



Production et utilisation de lignées transgéniques de porc

Pascal Mermillod

**Inra, Physiologie de la Reproduction et des Comportements
UMR 6175, Inra - Cnrs - Univ. de Tours - IFCE
37380 Nouzilly**

Pascal.Mermillod@tours.inra.fr

Séminaire du réseau EFOR, 14-15 février 2011, Paris



Plan

- Introduction
- Méthodologies de transgénèse
- Exemples d'applications
- Conclusions





Plan



- Introduction
- Méthodologies de transgénèse
- Exemples d'applications
- Conclusions

Intérêts de l'espèce porcine

- Similitudes / Homme

- Taille (organes)
- Omnivores
- Anatomie et physiologie digestives
- Génome



- Races sélectionnées

- Minipigs outbred
- Minipigs inbred (Göttingen minipig), reconnu comme animal modèle non rongeur



Intérêts de l'espèce porcine

- Facilité d'élevage
 - Nombreuses races
 - Maturité sexuelle précoce (5-8 mois)
 - Intervalle de génération court (12 mois)
 - Prolificité (10-12 porcelets)
 - Non saisonné
 - Conditions d'élevage maîtrisées
 - Suivi sanitaire



Intérêts de l'espèce porcine

- Intérêts expérimentaux
 - Diversité phénotypique
 - Connaissance du génome (draft ensembl, puce SNP 60k, banques EST, arrays)
 - Outils moléculaires
 - Méthodes de transgénèse optimisées

http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index

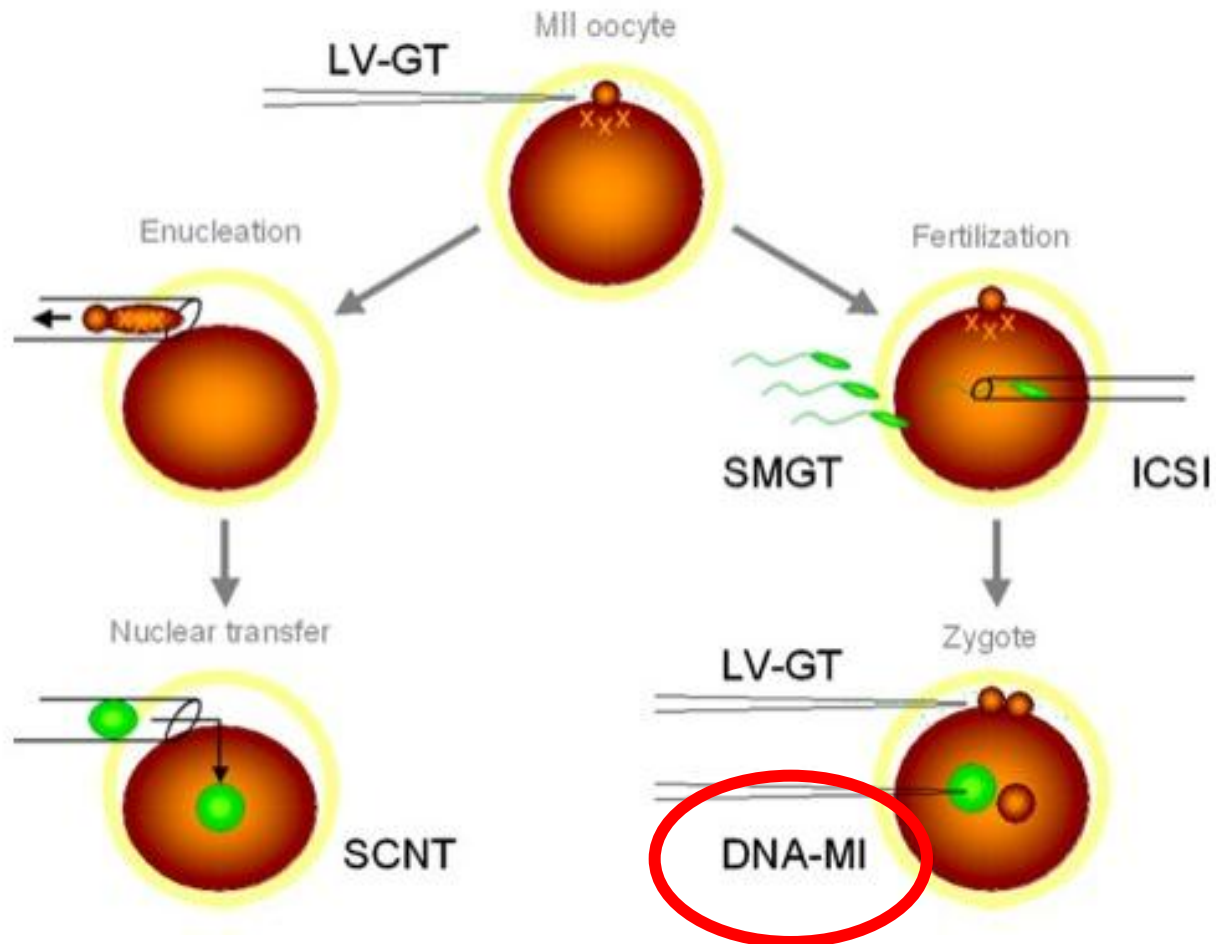


Plan



- Introduction
- Méthodologies de transgénèse
 - Microinjection
 - Vecteurs viraux, épisomes, transposons
 - Spermatozoïde
 - Transfert nucléaire
 - Endonucléases
- Exemples d'applications
- Conclusions

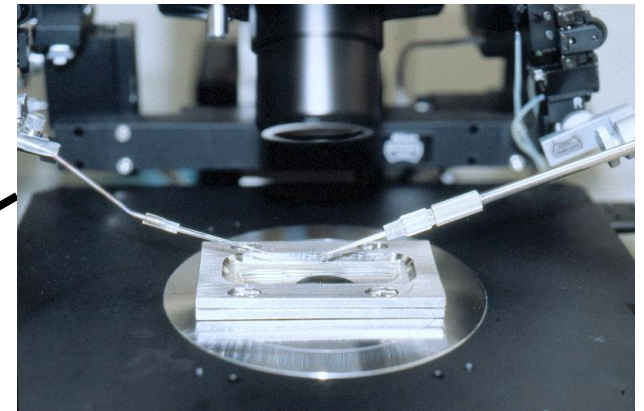
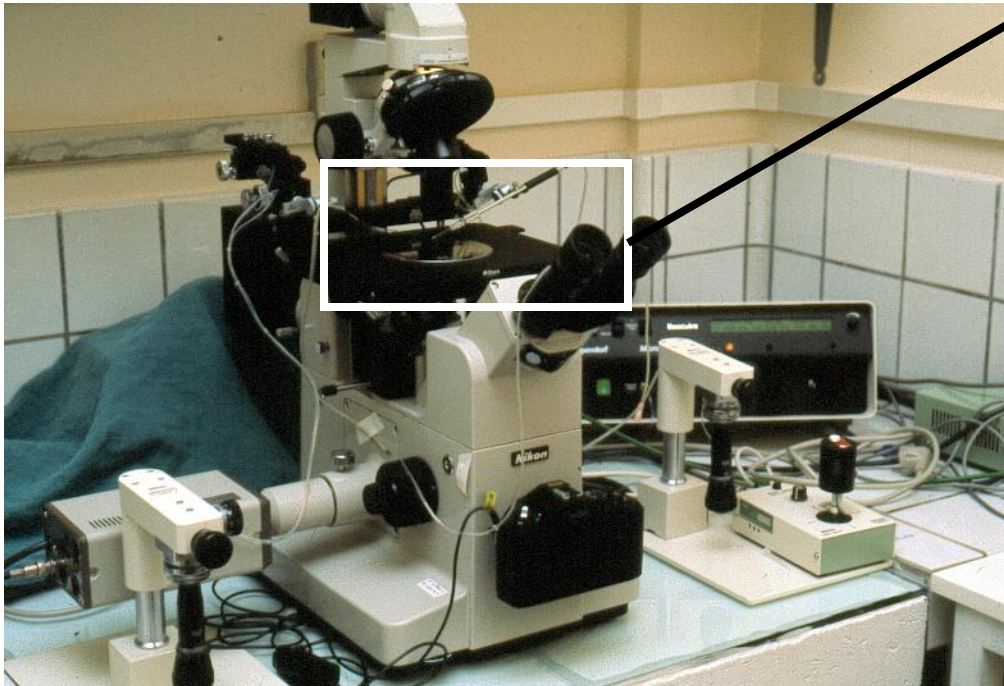
Méthodologies



