

TROISIÈME PARTIE :

BIOTECHNOLOGIES

ET

ANIMAL-MÉDICAMENT

Le clonage animal suscite de grands espoirs dans le domaine de la médecine humaine. Deux pistes sérieuses existent actuellement : les animaux « usines à médicaments » (ou bioréacteurs) et les animaux donneurs d'organes. Après avoir exposé les principes fondamentaux de ces techniques, nous ferons le point sur l'avancée actuelle de ces deux pistes.

[MCours.com](https://www.mycours.com)

A Les animaux usines à médicaments

.A.1. La place des animaux dans la production de protéines pharmaceutiques

A.1.1 Protéines pharmaceutiques et bactéries

Les protéines d'intérêt pharmaceutique ont commencé à être utilisées au cours des années 1920 avec l'insuline extraite des pancréas de porc. Même si celle-ci n'a posé aucun problème pendant des années, une insuline humaine a commencé à être préparée à partir de bactéries recombinantes vers 1980. Cette protéine s'est avérée plus efficace et a été adoptée par tous les diabétiques. Plusieurs autres protéines et notamment l'hormone de croissance humaine, ont ainsi été préparées. C'est également avec cette technique de production qu'on s'est affranchi du prion à l'origine de nombreux cas de **maladie Creutzfeldt-Jakob** chez les patients traités avec l'hormone issue de tissus humains.

Ces premiers succès ont rapidement montré la limite des bactéries qui sont incapables de synthétiser des protéines ayant une structure complexe. En effet, pour être stables et actives *in vivo*, ces protéines doivent subir de multiples modifications post-traductionnelles. De plus certaines protéines sont produites en si grande quantité par la bactérie qu'elles forment des agrégats d'où il est difficile d'extraire la protéine d'intérêt sans la dénaturer.

A.1.2 Protéines pharmaceutiques et eucaryotes

Les principales modifications sont le repliement, le clivage, l'association des sous-unités, la g-carboxylation et la glycosylation. Certains organismes eucaryotes comme les levures les champignons et les algues unicellulaires peuvent être cultivés à grande échelle et sont capables de réaliser des modifications post-transcriptionnelles [45,52,220,85]. Cependant, ces systèmes sont rapidement limités dans la copie des modèles de protéine humaine et peuvent donner des produits recombinants possédant des propriétés indésirables, comme une protéine peu active ou immunogène (présence de sucres spécifiques aux levures et champignons). Des levures modifiées génétiquement, exprimant des gènes codants pour des enzymes responsables de glycosylation, sont capables de sécréter des protéines possédant des carbohydrates similaires à ceux trouvés dans les protéines humaines [109]. Mais ces levures ne peuvent encore pas mimer complètement la synthèse de protéines humaines.

Des cellules d'insecte offrent une production plus adéquate [82] mais leur système de culture limite son utilisation à l'échelle du laboratoire. Ces cellules ne possèdent qu'un seul modèle de glycosylation. La culture de cellules métazoaires a aussi été utilisée comme bioréacteur mais est trop difficile à exploiter à grande échelle.

A.1.3 Protéines pharmaceutiques et plantes

Les plantes transgéniques offrent également d'intéressantes possibilités [98], la transgénèse étant relativement aisée chez les plantes. La culture de ces plantes est facile et permet de hauts niveaux de production. Il ne faut cependant pas oublier un facteur limitant, qui est le risque de dissémination incontrôlée de protéines. Les protéines étrangères peuvent être stockées dans les feuilles ou les graines selon le **promoteur** utilisé. Pour la production de protéines d'intérêt pharmaceutique il est difficile de purifier la protéine d'intérêt (présence de protéases) et de la séparer de substances mal tolérées par les patients (présence de polyphénols). Là encore, la glycosylation effectuée par la plante est différente (présence de xylose) de celle de l'homme et induit une réponse immunitaire néfaste chez l'homme.

Des expériences encourageantes [95,117] concernant la production de protéines pharmaceutiques par les plantes ont été menées, mais ces résultats ne peuvent prédire si cette technique va s'étendre au marché pharmaceutique.

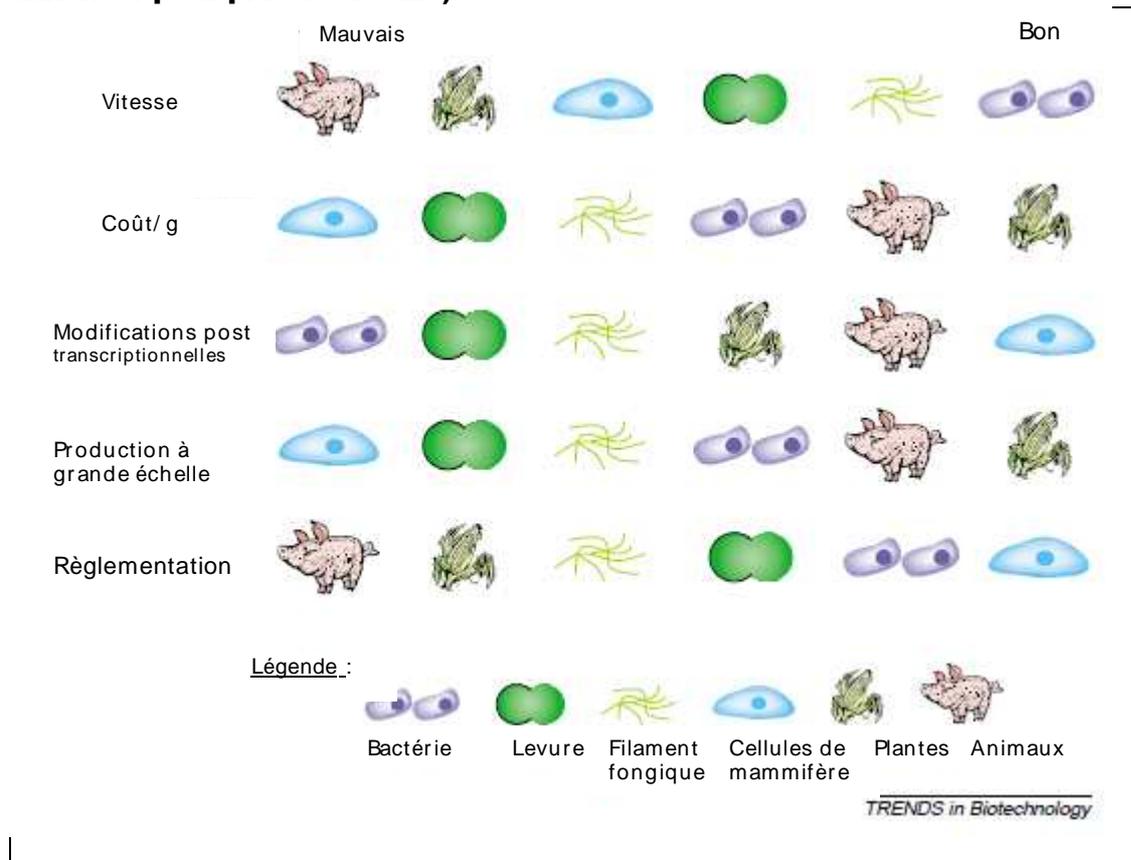
A.1.4 Protéines pharmaceutiques et animal

Les modifications post-transcriptionnelles recherchées ne se produisent complètement que dans des cellules de mammifères. Malgré le coût de production, elles sont cultivées dans des fermenteurs à l'échelle industrielle [7]. La culture de ces cellules permet de produire quelques kilogrammes de protéines recombinantes par an avec une glycosylation aléatoire de la protéine d'intérêt.

Il reste alors l'utilisation de l'animal entier comme support de production de protéines humaines : retour aux sources. La production par un animal transgénique laisse présager des coûts de productions bas avec une grande quantité de protéines de qualité. En contrepartie, la difficulté à séparer les protéines humaines des protéines de l'animal est un inconvénient. Une attention particulière doit être accordée à la préparation de protéines et à la présence d'éléments pathogènes actifs chez l'humain. De plus, certaines protéines recombinantes peuvent être actives et donc directement délétères pour l'animal producteur.

Les avantages de l'animal bioréacteur ne sont pas négligeables par rapport aux autres techniques évoquées (Fig.14, annexe 1). Ces animaux sont le support de nombreux espoirs.

Figure 14 Les qualités respectives des différents systèmes de production de protéines (cf annexe 1 pour plus de détails)



« vitesse » : du gène à la production, « coût/g » coût total de la marchandise, « production à grande échelle » : facilité et rapidité de production, « Réglementation » considération des produits ayant obtenu une autorisation jusqu'à présent.

Traduit de l'anglais. Source: Dyck M. K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M.-A. Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. *TRENDS in Biotechnology* Vol.21 No.9 September 2003

Nous allons voir comment ces animaux sont produits pour faire ensuite un tour d'horizon sur la production issue des animaux bioréacteurs.

A.2. Techniques de production d'animaux transgéniques

De multiples techniques existent pour créer des animaux transgéniques, selon les espèces, on retrouve :

A.2.1 La microinjection d'ADN dans les pronucléi embryonnaires

Cette méthode repose sur l'introduction d'un gène ou plus dans le pronucléus mâle d'un ovocyte fécondé. L'ADN introduit peut provoquer la sur- ou sous-expression de certains gènes. Comme l'insertion est ici aléatoire, le gène intégré a une forte probabilité de ne pas s'intégrer dans un site favorisant son expression. Le transgène peut aussi être à l'origine de « mutations par insertion » en perturbant la fonction des gènes endogènes selon le site d'intégration [68]. L'œuf fécondé et génétiquement modifié est réimplanté dans l'oviducte d'une femelle porteuse. Si le transgène a été intégré trop tardivement, après le début de mitose des blastomères, les cellules de

l'embryon ne contiennent alors pas toutes le **transgène**. Les animaux (souris, rat, lapin, porc, poisson) ainsi obtenus sont des animaux **mosaïques** ou **chimères**. Un transfert de gène idéal doit avoir le transgène présent dans la lignée de cellules germinales pour pouvoir assurer une descendance également transgénique. La première génération (F1) peut alors se composer de chimères. Des croisements consanguins doivent alors être effectués sur 10 à 20 générations jusqu'à ce que des animaux transgéniques **homozygotes** soient obtenus et que le transgène soit présent dans toutes les cellules de l'animal.

