*](#) Gautier T, Deckert V, Aires V, Le Guern N, Proukhnitzky L, Patoli D, Lemaire S, Maquart G, Bataille A, Xolin M, Magnani C, Masson D, Harscoët E, Da Silva B, **Houdebine LM**, Jolivet G, Lagrost L. *Atherosclerosis*. 2021 Mar;320:10-18.

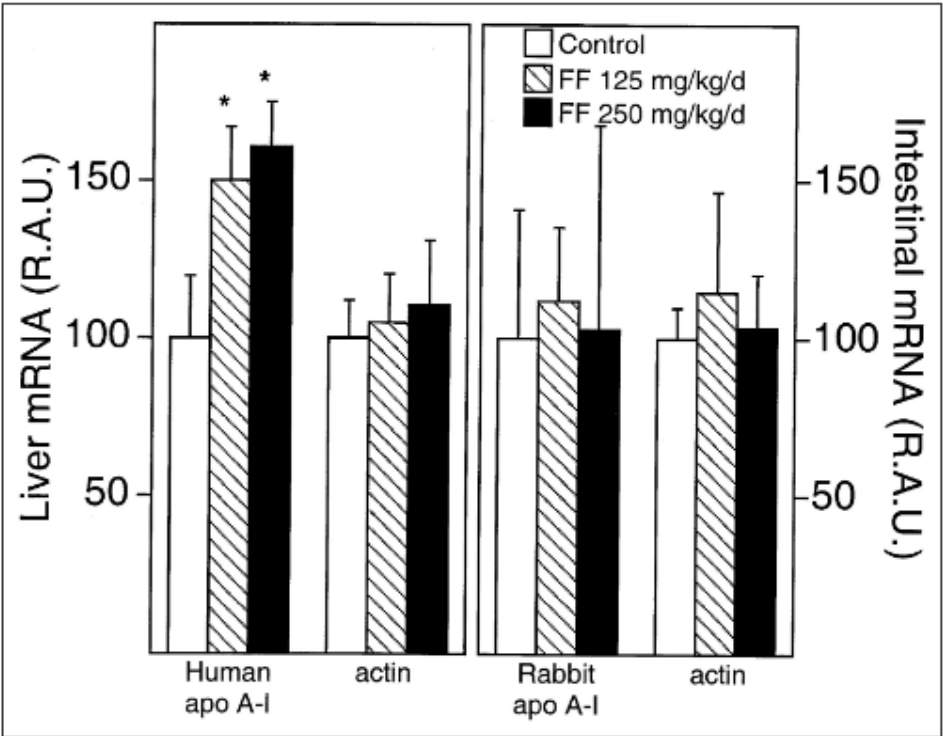
	Human Apo A-I, mg/dL	Rabbit Apo A-I, mg/dL	Cholesterol, mg/dL		
			VLDL+LDL	HDL	Total
Line 20					
Transgenic (n=8 F, 8 M)	175±46	23±14	63±7	80±7*	143±10*
Nontransgenic (n=10 F, 9 M)	...	76±10	60±5	37±6	97±6
Line 8					
Transgenic (n=2 F, 1 M)	112±10	17±6	18±2	54±16*	73±25
Nontransgenic (n=2 F, 3 M)	...	72±12	35±17	35±6	68±23
Line 31					
Transgenic (n=2 M)	30±15	41±5	46±22	24±4	71±30
Nontransgenic (n=2 F, 2 M)	...	65±3	38±6	30±18	69±23

*P<.01 vs control.

[*Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein A-I in the liver.*](#) Duverger N, Viglietta C, Berthou L, Emmanuel F, Tailleux A, Parmentier-Nihoul L, Laine B, Fievet C, Castro G, Fruchart JC, **Houdebine LM**, Denèfle P. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Dec;16(12):1424-9. doi: 10.1161/01.atv.16.12.1424.

Effet des fibrates

Rat: diminution de apo A-I et apo -A-II, augmentation chez l'homme !
Activation prolifération peroxysomes exacerbée chez les rongeurs -> hépatocarcinome.



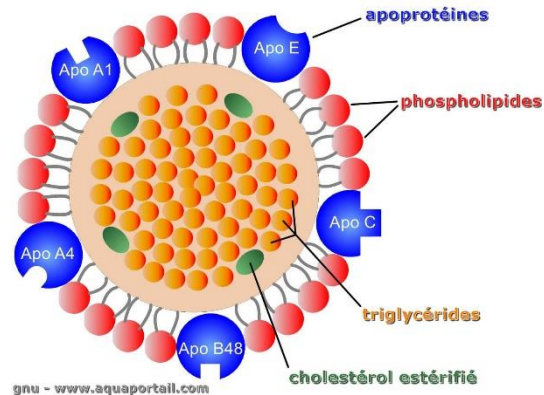
Dose, mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	n	Body Weight, g	Liver Weight, % of Body Weight	ACO Activity, nmol · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹	mRNA, RAU
0	6	3688±168	1.99±0.37	6.60 ±0.52	100±33
125	8	3574±310	1.67±0.30	7.28 ±1.94	113±26
250	5	3416±342	1.97±0.46	7.44 ±1.71	90±24