Microinjection pronoyau

- Depuis 1985

Hammer et al., Nature, 1985





Transgénèse

- Microinjection dans les pronoyaux
 - Collecte d'embryons au stade une cellule
 - Chirurgie
 - abattage
 - Centrifugation (lipides)
 - Injection
 - Transfert dans l'oviducte de receveuses synchrones (chirurgie)

Microinjection pronoyau

■ Résultats

- Production de porcs « humanisés »
porteurs des gènes humains DAF (CD55),
CD59 et CTLA4

| | HDAF– hCD59 | CTLA4lg |
|------------------------|--------------|--------------|
| Donors | 81 | 95 |
| Eggs collected | 1691 | 2286 |
| Eggs injected | 654 | 1054 |
| Eggs transferred | 570 | 1046 |
| Recipients | 26 | 42 |
| Farrowing | 10 | 24 |
| Piglets | 66 | 161 |
| Positives | 2 | 8 |
| Positives/ Transferred | 0.35% | 0.76% |



Double transgénique
hDAF - hCD59

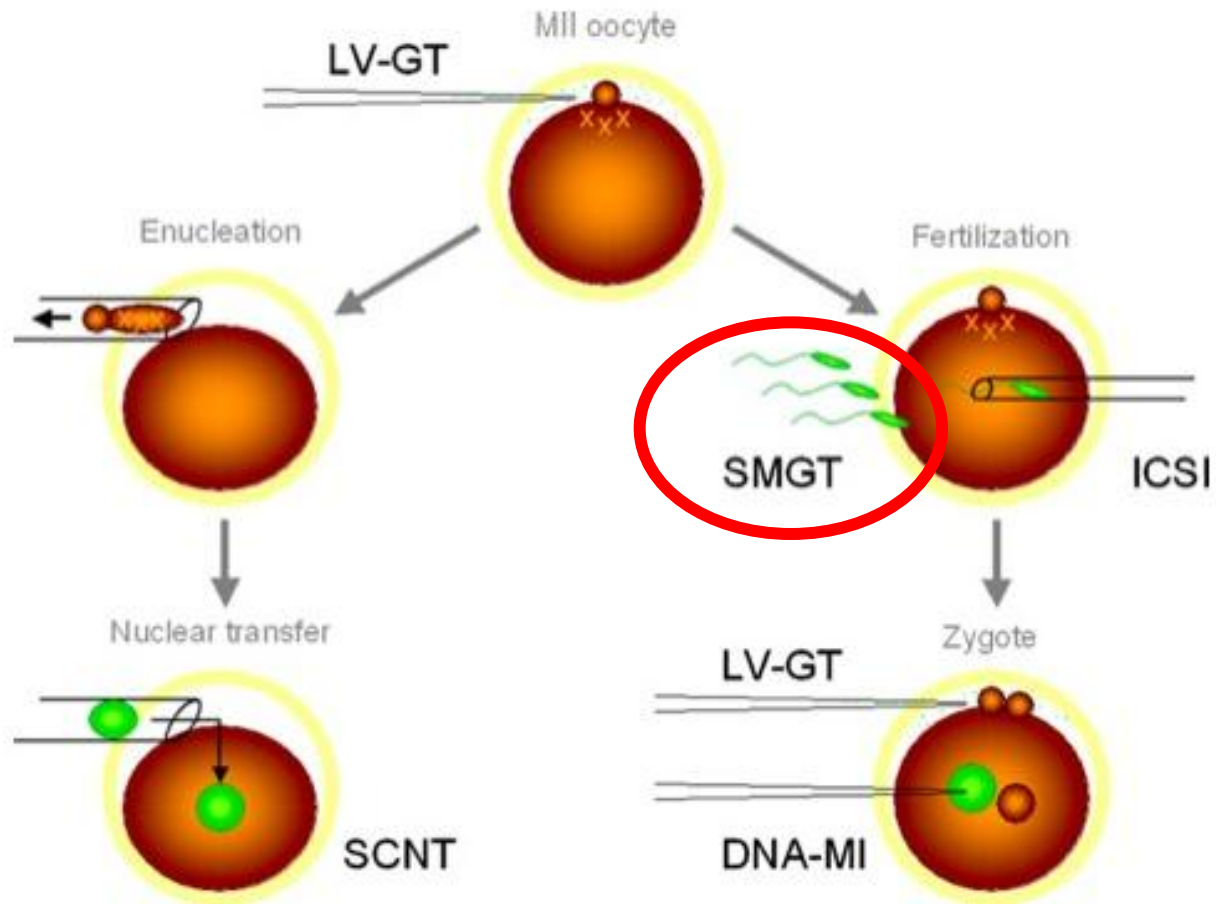
Homozygotes



Microinjection pronoyau

- Rendement faible
- Mosaïcisme
- Nombre de copies non contrôlé
- Site d'insertion aléatoire
 - Variations du niveau d'expression
 - Risques de disruption de gènes
- La plupart des lignées actuelles

Méthodologies





Spermatozoïde

Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation

Marialuisa Lavitrano^{*†}, Maria Laura Bacci[‡], Monica Forni[‡], Davide Lazzereschi^{*}, Carla Di Stefano^{*§}, Daniela Fioretti^{*§}, Paola Giancotti^{*§}, Gabriella Marfé^{*§}, Loredana Pucci^{*§}, Luigina Renzi^{*§}, Hongjun Wang^{*§}, Antonella Stoppacciaro^{*}, Giorgio Stassi[¶], Massimo Sargiacomo^{||}, Paola Sinibaldi^{**}, Valeria Turchi^{*}, Roberto Giovannoni^{††}, Giacinto Della Casa^{‡‡}, Eraldo Seren[‡], and Giancarlo Rossi^{‡‡}