Malgré toutes les difficultés à surmonter, cette technique a été utilisée jusqu'à très récemment pour produire les premiers ruminants transgéniques et des ruminants « bioréacteurs » [40,73,329]. Étant donné que, seule une petite proportion d'animaux intègrent le transgène, plus de 1000 ovocytes bovins, 300 ovins et 200 caprins [222,258,310] doivent être injectés et transférés chez des receveuses pour produire un seul ruminant transgénique. Pour parvenir à un animal transgénique « utilisable », plusieurs lignées de ruminants transgéniques sont constituées pour optimiser les chances d'obtenir au moins une lignée avec un niveau élevé d'expression du transgène. En utilisant cette technique, la production d'un troupeau entier de ruminants transgéniques nécessite au moins deux générations, ce qui est peu efficace et très coûteux [258,310].

Faute de pouvoir fabriquer à volonté du bétail transgénique, « recopier » à l'infini l'animal transgénique obtenu à grand-peine a été envisagé. Cependant, la procédure de clonage somatique (cf. paragraphe A.2.5) ne s'avère guère plus efficace et cette approche ne s'avèrerait pas moins onéreuse, une amélioration des procédures est nécessaire.

A.2.2 L'usage de vecteurs lentivirus ou transposons

Cet usage a amélioré l'efficacité de la microinjection. Il a été utilisé avec succès chez le porc et les ruminants [128].

Des embryons sont infectés par un ou plusieurs virus recombinants. Immédiatement après l'infection, le rétrovirus produit des copies d'ADN de ses ARN, ces copies sont intégrées au hasard dans la cellule hôte généralement sans réarrangement ni délétion. Le transfert de gènes par cette méthode approche des 100% de cellules transférée [68]. Cependant, comme pour la microinjection, les inconvénients de l'insertion au hasard sont toujours présents. Pour des raisons de sécurité, les rétrovirus utilisés pour créer des animaux transgéniques, ne sont capables d'infecter que l'espèce concernée, évitant toute contamination involontaire à des lignées humaines.

L'intégration d'ADN étranger est toutefois limitée en taille (<15 kb), le nombre d'intégrations est difficile à contrôler et des interférences entre l'expression du transgène et les séquences du rétrovirus sont possibles. Là encore des chimères sont obtenues.

A.2.3 Le sperme comme vecteur

Le sperme, utilisé comme vecteur [10,36,88,121,159], est modifié pour être porteur d'ADN étranger. Il est utilisé ensuite pour effectuer une fécondation *in vitro*. L'implantation de spermatogonies transfectées peut également être envisagée comme méthode de fécondation *in vivo* [23].

Cette technique a été utilisée avec succès chez la souris et le porc [36,121,128].

A.2.4 La transgénèse dans des cellules pluripotentes

Les cellules pluripotentes (indifférenciées) sont soit des cellules souches embryonnaires soit des cellules souches germinales. La séquence d'ADN choisie est insérée par recombinaison homologue dans une culture *in vitro* de cellules souches embryonnaires. Ces modifications génétiques ciblées incluent le remplacement, l'inactivation et la mutation spécifique de certains gènes (un allèle ou les deux) à des sites actifs du génome, ainsi que l'addition précise de gènes étrangers au génome. Les cellules modifiées sont alors intégrées à un embryon au stade blastocyste. L'animal obtenu est un animal chimère, possédant des cellules normales et des cellules transformées. Cette méthode est utilisée pour inactiver des gènes ciblés (méthode **knock-out**). Pour une raison inconnue, les cellules pluripotentes sont impossibles à obtenir chez d'autres animaux [68,128] que la souris et récemment le poulet.

A.2.5 La transgénèse dans des cellules somatiques : transfert nucléaire

Cette méthode crée des animaux clonés par transfert nucléaire. Elle a été utilisée pour créer des ruminants et porcs transgéniques [68,128]. Dans l'optique de la création de lignées d'animaux transgéniques, l'intérêt de la technique de transfert de gènes par microinjection est plutôt limité. Le clonage somatique ouvre d'autres perspectives.

Des cellules issues d'un embryon, d'un fœtus ou d'un tissu adulte sont transfectées *in vitro* par les techniques standard chimiques (lipides, phosphate de calcium), physiques (électroporation, injection directe, bombardement de gène) ou transfection rétrovirale. La combinaison des cultures cellulaires et de la transgénèse autorise des modifications précises du génome par **recombinaison homologue**, restreintes précédemment à l'emploi de cellules souches. Les cellules transfectées sont ensuite sélectionnées selon l'intégration du transgène, une lignée cellulaire stable est alors établie. Cette lignée cellulaire peut également provenir d'une biopsie issue d'un animal transgénique produit d'une autre façon. Comme les cellules cultivées peuvent être congelées et stockées, la source de noyaux donneurs ne constitue pas un facteur limitant, permettant la production d'un grand nombre d'individus.

Le matériel génétique d'un ovocyte est ensuite enlevé puis remplacé par celui issu des cellules transgéniques (Fig. 15). L'embryon transgénique ainsi obtenu dérive de la transplantation d'un seul noyau génétiquement modifié dans un ovocyte énucléé. Toute notion de mosaïcisme est éliminée, en même temps la transmission du transgène à la lignée germinale est obligatoirement assurée. Avec une sélection appropriée de la lignée cellulaire transgénique, la majorité des animaux transgéniques exprime le transgène correctement. Cette technique réduit significativement le nombre d'animaux requis pour produire une lignée transgénique [14,253]. Les temps de production de protéines recombinantes par ces animaux transgéniques sont réduits par l'usage du transfert nucléaire [22].

Bien que séduisant, ce protocole associant clonage et transgénèse connaît quelques limites et soulève d'autres problèmes concernant le bétail.

Le nombre de mères porteuses pleines après le transfert d'embryon est faible et la mortalité postnatale est élevée [270]. Des différences sont notées entre les espèces, chez les chèvres par exemple, des taux de réussite acceptables sont rapportés sans haute incidence d'avortement comme chez les bovins [13,145].

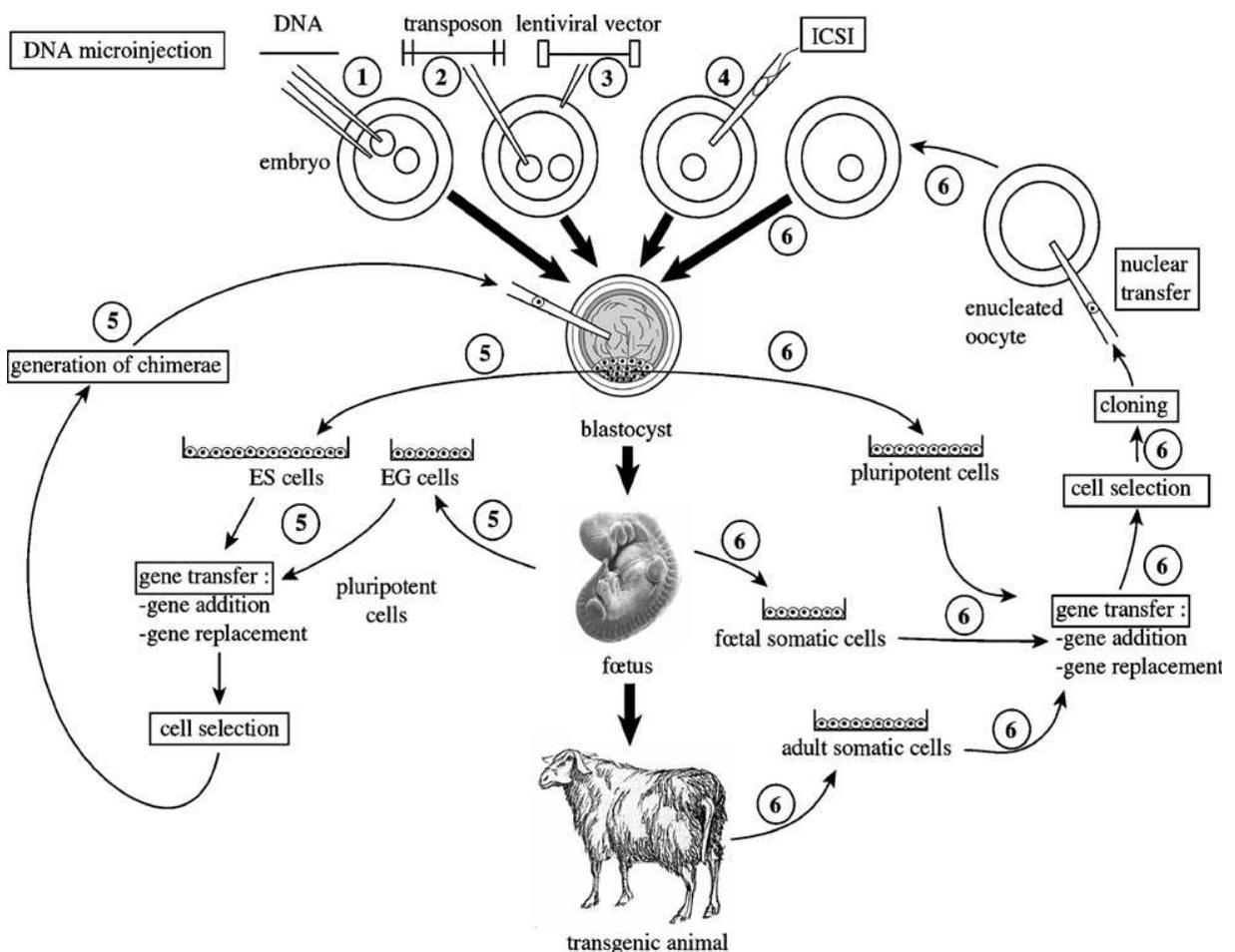
Certains types cellulaires paraissent être plus facilement génétiquement modifiables que d'autres ; l'efficacité du transfert nucléaire et la viabilité de la progéniture en est modifiée [142,309,316].

Chez les bovins par exemple, le **fibroblaste** est considéré comme un bon candidat aux manipulations génétiques. Il possède une des caractéristiques essentielles pour utiliser cette technique : une grande durée de vie en culture primaire. En effet, les cellules doivent être maintenues en culture longtemps pour parvenir à trier celles où l'insertion du transgène est correcte : les colonies transfectées doivent croître afin d'obtenir une population suffisante pour envisager la sélection (testage génétique).

Ces résultats montrent qu'avec une sélection appropriée de cellules de donneurs et d'autres améliorations techniques, les problèmes associés au transfert nucléaire devraient diminuer.