ACO, a sensitive marker for the PPAR-mediated peroxisome proliferative response

[Beneficial effects of fibrates on apolipoprotein A-I metabolism occur independently of any peroxisome proliferative response.](#) Hennuyer N, Poulain P, Madsen L, Berge RK, **Houdebine LM**, Branellec D, Fruchart JC, Fiévet C, Duverger N, Staels B. *Circulation*. 1999 May 11;99(18):2445-51. doi: 10.1161/01.cir.99.18.2445.

Recherche de gènes cibles pour lutter contre l'obésité

Absorption de gras par les cellules intestinale: **APOBEC** (-> ApoB48)



Les lapins transgéniques sont moins gros que les lapins normaux.

5200

Poids des lapins (grammes)

4200

3200

2200

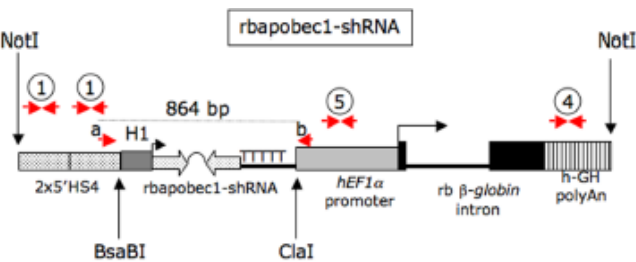
1200

Lapins normaux

Lapins transgéniques (le fonctionnement du gène APOBEC-1 est réduit)

Age (en mois)

13 15 17 19 21 23 25 27 29 31



[Induction of body weight loss through RNAi-knockdown of APOBEC1 gene expression in transgenic rabbits.](#) Jolivet G, Braud S, DaSilva B, Passet B, Harscoët E, Viglietta C, Gautier T, Lagrost L, Daniel-Carlier N, Houdebine LM, Harosh I. *PLoS One*. 2014 Sep 12;9(9):e106655. doi: 10.1371/journal.pone.0106655. eCollection 2014.

Adaptation modèle animal à la question biologique

Primates % Neuropathies (Parkinson, Autisme)

Lapins/Petits Ruminants % Différentiation gonadique

Edition des génomes et caractères de production

*Caractères à déterminisme mono-génique.
Multiplexage ? Caractères quantitatifs ?*



*FDA approved AquaBounty Salmon
(USA, Canada)*



*Regional Fish Kyoto
(Daurade Rouge)
20% viande en plus
(Myostatine)*

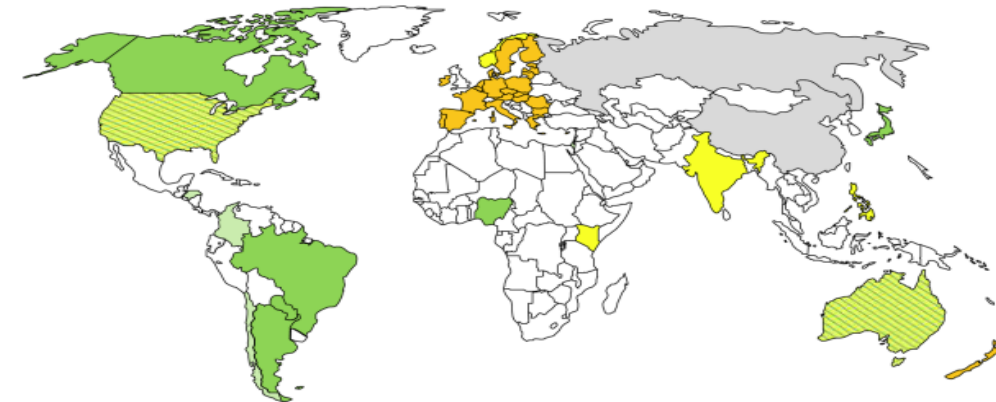


Fast-growing tilapia (Brésil, Argentine)

Aspect Législatif



GloFish (Poisson zèbre, Médaka,...)



Commission de Génie Génétique (20 membres, présidée par Jean-Pierre Zalta, Décret n° 89-306 du 11/05/89).

Commission de biotechnologies de l'AFSSA, coauteur du rapport « OGM et alimentation : peut-on identifier et évaluer des bénéfices pour la santé ? ».

**Production
de modèles en santé
Humaine et Animale**

**Variété des outils
et des approches
utilisées
Savoir faire encore
présent...**

**Utilisation de la glande
mammaire comme
bioréacteur**

**Amélioration des
performances
de production ?**

**Acceptation
sociétale ?**



*La science est un outil puissant. L'usage qu'on en fait dépend
de l'homme, pas de l'outil. ~ Albert Einstein*