Proceedings of the National Academy of Science, Oct 2002



Spermatozoïde

- Méthode

- Collecte (2 mâles sélectionnés sur 20)
- Lavage du plasma séminal
- Incubation avec le plasmide linéarisé
- IA

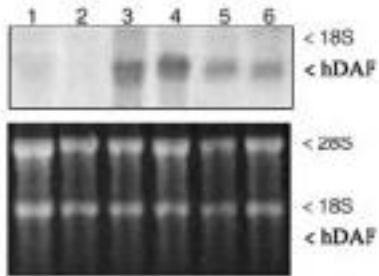
- Résultats

- 15 truies, 93 porcelets
- 53 positifs (57%) dont 34 avec protéine dans les tissus (37%)
- Transmission à la descendance
- Expression protéique, résistance à la lyse par le complément

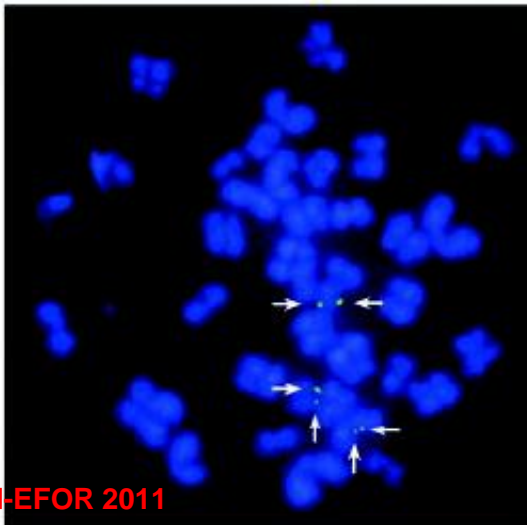
Transgénèse

■ Spermatozoïdes

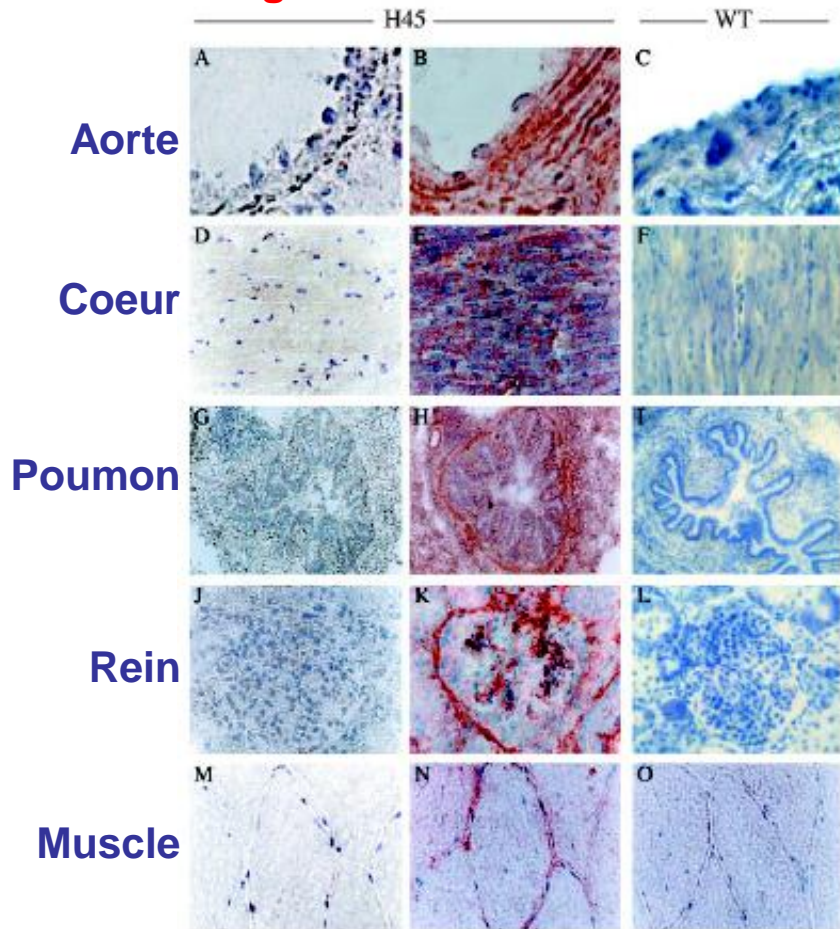
Northern



FISH



Immunohistologie



Lavitrano et al, PNAS, 2002



Spermatozoïde

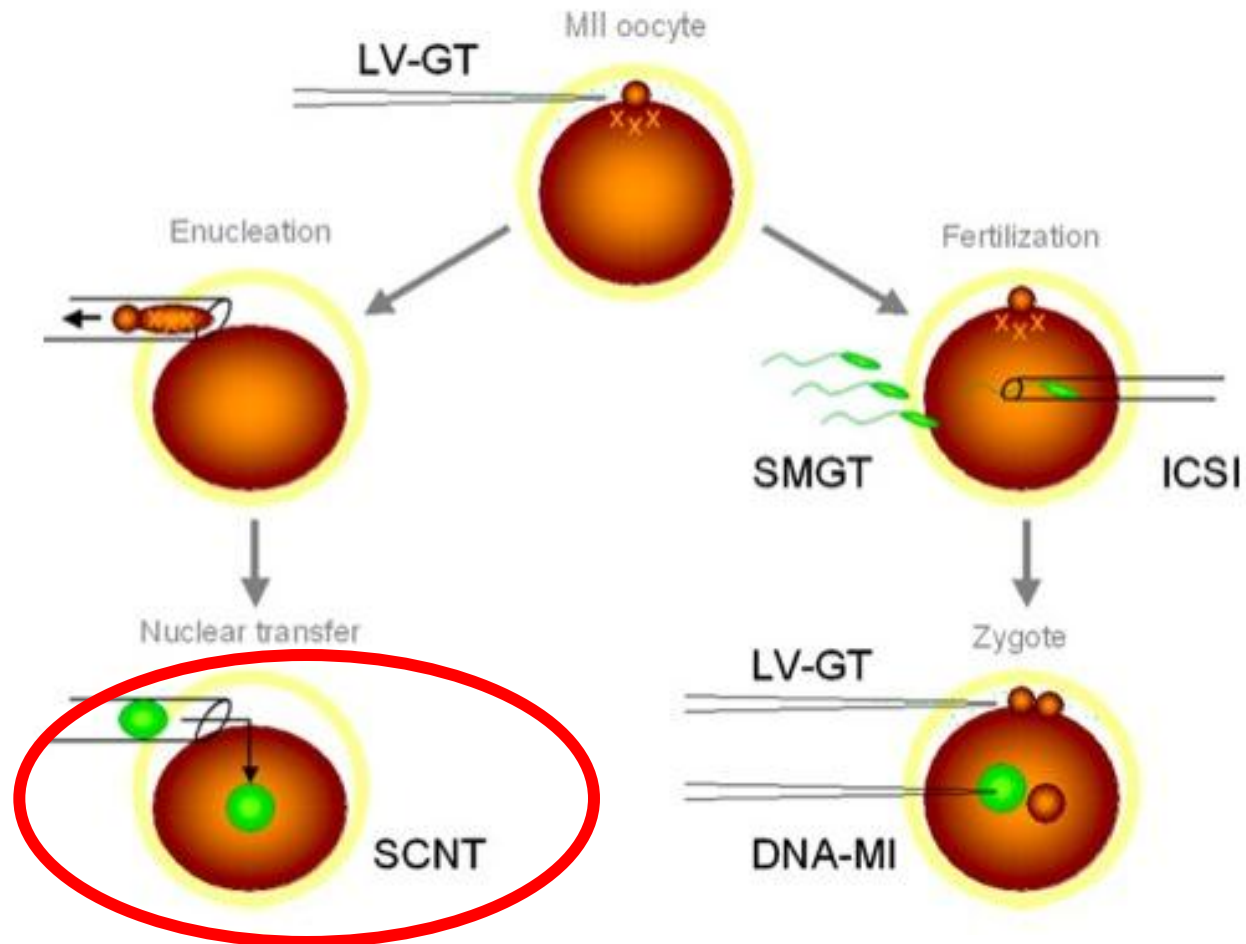
- Maîtrise de la capacité de transport ?
- Choix du mâle
- Perméabilisation du spermatozoïde
 - Congélation
 - Détergent
 - Cross linking
- Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)
- FIV