Ces différentes méthodes ont été décrites dans de récentes revues [125,126,71,303], elles sont résumées dans la figure 15 suivante.

Figure 15 Différentes méthodes pour produire des animaux transgéniques.



- (1) Transfert d'ADN par microinjection directe dans le pronucléus ou le cytoplasme de l'embryon
- (2) Transfert d'ADN par transposon : le gène d'intérêt est introduit dans le transposon qui est injecté dans un pronucléus
- (3) Transfert d'ADN par un lentivirus vecteur : le gène d'intérêt est inséré dans le lentivirus vecteur qui est injecté entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte ou de l'embryon
- (4) Transfert d'ADN par le sperme : le sperme est incubé avec un gène étranger et injecté dans le cytoplasme de l'ovocyte pour une fécondation par ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection)
- (5) Transfert d'ADN par des cellules pluripotentes : l'ADN est introduit dans une lignée de cellules pluripotentes (ES: embryonic stem cells ou cellules souches embryonnaires : lignée établie à partir d'un embryon jeune, EG: embryonic germ cells: lignée établie à partir des cellules germinales primaires des gonades d'un fœtus). Les cellules pluripotentes contenant l'ADN sont injecté dans un embryon au stade précoce pour créer un animal chimérique portant le gène étranger;
- (6) Transfert d'ADN par clonage : le gène étranger est introduit dans des cellules somatiques, leur noyau est introduit dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé pour créer des clones transgéniques. Les méthodes 4, 5 et 6 permettent l'addition du gène au hasard et l'intégration ciblée du gène par recombinaison homologue pour l'addition ou le remplacement de gène incluant la méthode de « knock out » ou de « knock in ».

Source : Houdebine L.-M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 (2009) 107–121

A.2.6 Le chromosome artificiel

L'expression du transgène étant améliorée par l'ajout de séquences d'ADN spécifiques, le matériel à transférer est très long ; or les moyens de transgénèse vus précédemment, ont une longueur d'intégration du transgène limitée. C'est pourquoi le chromosome artificiel est intéressant, il peut en effet, contenir de grands fragments d'ADN de plus d'une mégabase (Mb). Contrairement aux méthodes classiques de transgénèse, le microchromosome n'est pas intégré à l'ADN hôte et se comporte comme un chromosome indépendant, porté par la cellule au cours des divisions. Les chromosomes artificiels ont été initialement dérivés des levures, ils contiennent tout ce qui est nécessaire à leur fonctionnement : des télomères, une région centromérique, des origines de réplication. Des essais d'intégration d'un YAC (Yeast Artificial Chromosome) chez les rongeurs ont produit des résultats encourageants [21,249] ; un YAC de 210 kb microinjecté dans des pronucléi de rats a produit des rats transgéniques exprimant l'alphalactoglobuline ou encore le facteur de croissance humain dans leur mamelle [86,87]. Cependant les YAC s'avèrent instables avec des délétions intempestives de l'insert rajouté artificiellement. L'utilisation de BAC (Bacterial Artificial Chromosome), plus stables mais avec une possibilité d'insertion inférieure a été testée, des souris transgéniques ont ainsi été créées [326].

Récemment, des chromosomes artificiels de mammifères (MAC) ont été créés avec soit des éléments chromosomiques endogènes des YAC, soit des éléments extrachromosomiques de virus ou de BACs et chromosome artificiel P1 (PAC) [308]. Diverses approches ont été utilisées pour créer des MAC avec les composants nécessaires à une réplication correcte [81,112,116,288]. Des chromosomes artificiels humains (HAC) portant les loci des chaînes lourdes et légères des **immunoglobulines**, ont été créées par plusieurs équipes de recherche [134,135,152,153,297,298].

Après le succès de l'introduction des HAC chez les souris pour produire des anticorps **monoclonaux** humains, la technique est développée chez le bétail qui a des capacités de production plus grandes. Ainsi, en créant une lignée de cellules possédant un chromosome artificiel puis en utilisant la méthode du transfert nucléaire, des animaux transgéniques plus complexes peuvent être créés [154].

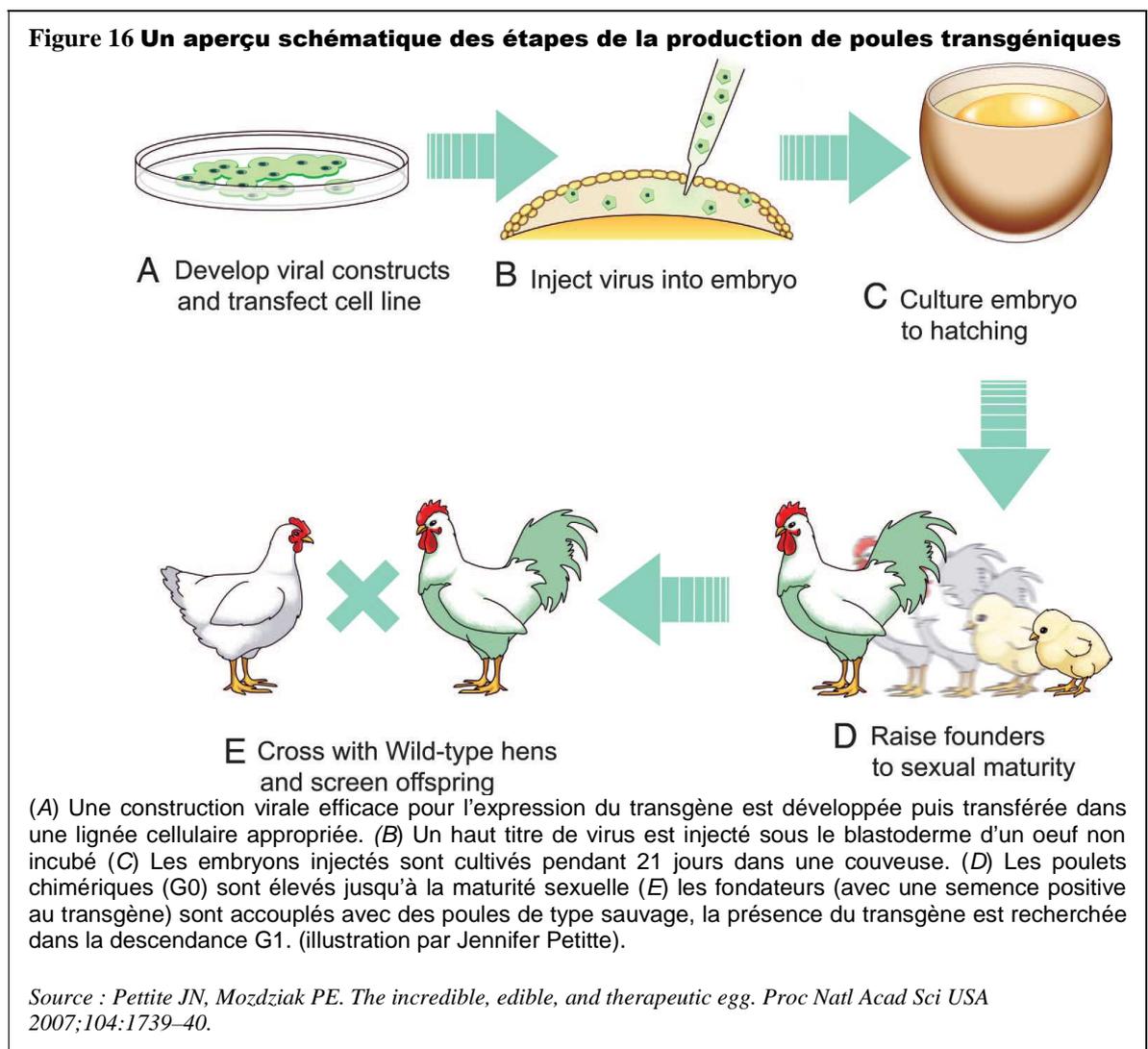
A.2.7 La production d'oiseaux transgéniques

L'obtention de poules transgéniques s'est heurtée à de nombreuses difficultés pendant 15 ans, cependant des anticorps et un interféron ont été récemment obtenus dans le blanc d'œuf [7, 126].

+

La physiologie de la reproduction des oiseaux, différente par rapport aux mammifères, rend les techniques classiques difficiles à mettre en œuvre. L'embryon aviaire se développe à partir d'un œuf jaune assez grand, enveloppé d'une coquille dure après la fécondation. L'embryon se développe ensuite dans l'œuf couvé ou incubé. Lorsque l'œuf fécondé est pondu, son stade de développement dans le jaune d'œuf est d'environ 60000 cellules. La plupart des modifications génétiques des mammifères nécessitent la manipulation d'ovocytes fécondés ou d'embryons à un stade précoce, issus de femelles donneuses. Une nouvelle manipulation est nécessaire pour transférer l'embryon modifié à une femelle receveuse. La grande taille et la fragilité du jaune d'œuf ne permettent pas ces manipulations chez l'oiseau. L'injection de transgène ou le transfert nucléaire à des stades précoces n'est donc pas envisageable.

Les trois stades clés utilisés sont les suivants : l'œuf juste fécondé, l'embryon dans les œufs juste pondus, des embryons après 2 jours d'incubation lorsque les cellules germinales primaires (précurseur des gamètes) sont accessibles [165]. Comme pour créer les mammifères transgéniques, des virus vecteurs ont été utilisés. Les premiers vecteurs viraux, dérivés de rétrovirus aviaires, avaient un taux de production d'oiseaux transgénique faible (10%). L'usage d'un lentivirus dérivé du virus de l'anémie infectieuse équine a été développé, avec une obtention de 100% d'animaux chimériques et une transmission à la lignée germinale plus fréquente. Concrètement, le virus porteur du transgène est « emballé » dans une enveloppe protéique provenant du virus de la stomatite vésiculaire, après culture sur cellules, les vecteurs sont injectés dans les œufs juste pondus qui sont ensuite incubés. L'embryon en développement est ainsi transfecté et de l'œuf naît une chimère (Fig.16).

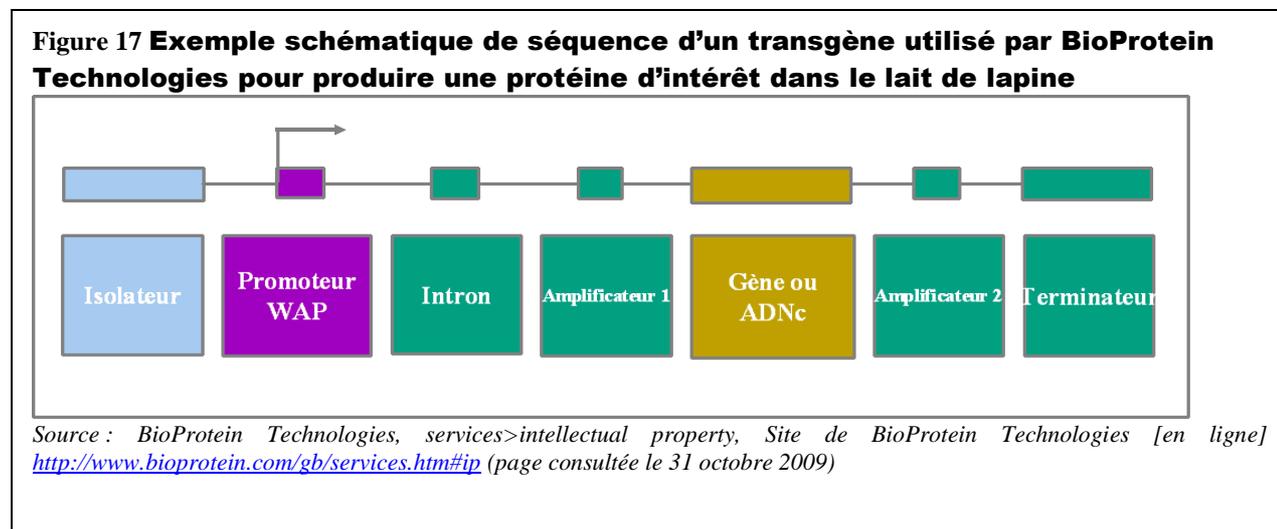


Quelle que soit la technique utilisée, le taux de réussite mesuré en nombre de naissances d'animaux vivants porteurs du transgène est très faible. Il n'en reste pas moins que les chercheurs persistent et que les animaux transgéniques ont de nombreux usages aujourd'hui.

.A.3. Production de « bioproduits »

A.3.1 Optimisation de l'expression du transgène

Pour être exprimé d'une manière correcte, le transgène doit contenir un promoteur (éléments de séquence dispersés sur lesquels se fixent des facteurs de transcription), des **enhancers** (plusieurs éléments de séquence très proches sur lesquels se fixent des facteurs de transcription), des isolateurs (limitant les interactions entre les promoteurs et leurs éléments régulateurs tels que les enhancers, Ces séquences pourraient agir sur la transcription, soit comme de simples barrières en bloquant la progression de protéines régulatrices le long de la chromatine, soit en modifiant l'organisation ou la structure des fibres de chromatine), des introns et un terminateur de transcription [126]. Ainsi des constructions moléculaires permettent de piloter le fonctionnement d'un transgène dans l'espace (dans un tissu donné), et dans le temps (à certains moments de la vie fœtale ou adulte). Pour la majorité des animaux réacteurs, c'est dans le lait que les protéines d'intérêt pharmaceutique sont produites. Une expression maximale dans la mamelle est alors recherchée, l'expression dans le lait est effective avec les promoteurs de gènes des protéines du lait [97,239]. Il est possible de transférer de façon stable les cellules somatiques bovines avec une construction contenant un gène humain lié à un promoteur (connu pour fournir une expression élevée du transgène dans la glande mammaire). L'expression dans le blanc d'œuf est possible en utilisant un promoteur du gène de l'ovalbumine. L'utilisation de longs fragments d'ADN contenant le promoteur spécifique stimule encore plus l'expression du transgène étranger (Fig.17). Cette stimulation a été démontrée pour le promoteur du gène d'une protéine du lait : WAP gène (Whey Acidic Protein) [235]. Des éléments de ce long fragment d'ADN devraient être identifiés pour construire prochainement des vecteurs compacts exprimant le transgène plus efficacement. [94].



Construire un vecteur d'expression efficace pour produire une protéine thérapeutique n'est pas une opération standard comme le montrent les deux exemples suivants de production de vaccins recombinants.

- ➔ Des vaccins recombinants contre la malaria sont actuellement en étude [92]. Une des protéines initialement obtenue dans le lait de souris [283] est maintenant en cours de production dans le lait de chèvre. D'une façon inattendue l'antigène produit dans le lait de souris avait perdu ses propriétés de vaccination parce qu'il était glycosylé.

- ➔ Le second exemple est la production de protéines VP2 et VP6 d'un rotavirus chez un lapin transgénique [271]. Le génome du rotavirus est formé de quelques fragments d'ARN indépendants. Le virus est répliqué dans le cytoplasme et ses protéines ne sont pas sécrétées individuellement. Les modifications suivantes des séquences nucléotidiques de VP2 et VP6 ont été réalisées : élimination des sites d'épissage et de quelques sites de glycosylation, addition d'un peptide signal et adaptation des codons pour optimiser l'expression des deux ADNc dans la mamelle de l'animal. Les ADNc modifiés ont été introduits dans un vecteur adapté [126]. Cette construction a rendu possible la co-sécrétion dans le lait des deux protéines virales jusqu'à une concentration de 500 mg/ml. Ces protéines produites par le lapin sont capables de protéger la souris contre le virus [272].

A.3.2 Les différents systèmes animaux transgéniques

Les animaux traditionnels d'élevage comme les bovins, moutons, chèvres, porcs et même lapins ont des avantages significatifs pour la production de protéines recombinantes par rapport aux systèmes classiques de production de protéines recombinantes (cf. § plus haut, A.1. la place des animaux dans la production de protéines pharmaceutiques). Le site de production le plus prometteur pour les protéines recombinantes, est la glande mammaire. Des fluides corporels sont également explorés comme le sang, l'urine (l'épithélium de la vessie sécrète la protéine recombinante mais les concentrations obtenues sont très basses [146,241,328]), le liquide séminal [70], l'hémolymphe de larve d'insecte [176].

Récemment le blanc d'œuf [166,330] a été utilisé ou encore les glandes à soie [237].

Isoler de l'hémoglobine humaine recombinante produite par le porc dans son propre système circulatoire a été essayé, mais la tâche est difficile en raison de la grande similitude entre l'hémoglobine humaine et l'hémoglobine porcine [290]. Le sang n'est pas utilisable la majorité du temps, il ne peut pas stocker de hauts niveaux de protéines recombinantes. De plus, les protéines recombinantes dans le sang peuvent altérer la santé des animaux alors que la production dans le lait évite tous ces problèmes. La production de protéines recombinantes a été étudiée chez plusieurs espèces dont voici un aperçu des avantages et inconvénients de chacune :

Lapins

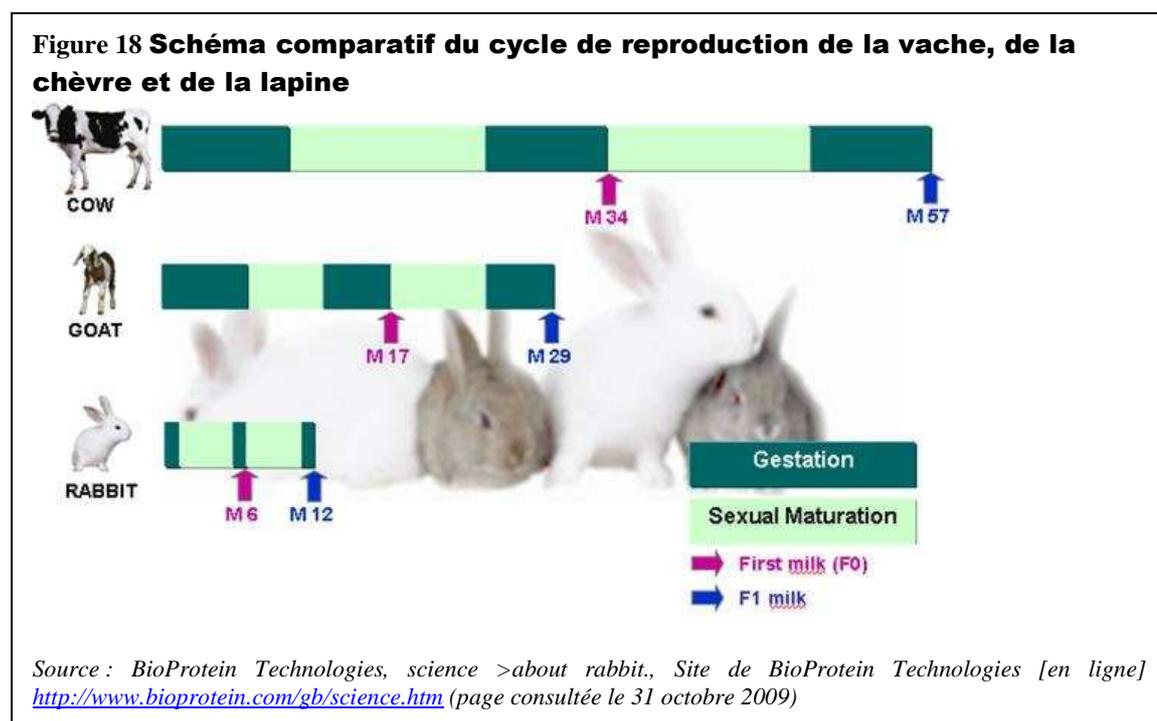
Cette espèce offre de nombreux avantages. Le lapin est phylogénétiquement plus proche des primates que ne le sont les rongeurs et les ruminants. La glande mammaire des lapins possède des capacités post-transcriptionnelles plus proches de celles de l'Homme comparées aux capacités des ruminants. La glande mammaire produit des protéines hypo-fucosylées ce qui présente un intérêt pour la production d'anticorps monoclonaux à mécanisme d'action ADCC. Des sialilations avec un mélange de formes NANA (N-Acetyl Neuraminic Acid) et NGNA (N-Glucosyl Neuraminic Acid) sont réalisées. La plupart des lignées CHO utilisées en bioproduction génèrent des protéines hautement fucosylées et avec 100% de formes NGNA sialilées, alors que les protéines humaines sont NANA sialilées. C'est donc un animal de choix pour produire des glycoprotéines humaines et des vaccins recombinants.