Spermatozoïde

- Rendement élevé
- Mosaïcisme
- Nombre de copies non contrôlé
- Site d'insertion aléatoire
 - Variations du niveau d'expression
 - Risques de disruption de gènes

Méthodologies



Clonage somatique

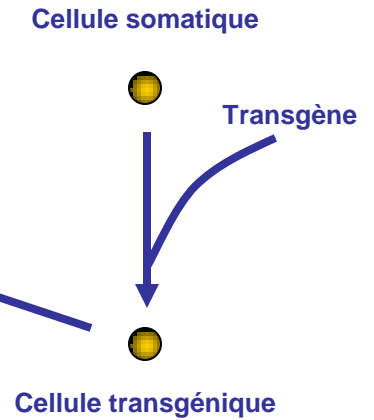
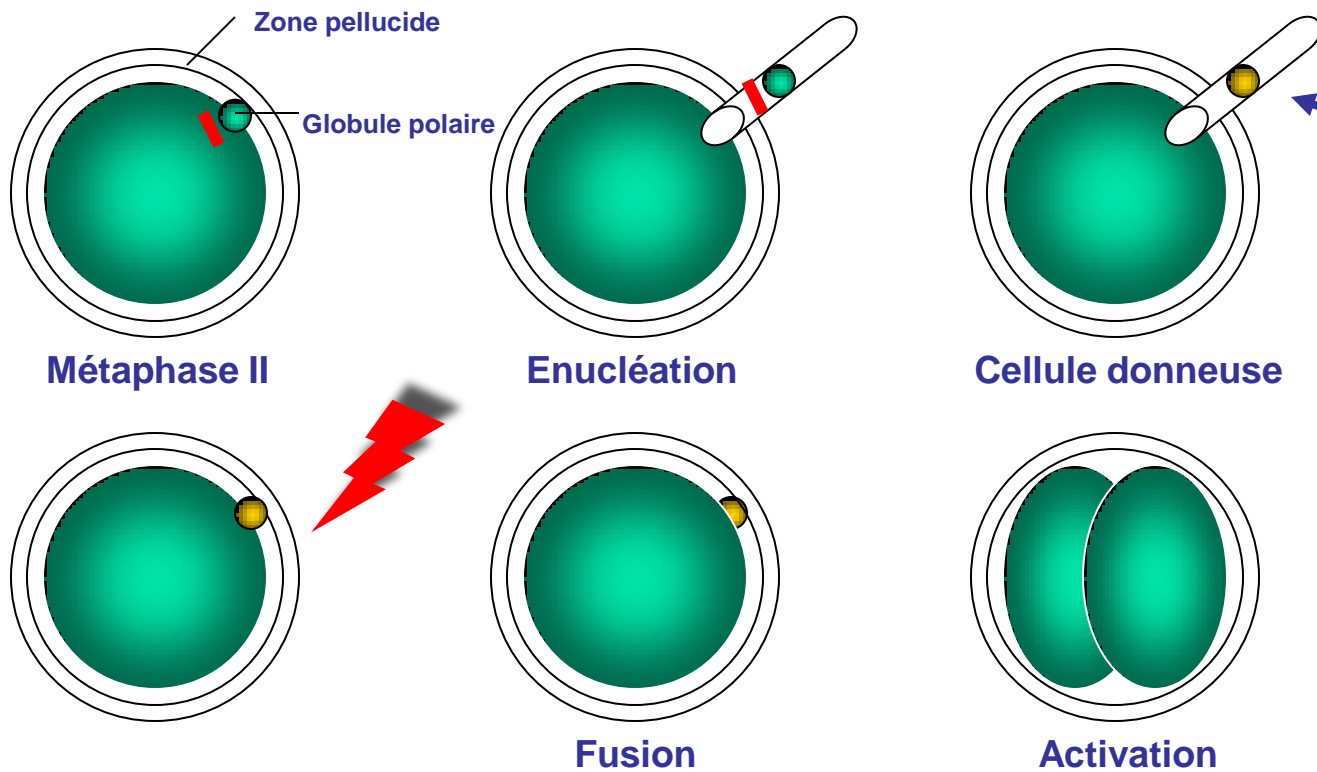


Clonage somatique

- Ovins (1997)
- Bovins (1999)
- Caprins (1999)
- Souris (1999)
- **Porcins (2000)**
- Gaur (2001)
- Chat (2002)
- Lapin (2002)