Un temps de gestation très court (1 mois) et une maturation sexuelle rapide (4 mois pour les femelles et 5 mois pour les mâles), 8 à 10 portées par an de 8 lapereaux en moyenne, permettent de générer rapidement (Fig.18 et Tabl.8) une lignée d'animaux transgéniques avec un faible coût de revient. La première lactation des femelles fondatrices est obtenue 6 mois après l'étape de micro-injection du transgène dans les embryons. En parallèle, les mâles fondateurs sont croisés avec des

femelles non-transgéniques pour donner naissance à la deuxième génération de lapins transgéniques qui permettra une rapide montée en puissance industrielle. Le délai nécessaire pour pouvoir commencer la traite des lapins de deuxième génération est approximativement de 12 mois après les premières micro-injections.

Insensible au prion et n'étant pas la cible de maladies sévères transmissibles à l'homme, l'exploitation dans un statut sanitaire contrôlé est facile.

La production de lait est relativement élevée jusqu'à 250 ml de lait par jour de lactation, soit un volume de 10 à 15 l de lait par an et par femelle. En fonction du niveau d'expression du transgène, la concentration en protéine recombinante est comprise entre 0.1 et 10 g par litre de lait. La majorité des protéines thérapeutiques actuellement sur le marché ont des indications qui nécessitent une production mondiale annuelle inférieure à 10 kg de protéines, ce qui reste adapté pour le lapin.



Porcs

Comme les lapins, les porcs sont capables de produire des protéines avec des modifications post-transcriptionnelles proches de celles de l'homme. Ses caractéristiques de reproduction sont aussi favorables (Tabl.7) avec une gestation courte, une première portée précoce, des truies prolifiques. Les porcs peuvent être élevés avec un statut sanitaire contrôlé de par l'existence de lignées sans pathogènes. Les truies produisent de bien plus grandes quantités de lait (300 l/an) que les lapines mais ont un coût de production qui reste plus élevé.

Ce n'est pas sur le lait que se distingue le porc bioréacteur mais sur le liquide séminal [68]. En effet, la semence de porc contient 30 mg de protéine par litre et le verrat peut produire 200 à 300 ml de semence 3 fois par semaine avec un total de 6-9 g de protéine par éjaculat. La sécrétion de la protéine recombinante étant exclusivement exocrine, le risque d'interaction avec la physiologie de l'animal est minimisé. Avec une maturité sexuelle à 110-125 jours et une production de sperme continue sur toute l'année, le porc est donc un bioréacteur à explorer. Des recherches sur les séquences régulatrices et les promoteurs conduisant à l'expression de protéines dans les glandes sexuelles mâles des porcs sont en cours.

Ruminants

Les ruminants sont plus appropriés pour produire de grandes quantités de protéines. Il a été calculé que la quantité d'antithrombine III obtenue par an avec les chèvres transgéniques était l'équivalent de l'utilisation de 90 000 échantillons de sang humain [71]. Cependant, leur maturation post-transcriptionnelle des protéines n'est pas aussi bien que celle des lapins ou des porcs. Le cycle de reproduction requiert un temps assez long (Fig.18 et Tabl.7), de la naissance à la première lactation. GTC therapeutic [105] rapporte un délai de 18 mois entre l'introduction du transgène et la première lactation de ses chèvres et une durée de 28 mois pour une première lactation de chèvre obtenue par un fondateur mâle.

Avec les niveaux d'expressions moyens dans le lait, le volume moyen de lait produit, l'efficacité de la purification, les estimations suivantes sont données en 1999, par an [27] :

- ✦ 5 400 vaches nécessaires pour produire les 100 000 kg d'albumine sérique humaine requis par an dans le monde
- ✦ 100 chèvres pour 100 kg d'anticorps monoclonaux
- ✦ 5 400 vaches nécessaires pour produire les 100 000 kg d'albumine sérique humaine requis par an dans le monde
- ✦ 100 chèvres pour 100 kg d'anticorps monoclonaux
- ✦ 4 500 moutons pour produire 5 000 kg d'alpha-antitrypsine (a-AT)
- ✦ 75 chèvres pour 75 kg d'antithrombine III (ATIII).

Dix ans après, les estimations d'effectifs sont revues à la baisse (Tabl.8), les techniques de production s'étant améliorées.

Tableau 7 Comparaison du temps requis pour obtenir des protéines recombinantes chez les différentes espèces d'animaux transgéniques

	Rabbit	Pig	Sheep	Goat	Cow
Gestation time (months)	1	4	5	5	9
Age at sexual maturity (months)	5	6	8	8	15
Time between gene transfer and first lactation (months)	7	16	18	18	33
Number of offspring	8	10	1-2	1-2	1
Annual milk yield (liters)	15	300	500	800	8000
Recombinant protein per female per year (kg)	0.02	1.5	2.5	4	40

Source : Houdebine L.-M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 (2009) 107-121

Tableau 8 Niveau possible de production de protéines recombinantes dans le lait des différentes espèces d'animaux transgéniques

Protein	Estimated need (kg year ⁻¹)	Species	Herd size
Human serum albumin	100,000	Cow	5,400
α-1-Antitrypsin	5,000	Sheep	4,300
Monoclonal antibody	100	Goat	58
Anti-thrombin-III	75	Goat	43
Factor IX	2	Pig	4
Protein C1 inhibitor	1	Rabbit	50

Source : Houdebine L.-M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 (2009) 107-121

Poules

La difficulté à obtenir des oiseaux transgéniques a été surmontée récemment [166,303,330] et l'œuf est désormais considéré comme un système prometteur. L'utilisation de poules transgéniques combine de nombreux avantages.

La poule a un cycle de reproduction court par rapport aux ruminants avec une capacité de multiplication exponentielle. Un coq peut être accouplé avec 10 poules par jour et chaque poule peut pondre 10 œufs fécondés. Ainsi, une fois un coq transgénique créé, celui-ci peut engendrer plus de 100 000 individus transgéniques par an [165]. La poule peut être élevée en grand nombre dans un milieu clos et produire un nombre impressionnant d'œufs sources de protéines recombinantes (environ 300 œufs par an). De plus, une lignée de poules sans pathogène spécifique est désormais disponible [140] et l'œuf a l'avantage d'être un milieu stérile avec des protéines stables. Les poulets ayant une physiologie différente des mammifères, de nouvelles perspectives sont alors ouvertes pour la production de protéines toxiques par les mammifères (par exemple, l'érythropoïétine humaine).

Concernant la maturation post-transcriptionnelle, les données sur les oiseaux sont peu nombreuses ; une étude sur la glycosylation des IgG chez différentes espèces [224] a mis en évidence que les oligosaccharides de poulet incorporent uniquement l'acide N-acétylneuraminique (NANA) comme l'Homme (cf paragraphe sur les lapins). Les autres animaux utilisés jusqu'à présent, produisent des formes NGNA. Ce point a une certaine importance car il ne peut être exclu que les protéines contenant la forme NGNA induisent la formation d'anticorps neutralisants chez les patients, même si ce phénomène n'a pas jusqu'à ce jour été observé. De plus, les poulets ne produisent pas l' α 1-3-galactose [165] ; cette glycosylation absente chez l'Homme, présente chez les mammifères utilisés pour produire des protéines recombinantes, est à l'origine de production d'anticorps pouvant entraîner un rejet. La glycosylation par la poule des protéines recombinantes doit être plus étudiée, même si les protéines natives ont une forme proche de celle de l'Homme, elles contiennent de nombreuses structures de mannose étrangères chez l'Homme.

Des études préliminaires montrent que les poules peuvent pondre des œufs contenant jusqu'à 0.1 g de protéine humaine dans un blanc d'œuf. Avec 0,1 g de protéine recombinante par œuf, une seule poule pourrait produire 30 g de protéine par an [165]. Les effets sur l'intégrité de l'œuf, de la production de protéines recombinantes en grande quantité, sont inconnus.

Le blanc d'œuf contient naturellement 4 g de protéine dont la moitié provient du gène de l'ovalbumine [114,136]. La composition simple du blanc d'œuf devrait faciliter la purification des protéines recombinantes de l'albumen. Les gènes de l'ovalbumine et du lysozyme du blanc d'œuf ont été étudiés, leurs promoteurs et voie d'expression sont donc candidats pour exprimer une protéine recombinante [165]. Les éléments fonctionnels du gène du lysozyme du poulet sont connus de manière plus précise que ceux de l'ovalbumine car le gène a pu être introduit chez la souris pour être étudié.

Le jaune d'œuf, par sa composition plus complexe que le blanc, rend la purification des protéines d'intérêt plus difficile. Comme le jaune d'œuf séquestre jusqu'à 400 mg d'IgY [165] (8–20 mg d'IgY par millilitre [238]), une forme d'IgG, il a été utilisée pour produire des IgG chimériques humains. L'usage du jaune d'œuf se destine plus à la production d'anticorps recombinants par des poules transgéniques [165,238] qu'à la production de protéines.

D'après L-M Houdebine [127], ce système n'est pas fondamentalement plus performant que le lait (Tabl.9) mais il a l'avantage d'échapper aux brevets portant sur la production de protéines dans le lait.

Tableau 9 Comparaison des avantages et des limites des différents systèmes de production de protéines recombinantes par les animaux transgéniques. Un nombre de croix élevé signifie que le paramètre considéré est favorable

Systèmes de production	Sang	Lait	Blanc d'œuf	Plasma séminal	Urine	Glande séricigène	Larve de drosophile
Niveau de production	+++++	+++++	+++++	++	++	++	++
Investissement	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
Coût de production	++++	++++	++++	++	+	+++++	++++
Souplesse	+++++	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservation des lignées	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Délais pour la première production	+++	++ (+)	+++	++	+	++++	++++
Augmentation d'échelle	++++	++++	++++	++++	+	++++	+++
Collecte	+++++	++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Effet sur les animaux	++	+++	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	++++	++++
Modifications post-traductionnelles	+++++	++++	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	++ (+)	++ (+)
Glycosylation	++++(+)	++++	+++	+++ (+)	+++ (+)	++	++
Purification	++	+++	+++	++ (+)	++ (+)	+++	++ (+)
Contamination par des pathogènes	++	+++	+++	+++	++	++++	++++
Dissémination dans l'environnement	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Propriété intellectuelle	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Considérations bioéthiques	+++	+++	+++	+++	+++	+++++	+++++

Source : Houdebine L.-M. Préparation de protéines thérapeutiques à partir des animaux transgéniques. STV, vol. 20, n° 1, janvier 2008

A.3.3 Choix de la protéine recombinante à produire

Le transgène qui code pour la protéine d'intérêt peut être dérivé d'un animal de la même espèce ou non et même d'une bactérie ou d'une plante.

Une des clés de la réussite de la production de protéines pharmaceutiques est l'innocuité de la protéine étrangère envers la physiologie de l'animal. Malgré la production de nombreuses protéines d'importance biomédicale, exprimées avec succès dans la mamelle d'animaux transgéniques, quelques unes ont démontré des effets indésirables.

Des chèvres transgéniques exprimant un activateur humain du plasminogène dans leur lait, ont vu leur production de lait chuter prématurément. Cette chute a été attribuée à de hauts niveaux de concentration de la protéine nouvellement exprimée et à son interaction avec les composants de la caséine [73].

Chez la souris, l'expression de la protéine C recombinante humaine, a induit un phénotype de lactation anormal, malgré que les auteurs pensent que ce défaut était dû aux effets secondaires de la transgénèse et non à la seule expression de la protéine C [209].

Un autre exemple : des lapins transgéniques exprimant des niveaux d'érythropoïétine humaine bas dans leur lait, ont montré une fuite de la protéine dans leur sang. Ces animaux étaient infertiles et avaient une viscosité sanguine anormale avec un hémocrite élevé [178].

Des effets secondaires moins sévères ont été observés lorsque l'hormone de croissance humaine a été produite dans le lait de lapine (données non publiées, d'après [128]).

Ces problèmes devraient être évités par une sélection du transgène, associée à un contrôle précis de l'expression spécifique du tissu. Il est nécessaire de procéder méticuleusement à la création des assemblages d'ADN et au « pré testage » de ces constructions sur des lignées de cellules transgéniques. Des précurseurs de protéines recombinantes peuvent également être créés, ils sont alors produits inactifs durant les étapes de purification et activés par d'autres procédés.

En plus de produire des lignées transgéniques qui sécrètent dans le lait des niveaux acceptables de la protéine voulue, sans affecter la physiologie de l'animal, la question de purification de la protéine doit être posée. Cette question est extrêmement importante puisqu'elle aura une incidence sur l'économie et la commercialisation du produit. La purification d'une protéine recombinante avec un coût raisonnable, commercialement viable, est un point critique de cette production en raison de la composition complexe du lait [97]. Ces processus doivent être très contrôlés et la méthode documentée avec un cahier des charges précis [89].

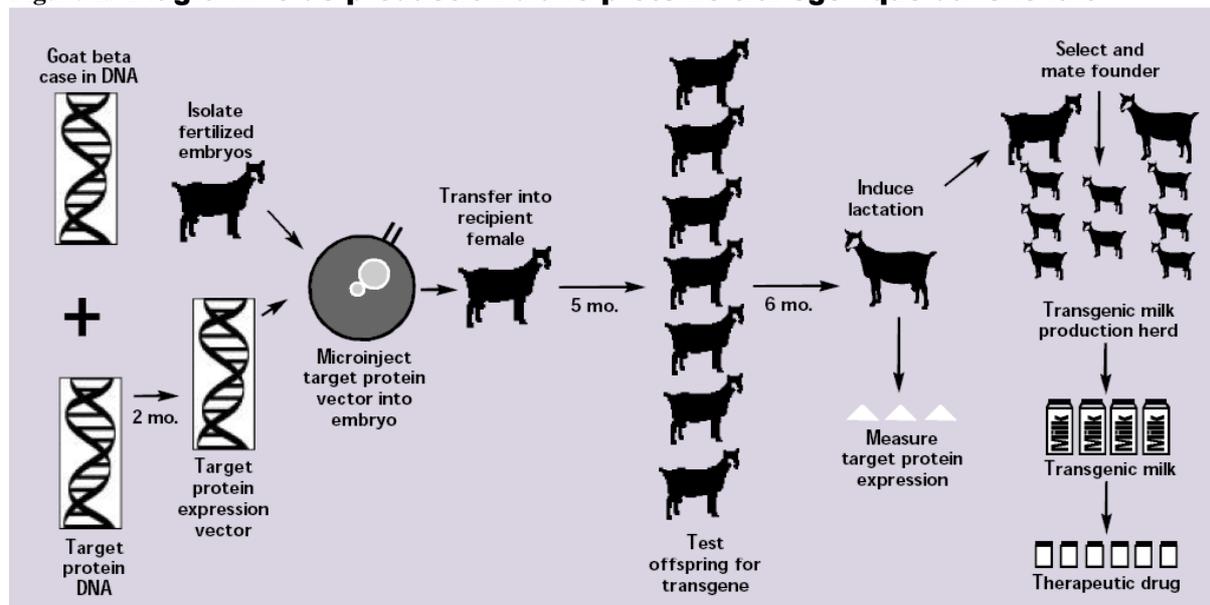
A.3.4 Les différentes étapes de production de protéines pharmaceutiques recombinantes à travers l'exemple du lait

Les objectifs de l'altération du lait par la transgénèse peuvent se répartir en quatre catégories :

- La valeur ajoutée du produit : des taux plus élevés de caséine pour la fabrication de fromage, un lait dépourvu de la protéine allergène du lait (β -lactoglobuline), un lait avec un taux de lactose bas pour les intolérants au lactose, un lait avec des protéines antibactériennes (lactoferrine humaine, lysozymes, lysostaphine),... [125]
- Une amélioration de la valeur nutritive : un lait humanisé formulé pour les bébés, un lait de truie à haute valeur nutritive pour mieux nourrir les porcelets, un lait enrichi en oméga 3 [125].
- La production de protéines pour le traitement ou la prévention de maladie humaine.
- Des biomatériaux : collagène, protéines de la soie de l'araignée [141,218,331].

Les protéines pharmaceutiques permettent une bien plus grosse marge que les protéines agricoles traditionnelles. Le plus grand intérêt économique se trouve donc dans les deux dernières catégories. La production de ces protéines chez des animaux laitiers a des avantages significatifs concernant le risque sanitaire et les coûts directs de production. Voilà pourquoi, il paraît judicieux d'aborder les étapes de production d'une protéine transgénique à travers l'exemple du lait (Fig.19).

Figure 19 **Diagramme de production d'une protéine transgénique dans le lait**



Source : Gavin, W.G., 2001. *The future of transgenics. Regul. Affairs Focus* 6, 13–18.

Les animaux fondateurs

Le choix des animaux-source pour réaliser la transgénèse fait l'objet d'une attention particulière.

Pour obtenir une lignée sans maladie, qui pourrait affecter le futur projet, les ruminants-source sont, la plupart du temps originaires de Nouvelle-Zélande ou d'Australie qui sont des pays officiellement indemnes d'Encéphalopathie Spongiforme Transmissible ([89]]A9). Le gène PrP nécessaire au développement des maladies à prion a été récemment inactivé pour une lignée de bovins [233]. Quant aux lapins et cochons, des lignées EOPS (Exempt d'Organismes pathogènes Spécifiques ou SPF en anglais Specific Pathogen Free) existent et facilitent les procédures. Les animaux sont mis en quarantaine le temps nécessaire, ils doivent posséder un moyen d'identification permanent et lisible (tatouage, transpondeur, tag à l'oreille...). Le troupeau créé, doit être dans un environnement maîtrisé, avec entrée règlementée des nouveaux individus. Des procédures sont mises en place pour gérer tous les risques inhérents à l'environnement, l'élevage, les contraintes de la production, les spécificités de l'espèce élevée. Des plans de vaccination, de contrôle du parasitisme externe et interne sont mis en place ainsi qu'un contrôle vétérinaire permanent.

Les qualités de reproduction et de production des animaux choisis sont également importantes. Nexia a créé une lignée de chèvres spéciale pour obtenir des animaux fondateurs. Les chèvres BELE® (Breed Early, Lactate Early) sont issues d'une lignée de chèvres naines d'Afrique de l'Ouest ayant une reproduction et une lactation précoce. Un bouc BELE® peut atteindre la maturité dès l'âge de 15 semaines, alors qu'un bouc ordinaire ne l'atteint pas avant 30 semaines d'âge [199]. Ainsi les délais de production d'un troupeau transgénique sont réduits et la production de protéines plus précoce, le processus de commercialisation est accélérée. Il est également indispensable d'accroître la diversité génétique et d'éviter la consanguinité lorsque la lignée des fondateurs est établie. Par exemple, Nexia a croisé les chèvres fondatrices avec une lignée normale comme la Saanen ou l'Alpine qui ont une production laitière plus élevée que les BELE® [199].

De la première production de protéines à la production à grande échelle [89]

Premières analyses

La production de petites quantités de protéines recombinantes dans la phase de départ du projet permet de commencer la caractérisation biochimique nécessaire de la molécule. La récolte précoce de lait peut attendre que le stade physiologique naturel de lactation soit atteint ou alors la lactation peut être induite chez la chèvre par injection hormonale (à l'âge de 2 mois environ) avant la maturité sexuelle aussi bien chez les mâles que les femelles [105].

Avant la récolte, la santé des animaux est contrôlée (état général, température corporelle, état de la mamelle) et des tests sur le lait sont réalisés pour dépister les mammites cliniques et subcliniques (aspect macroscopique du lait, California Mastitis Testing). Une fois ce check-up réalisé, la production des animaux sains peut être récoltée. Ces contrôles sont réalisés avant chaque traite. Les animaux malades bénéficient de soins vétérinaires et sont réintroduits une fois guéris, lorsque le lait ne contient plus aucun résidu de médicament ; certains animaux peuvent être réformés définitivement.

La première production est utilisée pour déterminer l'activité biologique, mesurer les concentrations d'expression, la séquence des acides aminés produits, analyser les hydrates de carbone de la molécule et identifier les contaminants. Cette information est nécessaire pour tout produit recombinant. Cette analyse doit être réalisée pour chaque animal transgénique, à différents stades de lactation et durant différentes lactations pour s'assurer de la constance du produit tout au long de la production.

Un taux de 1 mg/ml de lait ou même plus bas est acceptable économiquement. A des concentrations plus élevées, les protéines recombinantes ne sont pas totalement matures et partiellement glycosylées. La cellule mammaire, saturée, ne peut glycosyler entièrement les protéines recombinantes. La protéine recombinante ATryn (human antithrombin III) produite dans le lait de chèvre contient moins d'acide sialique que dans la molécule originelle [74]. De la même manière, l'inhibiteur C1 humain, produit dans le lait de lapine n'est pas entièrement sialilé [149]. Les bonnes pratiques de fabrication doivent assurer la sécurité, la pureté, l'efficacité de la protéine produite par des contrôles réglementaires de qualité.