Clonage somatique

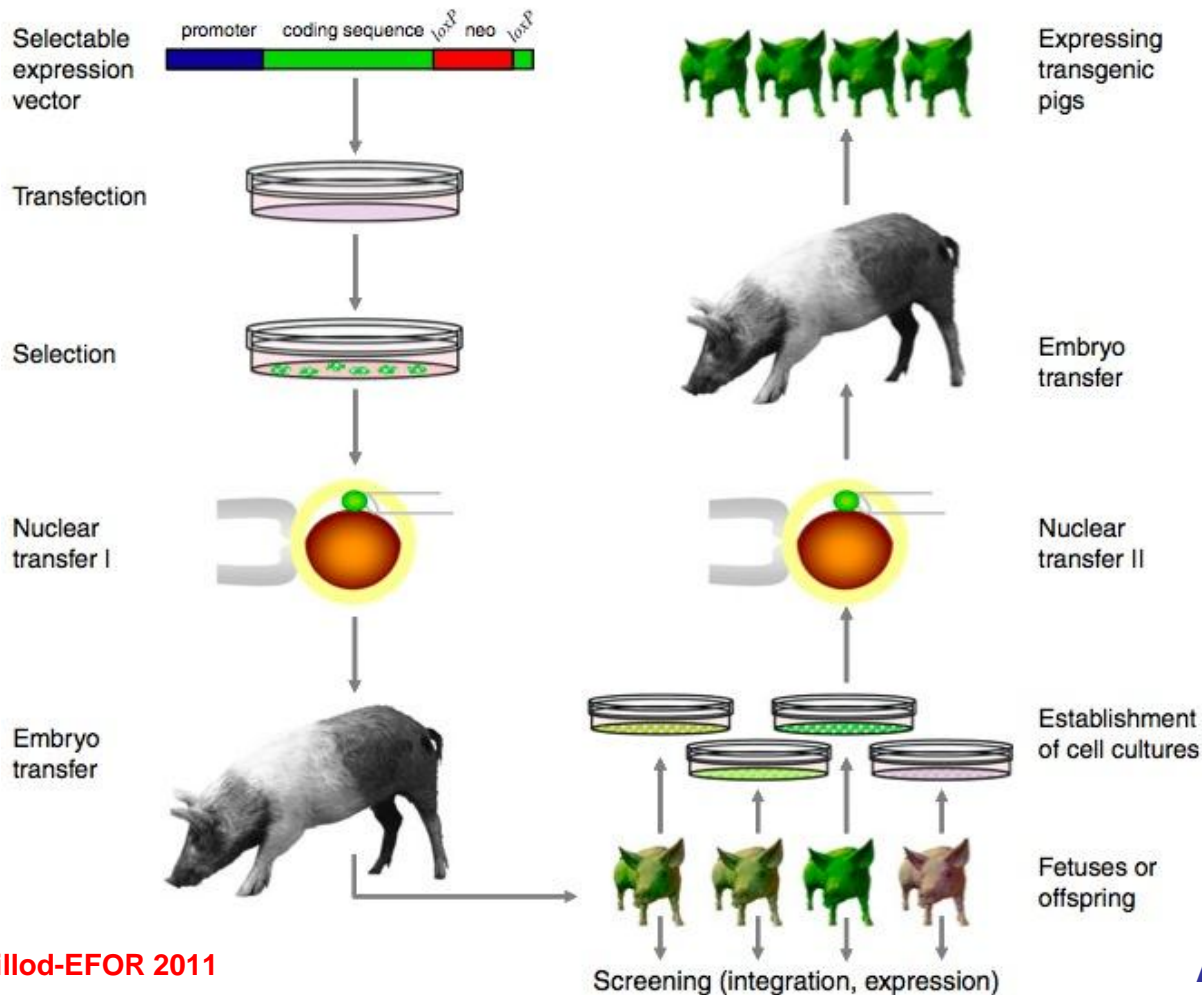
■ Clonage somatique



Ciblage

- Electroporation
- Lentivirus
- Episome
- Recombinaison
- ZFN

Clonage somatique



100% transgéniques



Clonage somatique

- Rendement faible
 - Mortalité foetale et périnatale
 - Toutes les naissances sont transgéniques
- Pas de mosaïcisme
- Nombre de copies contrôlé
- Site d'insertion contrôlé
 - Possibilité de KO



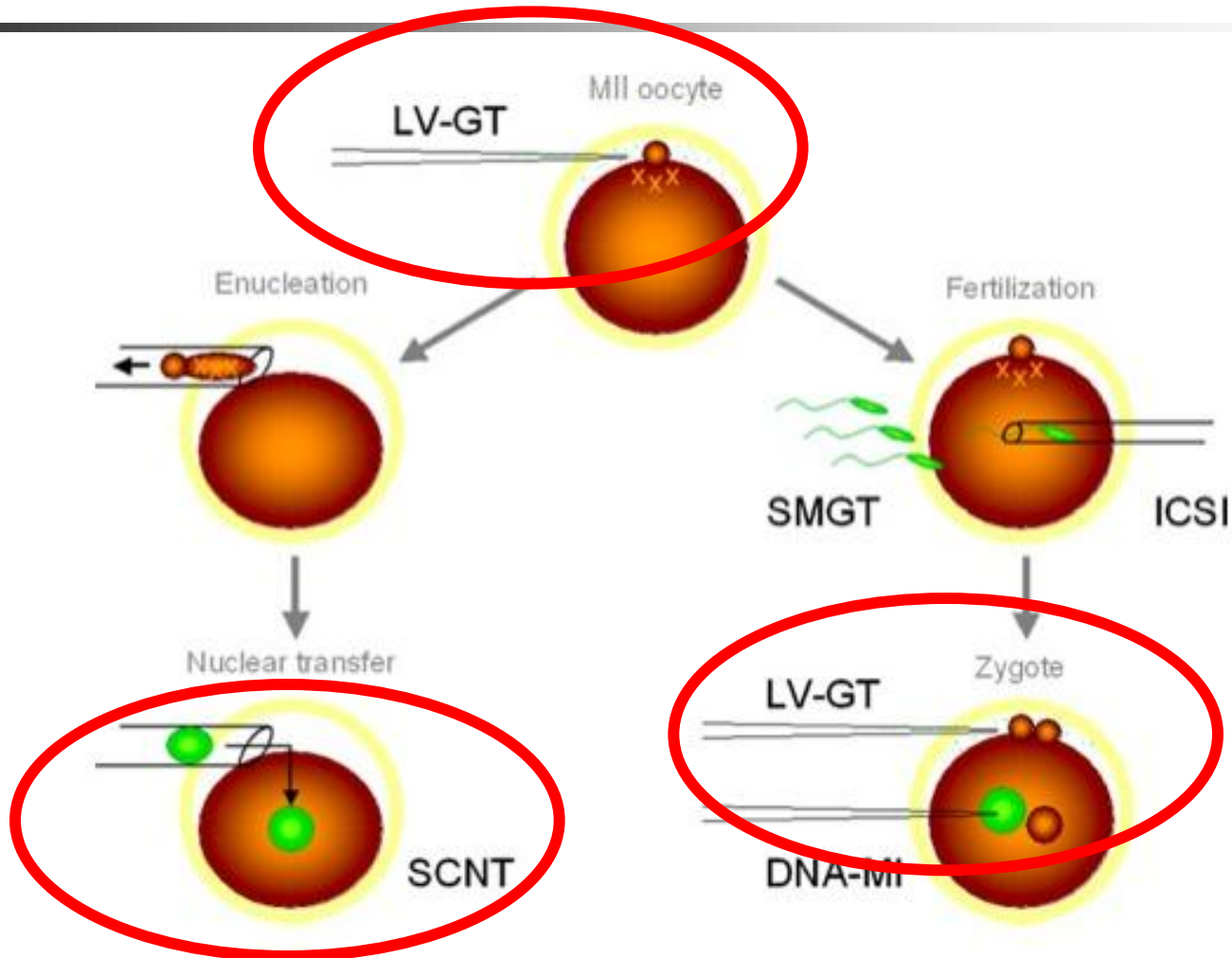
Clonage somatique

- α -1,3 Galactosyl transférase exprimée chez le porc, pas chez les primates
- Résidus α -1,3 galactosyl sur les cellules porcines
- Rejet hyper aigu

Production of α -1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs by Nuclear Transfer Cloning

Liangxue Lai,¹ Donna Kolber-Simonds,³ Kwang-Wook Park,¹
Hee-Tae Cheong,^{1,4} Julia L. Greenstein,³ Gi-Sun Im,^{1,5}
Melissa Samuel,¹ Aaron Bonk,¹ August Rieke,¹ Billy N. Day,¹
Clifton N. Murphy,¹ David B. Carter,^{1,2} Robert J. Hawley,³
Randall S. Prather^{1*}

Méthodologies



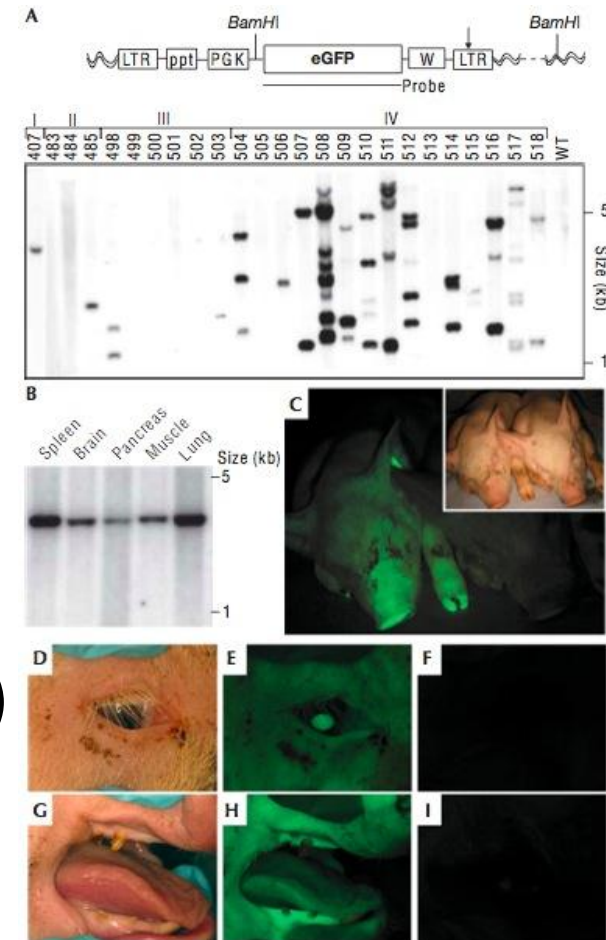
Transfection rétrovirale

■ Lentivirus

- Injection sous ZP
- Cellules SCNT
- Addition
- Knock down (shRNA)

■ Transposons (sleeping beauty)

■ Episomes





Transfection rétrovirale

- Rendement élevé
- Pas de mosaïcisme
- Nombre de copies non contrôlé
- Site d'insertion aléatoire
 - Mais préférence pour régions exprimées
- Limitation de taille (10 - 20 kb)
- Risque de régulation épigénétique (hyperméthylation, extinction d'expression, 30% des G1)

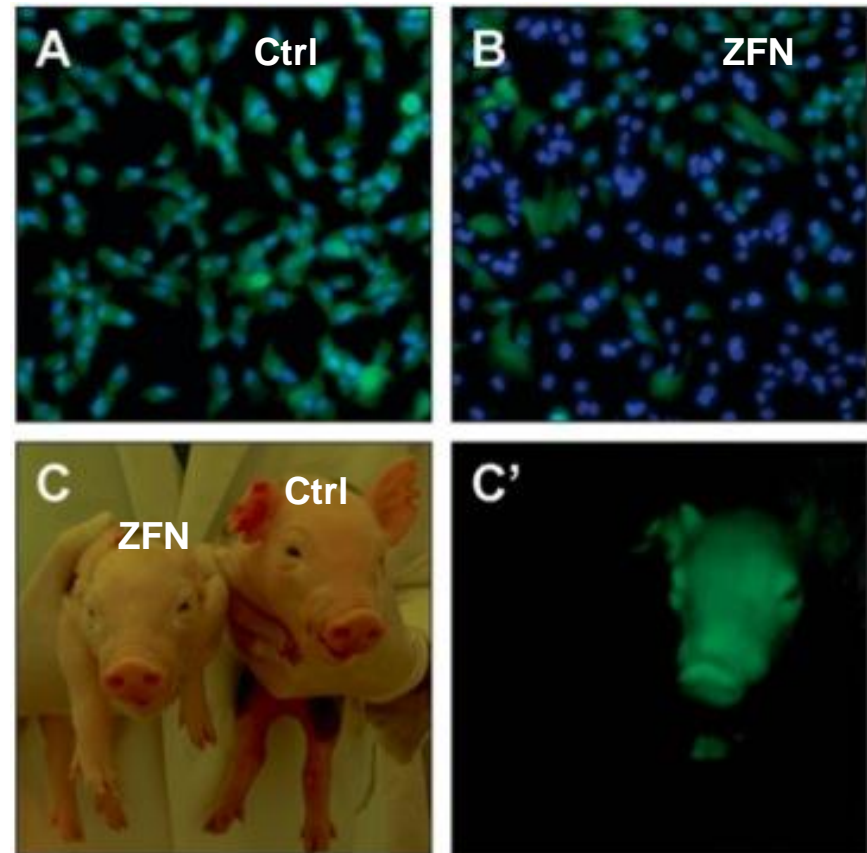
Zinc finger endonucleases

Gene Targeting With Zinc Finger Nucleases to Produce Cloned eGFP Knockout Pigs[†]

Fibroblastes eGFP+

- Fibroblastes de porcs eGFP+/-
- Paires de plasmides ZFN GFP
- Plasmide rapporteur (fluo rouge)
- FACS
- SCNT

Porcelets





Plan



- Introduction
- Méthodologies de transgénèse
- Exemples d'applications
- Conclusions



Applications

- Xénogreffes
- Modèles de pathologies humaine
- Génomique fonctionnelle
- Tests précliniques
- Cell tracking
- Protéines recombinantes (lait, sperme)
- Zootechnie



Applications

- **Xénogreffes**
- Modèles de pathologies humaine
- Génomique fonctionnelle
- Tests précliniques
- Cell tracking
- Protéines recombinantes (lait, sperme)
- Zootechnie



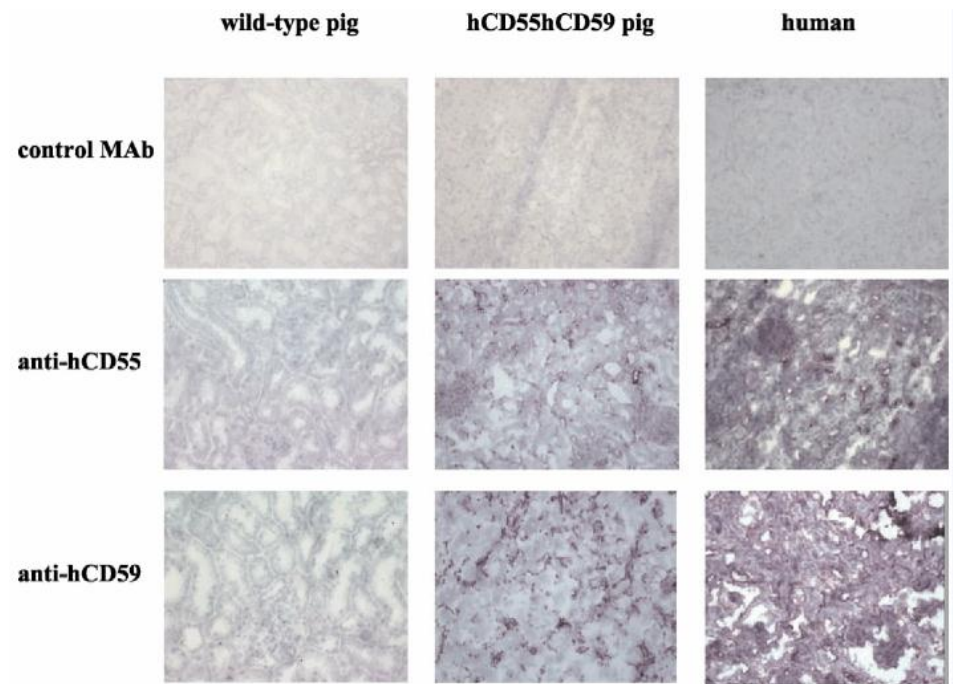
Xénogreffes

- Expression of human Complement Regulatory Proteins (CRPs) CD55 and CD59 by pig kidney tissues