Une fois les premières analyses réalisées, les animaux fondateurs sont choisis pour propager le transgène et créer une lignée productrice de la protéine. La taille du groupe dépend de la demande du marché pour la protéine recombinante. Lorsque de grands effectifs sont nécessaires des embryons peuvent être obtenus d'une femelle fondatrice transgénique [14]. L'analyse PCR des embryons par biopsie permet de sélectionner les embryons qui ont le transgène [22]. Les mâles fondateurs sont utilisés pour propager rapidement le transgène en utilisant l'insémination artificielle.

Avant la récolte à grande échelle, tous les procédés doivent être standardisés, écrits et documentés, le personnel formé spécifiquement, les équipements calibrés. Toutes ces procédures sont indispensables à l'éventuelle autorisation de mise sur le marché.

Purification des protéines d'intérêt

Le lait est récolté individuellement à chaque traite. La procédure de purification nécessite de regrouper les échantillons. Le regroupement est réalisé immédiatement si le lait est gardé frais et à l'état liquide, une autre méthode stocke le lait congelé individuellement. Des tests additionnels peuvent alors être réalisés (recherche de bactéries, virus, etc).

Peu importe qu'une protéine recombinée soit produite à l'aide de bactéries, levures, culture de cellules de mammifères ou extraite du lait de chèvres, elle doit être purifiée afin d'en retirer les autres protéines et contaminants. Dans le cas du lait, la protéine doit être isolée des matières grasses et des autres protéines naturellement présentes dans le lait.

Il existe diverses méthodes de purification des protéines recombinées, notamment la centrifugation, la précipitation, la filtration et spécifiquement la chromatographie sur colonne. Généralement, le lait est d'abord filtré pour enlever la matière grasse, la caséine, les cellules et particules. Dans un deuxième temps, le filtrat est versé dans une colonne (chromatographie sur colonne), une résine est utilisée pour lier spécifiquement la protéine recombinée. Une fois liée à la résine de la colonne, la protéine peut être isolée au moyen d'une solution spécifique qui la libère. Cette façon de procéder permet souvent d'obtenir des protéines d'un haut degré de pureté.

Le degré de pureté nécessaire dépend de l'application prévue de la protéine. Ainsi, lorsque la destination est pharmaceutique, le produit doit être extrêmement pur.

Les protéines d'intérêt sont généralement sécrétées dans la phase aqueuse du lait mais elles peuvent parfois être hydrophobes et se concentrer dans la membrane des globules gras du lait. Les procédures de purification des protéines recombinantes dans le lait, ne sont donc pas standard et doivent être adaptées au cas par cas. L'isolation de la protéine recombinante est compliquée par la présence des micelles et des globules gras du lait [322]. Même si les protéines recombinantes sont stables dans le lait, elles sont plus ou moins piégées par la caséine extrêmement abondante. Un essai de production de **facteur VIII** de coagulation humaine dans le lait de brebis, a montré toute la difficulté à extraire le facteur séquestré dans le lait [201].

Une procédure et des mesures spécifiques doivent être mises en place pour supprimer ou inactiver tout virus ou prions accidentellement présents dans le lait.

Études précliniques et cliniques

Une fois toutes les étapes précédentes réalisées, des études précliniques sont nécessaires. La voie d'administration, la dose administrée, la fréquence et la durée du traitement doivent être définies car même si ces données sont connues pour la protéine originelle, la protéine transgénique peut être différente. Des essais *in vitro* et sur des modèles animaux sont réalisés. Le mécanisme d'action, l'efficacité, la toxicité de la protéine recombinante doivent être déterminés.

Si les études précliniques sont favorables, le procédé de purification est encore développé pour être validé et la procédure classique des essais cliniques est engagée.

A travers l'exemple du lait, nous avons pu voir que si le principe de production d'une protéine recombinante est simple, les étapes menant à la production sont complexes. Il aura fallu 19 ans pour passer de la preuve du concept à l'autorisation pour la mise sur le marché d'une protéine thérapeutique extraite du lait de chèvre, l'ATryn® (anti-thrombine III humaine). Ce temps n'est que relativement long si on le compare à celui qui est nécessaire pour mener à bien un projet de production classique d'une molécule thérapeutique obtenue par synthèse chimique. Une fois le support de production mis en place, il reste encore à franchir les étapes réglementaires et à répondre aux impératifs économiques pour parvenir à une éventuelle commercialisation. Le succès n'est pas toujours au rendez-vous.

A.3.5 Les protéines pharmaceutiques produites

En raison de l'avancée des recherches médicales et de la croissance de la demande globale en produits dérivés du sang humain (globules rouges, plasma, facteurs de coagulation, **albumine** sérique, immunoglobulines), les animaux bioréacteurs représentent une promesse alléchante. Actuellement des protéines pharmaceutiques humaines sont soit isolées de fluides humains (facteurs de coagulation) soit produites comme protéines recombinantes. La première méthode implique des risques de contamination (HIV, maladie de Creutzfeldt-Jakob) et se heurte au manque de donneurs qualifiés, à des barrières réglementaires, des problèmes éthiques (il n'est pas possible d'**hyperimmuniser** des humains pour stimuler leur système immunitaire envers des maladies spécifiques). La seconde méthode produisant des protéines recombinantes par des mammifères, des cultures cellulaires, des systèmes de fermentation bactérienne, est très chère [57,218]. La production de protéines transgéniques pharmaceutiques par les animaux en est à ses débuts. Voici un aperçu de cette production animale, aperçu qui ne se veut pas exhaustif en raison de la rapidité d'évolution de la production des protéines pharmaceutiques transgéniques.

Du bétail transgénique produisant une protéine humaine dans le lait, a été produit grâce à des programmes de recherche subventionnés par des compagnies commerciales [200,218,239]. Un an après Dolly, la première brebis clonée, naissait au Roslin Institute, la brebis Polly et cinq autres agneaux clonés porteurs du gène du facteur IX humain (facteur de coagulation utilisé pour le traitement de l'hémophilie). En 1999, c'était au tour de Diana de défrayer la chronique avec autre protéine humaine d'intérêt pharmaceutique : l'alpha-1 antitrypsine (destinée au traitement de la **mucoviscidose**), toujours financée par la firme PPL Therapeutics. Une étude publiée en 2009 par Houdebine montre que la majorité des projets en cours de développement sont basés sur la production de protéines recombinantes dans le lait (Fig.20). Jusqu'à récemment cette technologie était limitée à la phase recherche/développement mais de nombreux essais cliniques sont en cours (Fig.20) et une protéine recombinante issue d'animaux transgéniques a déjà une autorisation de mise sur le marché. Cette première protéine autorisée a été l'anti-thrombine III ATryn® de GTC Biotherapeutics, en 2006, sur le marché européen. L'antithrombine est une protéine plasmatique avec des propriétés anticoagulantes et anti-inflammatoires.

Les facteurs de coagulations (facteur VIII [210] pour le traitement de l'hémophilie A, le facteur IX [256] pour l'hémophilie B), l'activateur du plasminogène [63], le fibrinogène, l'albumine sont des protéines pour lesquelles la médecine curative est très demandeuse, leur disponibilité accroîtrait grandement les possibilités de traitement des affections. Les sociétés pharmaceutiques envisagent de commercialiser ce type de protéines recombinantes rapidement (Fig.20 et Tabl.10).

Tableau 10 Quelques protéines pharmaceutiques en cours d'étude produites dans le lait

Proteins	Company	Animal	g/l	Glycosylation	Development
ATryn	GTC	Goat	3	<NANA, >NGNA	EMEA (2006)
InhibitorC1	Pharming	Rabbit	8	<NANA	Phase III
Fibrinogen	Pharming	Rabbit	?		Phase III
Malaria antigen	GTC	Goat	?	No	Clinical
Anti-CD137	GTC	Goat	?	?	Clinical
Albumin	GTC	Goat	?	No	Clinical
α-AT	GTC	Goat	?	?	Clinical
BChE	PhAth	Goat	?	?	Preclinical
RotavirusVP2/VP6	BPT	Rabbit	0.5	No	Preclinical
Blood factor	BPT	Rabbit	3	<NANA	Preclinical
TNAP	AM Pharma	Rabbit	<0.1	?	Preclinical

ATryn : antithrombine III, αAT : l'alpha-1 antitrypsine, BChE : butyrylcholinestérase, TNAP : Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. Source : Houdebine L.-M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 (2009) 107–121

Quelques protéines recombinantes prochainement sur le marché sont présentés rapidement ci-dessous.

Inhibiteur C1

Rhucin®, un inhibiteur C1 recombinant humain produit dans le lait de lapines, est développé par Pharming (Tabl.10 et 11) [214]. Cet inhibiteur d'estérase C1 régule certaines voies inflammatoires et inhibe certaines protéases, il fait partie du système de défense humain. Une déficience fonctionnelle (mutation génétique et héréditaire) de cet inhibiteur mène à une activation excessive de certaines voies immunitaires et de l'**hémostase**, donnant lieu à des crises d'**angioedèmes**. Ces crises sont caractérisées par une tuméfaction transitoire mal délimitée, pouvant être très douloureuse, située au niveau des tissus profonds du **derme**, des tissus sous-cutanés, ou des muqueuses. L'administration de l'inhibiteur normalise la réponse immunitaire et stoppe la crise. Les essais cliniques sont en phase III et un essai clinique de phase I est en cours pour son utilisation en prévention des complications et du rejet après transplantation d'organe. Après deux refus d'autorisation successifs en 2007 et 2008 par l'EMA, Pharming a à nouveau soumis Rhucin® en septembre 2009 pour son Autorisation de Mise sur le Marché. Après avoir retiré en 2008 certaines de ses réserves majeures, l'EMA restait préoccupée par la probabilité de développement d'une réponse avec anticorps lorsque Rhucin® est administré plus d'une fois. Les informations sur son impact, sa sécurité d'emploi et son efficacité, n'étaient pas suffisantes. L'EMA demandait plus d'informations.