- CRPs are species-specific

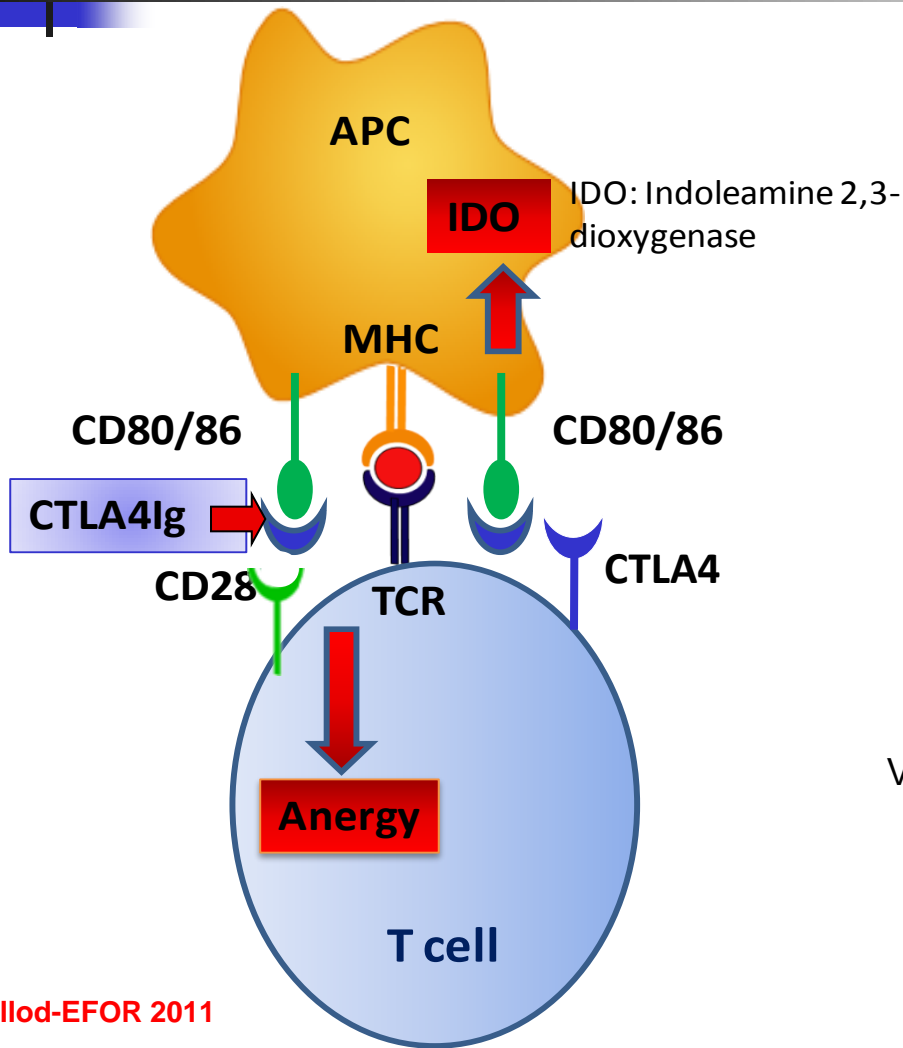
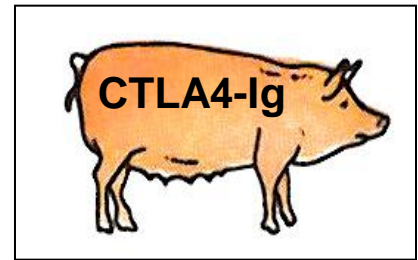
- Expression of hCD55 and CD59 CRPs block hyperacute rejection (HAR) of pig organs in primates (*Schmidt et al, 2003, Transplantation*)

- INRA's hCD55/59 transgenic pigs provide kidney grafts protected from HAR (*Ménoret et al, 2004, Transplantation*)



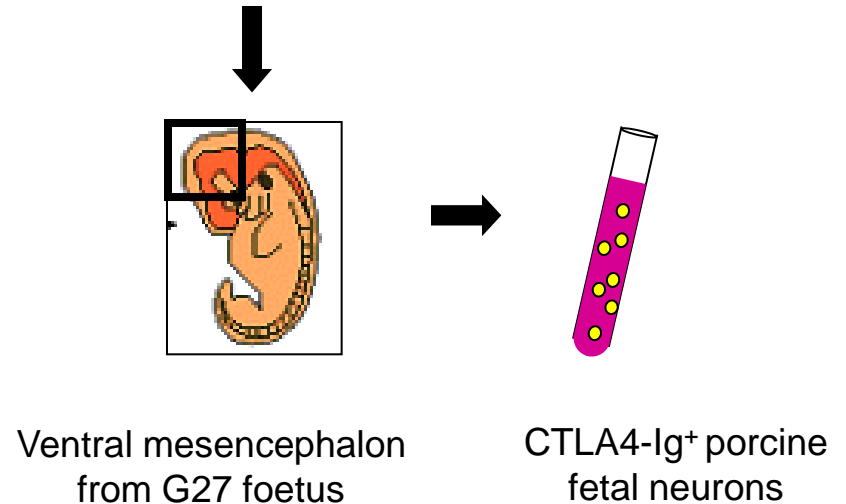
Ménoret et al, 2004, Transplantation

Xénogreffes

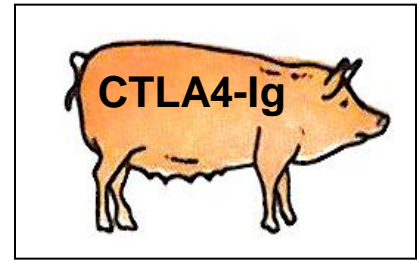


INRA's Transgenic pig
Neuron specific enolase - hCTLA4-Ig

Martin et al., 2005, Transgenic Research

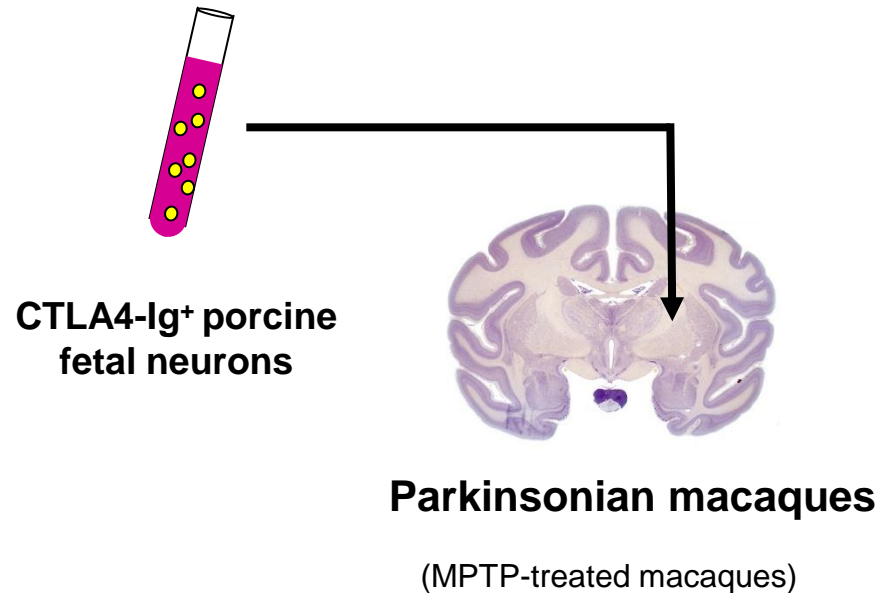


Xénogreffes



Parkinson induction by macaques
treatment with 1 - méthyle 4 -
phényl 1,2,3,6-tétrahydro
pyridine (MPTP)

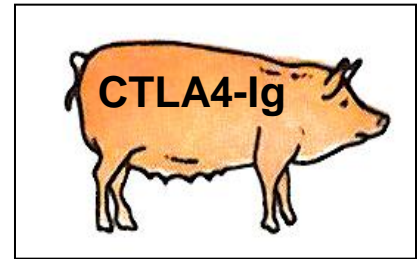
Transplantation of pig CTLA4-Ig
neurons in Monkey



B. Vanhove (INSERM, Nantes, France)
Ph. Hantraye (MIRCEN, Orsay, France)
E Cozzi (CORIT, Padova, Italie)
P. Mermillod (INRA, Nouzilly, France)
Mermillod-EFOR 2011



Xénogreffes



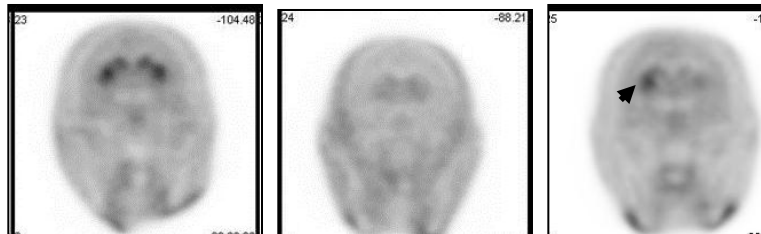
■ Résultats

- Behavioral tests

- CTLA4-Ig neurons : motor recovery
- Control neurons : No motor recovery

- Functional Imaging (18F-fluoro-dopa PET)

- CTLA4-Ig neurons: positive signal



Before

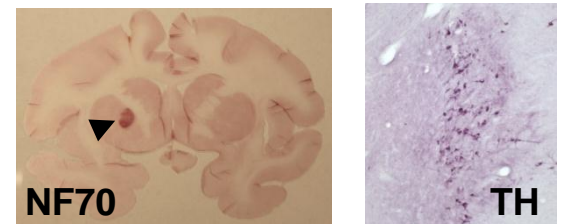
MPTP

6 months

- Control neurons: no signal

- Histology

- CTLA4-Ig graft: positive



NF70

TH

- Control neurons: In progress



Applications

- Xénogreffes
- **Modèles de pathologies humaine**
- Génomique fonctionnelle
- Tests précliniques
- Cell tracking
- Protéines recombinantes (lait, sperme)
- Zootechnie



Modèles de pathologies

- Approche difficile ou impossible chez la souris (longévité, taille, anatomie, absence de phénotype,...)
 - Athérosclérose (**eNOS**)
 - Alzheimer (**APP**)
 - Chorée de Huntington (HTT)
 - Mucoviscidose (**CFTR**)
 - Diabète
 - Rétinite pigmentaire (**RHO**)

Modèles de pathologies

- Rétinite pigmentaire
 - Souris : peu de photorécepteurs et distribution différente dans la rétine, œil petit
 - Porc : + gène porcin muté, perte des bâtonnets, dégénérescence des cônes, cécité

**Rétinite pigmentaire
Rhodopsine mutée
Wong et al, 2002**





Applications

- Xénogreffes
- Modèles de pathologies humaine
- Génomique fonctionnelle
- Tests précliniques
- Cell tracking
- Protéines recombinantes (lait, sperme)
- Zootechnie

Zootechnie

Table 3. Overview on successful transgenic livestock for agricultural production

| Transgenic trait | Key molecule | Construct | Gene transfer method | Species | Reference |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|------------|----------------------------|
| Increased growth rate, less body fat | Growth hormone (GH) | hMT-pGH | Microinjection | Pig | Nottle <i>et al.</i> 1999 |
| Increased growth rate, less body fat | Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) | mMT-hIGF-1 | Microinjection | Pig | Pursel <i>et al.</i> 1999 |
| Increased level of poly-un-saturated fatty acids in pork | Desaturase (from spinach) | maP ₂ -FAD ₂ | Microinjection | Pig | Saeki <i>et al.</i> 2004 |
| Increased level of poly-un-saturated fatty acids in pork | Desaturase (from <i>C. elegans</i>) | CAGGS-hfat-1 | Somatic cloning | Pig | Lai <i>et al.</i> 2006 |
| Phosphate metabolism | Phytase | PSP-APPA | Microinjection | Pig | Golovan <i>et al.</i> 2001 |
| Milk composition (lactose increase) | α -lactalbumin | genomic bovine α -lactalbumin | Microinjection | Pig | Wheeler <i>et al.</i> 2001 |
| Influenza resistance | Mx protein | mMx1-Mx | Microinjection | Pig | Müller <i>et al.</i> 1992 |
| Enhanced disease resistance | IgA | α ,K- α ,K | Microinjection | Pig, sheep | Lo <i>et al.</i> 1991 |

Carcasse

Qualité alimentaire

Environnement

Resistance aux maladies



Plan

- Introduction
- Méthodologies de transgénèse
- Exemples d'application
- **Conclusions**





Conclusions

- Intérêt du modèle porc en biomédecine
- Vaste champ d'applications
- Progrès techniques
 - vecteurs, ZFN, SCNT,...)
 - Addition, Knock down, Knock out
- Nombreuses demandes
- Absence d'offres en France
- Projets en émergence
 - IHU Nantes, xénogreffes
 - INRA Nouzilly, modèles pathologiques



Conclusions



SWINE IN BIOMEDICAL
RESEARCH
INTERNATIONAL
CONFERENCE

July 17-19, 2011
Chicago, IL

Merci de votre attention !!!!