Butyrylcholinestérase

Nexia, via la filiale Pharmathene tente de mettre au point une version recombinée de la butyrylcholinestérase humaine (le « BChE ») produite par des chèvres transgéniques (Tabl.10 et 11). Les recherches sur la mise au point de ce produit appelé Protexia^{MC} sont en cours [200]. Le BChE est une protéine naturelle présente en quantités minimes dans le sang. Il agit comme un fixateur naturel qui absorbe les toxines telles que les poisons organophosphorés (les « PO »), les agents neurotoxiques et certains pesticides avant qu'ils ne causent des dommages neurologiques. Des études effectuées par l'armée américaine utilisant du BChE extrait du plasma sanguin ont démontré que des concentrations plus élevées de BChE dans le sang permettaient de protéger les animaux de laboratoire contre les effets toxiques d'agents neurotoxiques. Bien que le potentiel du BChE soit connu depuis plus d'une décennie, une des principales limites à sa généralisation tient à l'incapacité à le produire en quantité commerciale. Nexia croit que sa technologie de production transgénique permettra de s'affranchir de cette limite.

Antigènes destinés à la vaccination

Des antigènes de la malaria ont été exprimés dans le lait de chèvre et des antigènes d'un rotavirus dans le lait de lapines (Tabl.10 et 11). L'administration de ces antigènes est destinée à produire une réaction immunitaire non délétère qui confèrera une protection future contre le pathogène ciblé. Avec la concentration obtenue expérimentalement dans le lait de chèvre (0,9 g/l), une chèvre produisant 700 litres de lait par an, pourrait pourvoir assez d'antigènes pour vacciner 8,4 millions de personnes par an [100].

Utilisation du système immunitaire des animaux transgéniques : Un avenir particulièrement prometteur

Les animaux, producteurs naturels d'anticorps pour leur propre protection peuvent être utilisés comme source d'anticorps pour soigner l'Homme. Déjà en 1920, les animaux étaient utilisés comme fournisseurs de sérum **polyclonal**, la thérapie par le sérum soignait de nombreuses maladies : **pneumonie, méningite, scarlatine, botulisme, anthrax, tétanos, diphtérie...** Cependant, cet usage a été limité rapidement par les effets secondaires dus à une réponse immunitaire contre les protéines non humaines de l'antisérum. Avec les nouvelles technologies, des anticorps recombinants « humanisés » produits par des animaux transgéniques ou des cultures cellulaires, essaient de rendre cet usage le plus sûr possible.

Le premier usage des anticorps s'est d'abord tourné vers l'immunisation passive : l'administration d'anticorps peut être utilisée pour protéger les patients d'une infection (exemple des anticorps recombinants contre le **virus respiratoire syncytial**). Cet usage est intéressant lorsque ni vaccins ni antibiotiques sont disponibles ou que le pathogène est résistant aux antibiotiques. Des patients immunodéprimés font également appel à ce traitement puisqu'ils ne produisent pas assez d'anticorps, le coût de revient est tout de même 25 000 \$ à 50 000 \$ par an.

Agissant également sur la protection contre les pathogènes intracellulaires, ils peuvent être utilisés contre les attaques bioterroristes. Les anticorps peuvent être gardés sous forme de poudre et sont aisément « auto-injectables » en cas d'attaque.

La présence d'une grande variété d'anticorps avec une haute spécificité et affinité pour des antigènes étend l'usage de ces protéines à des objectifs autres que leur usage classique de l'immunisation passive contre des maladies. Des anticorps peuvent bloquer spécifiquement l'action de facteurs naturels, *in vivo*, ils sont donc utilisés pour inhiber certains mécanismes de rejet après une transplantation d'organe. D'autres usages sont répertoriés. Les anticorps peuvent être utilisés comme transporteurs de molécules destinées à un endroit ciblé. Par exemple, des ions radioactifs sont liés à des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales. Cette approche permet de détruire les **lymphomes** [122].

La palette d'utilisation des anticorps est large. L'usage courant du sérum est resté pour traiter l'exposition à la toxine botulique, les morsures venimeuses [41], certaines overdoses et pour la suppression de la réponse immunitaire chez les receveurs de greffe d'organe.

Les animaux transgéniques représentent un potentiel énorme de fabrication d'anticorps en quantité suffisante, à grande échelle, à un coût intéressant. Ils peuvent être hyperimmunisés avec la majorité des pathogènes humains et être ensuite utilisés :

- pour produire des anticorps polyclonaux contre des antigènes humains.
- pour produire de grandes quantités d'anticorps.
- pour évaluer rapidement un grand nombre d'antigènes en testant leur capacité à produire les anticorps voulus chez l'animal transgénique.

Il a été rapporté une expression d'anticorps jusqu'à 14 mg/ml dans le lait de chèvres transgéniques [217], ce qui laisse espérer une production en quantité supérieure aux capacités de cultures cellulaires. Des anticorps monoclonaux humanisés sont produits dans le lait de souris. La production d'anticorps dans le lait est techniquement plus avancée par rapport à d'autres systèmes comme l'usage de poules transgéniques. Par exemple, GTC Biotherapeutics est en train de développer un anticorps monoclonal anti-CD20 [104] produit dans le lait de chèvres transgéniques, cet anticorps (Rituximab), a prouvé sa valeur thérapeutique dans le traitement des **lymphomes non-hodgkiniens** et de la polyarthrite rhumatoïde. Il est également étudié pour une gamme de maladies auto-immunes comme le **lupus érythémateux systémique**, le **purpura thrombocytopénique** auto-

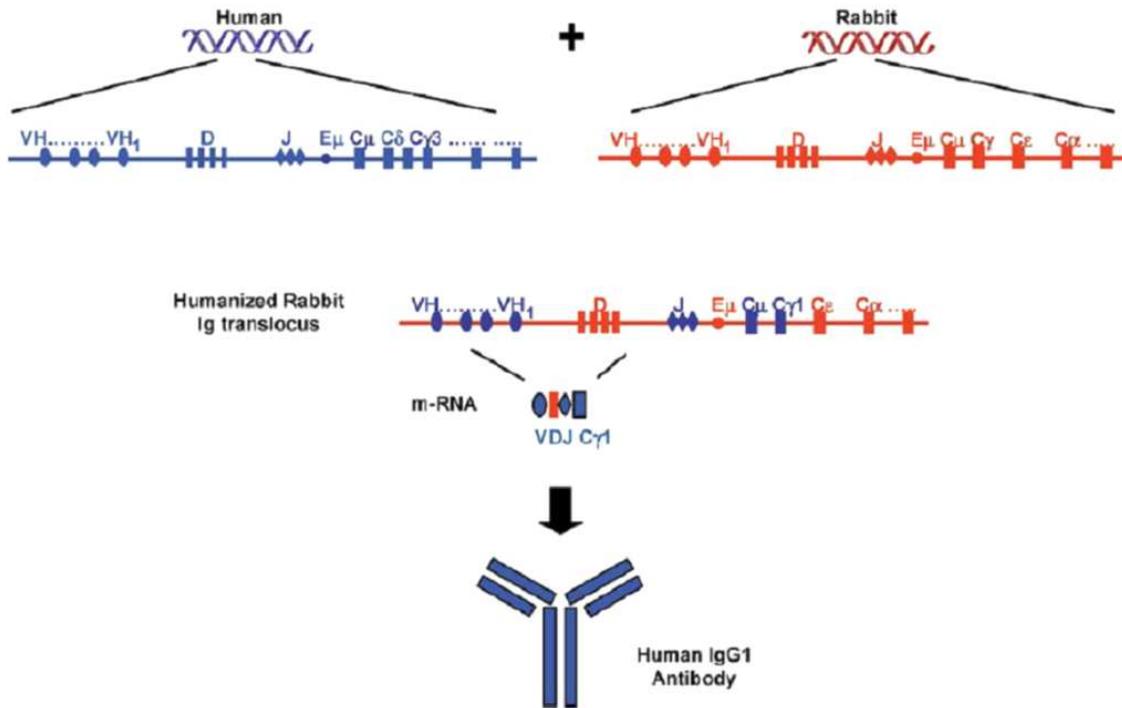
immun (PTI) et le **diabète de type 1**. Le CD20 est un antigène situé sur la surface des lymphocytes B matures et des cellules cancéreuses dérivées des lymphocytes B. L'anticorps monoclonal anti-CD20 recrute les défenses naturelles de l'organisme pour atteindre les lymphocytes B identifiés. Les cellules souches de la moelle osseuse ne possèdent pas d'antigène CD20, permettant aux lymphocytes B sains de se régénérer après le traitement. L'anticorps recombinant produit devrait avoir une spécificité ciblée similaire à celle du Rituxan® (Rituximab) et une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) relativement plus grande. Les ventes du Rituximab, actuellement utilisé au niveau mondial, s'élevaient à presque 4 milliards de dollars en 2006 et les prévisions du marché devraient atteindre 5 milliards de dollars d'ici 2010. La soumission d'une demande d'autorisation de recherche clinique pour un nouveau médicament auprès de la Food and Drug Administration est prévue pour 2010.

Plusieurs sociétés travaillent sur la mise au point de grands animaux génétiquement programmés pour fabriquer des anticorps humains polyclonaux : Hematech sur les vaches, Revivacor sur les porcs, Origen sur les poules, Therapeutic Human Polyclonals (THP) sur les lapins. Il est envisagé de créer des animaux produisant des anticorps entièrement humains. En effet, les anticorps produits contiennent souvent encore des molécules avec des caractéristiques de l'animal producteur et ces caractéristiques diffèrent de celles de anticorps humains (cf § différents systèmes).

✚ Une étude de Kuroiwa *et al.* publiée en 2002 [154] rapporte l'utilisation d'un microchromosome contenant les loci entiers des chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline humaine, chez des vaches. Ces vaches transchromosomiques ont été créées par transfert nucléaire de fibroblastes fœtaux indifférenciés contenant les HAC. Vingt et une vaches transchromosomiques ont été produites. Des lymphocytes du sang périphérique et des fibroblastes de quatre vaches ont été soumis à une hybridation fluorescente *in situ* (FISH) qui a montré que le HAC était retenu comme un chromosome indépendant. La proportion de cellules contenant le HAC était de 78 à 100% avec aucune différence significative du pourcentage de rétention parmi les vaches entre les fibroblastes (87%) et les lymphocytes (91%). Une RT-PCR des lymphocytes est pratiquée pour vérifier si les loci humains intégrés ne sont pas modifiés. Les lymphocytes expriment les chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline humaine avec un répertoire lambda très diversifié. Des niveaux bas d'immunoglobulines humaines ont aussi été détectés dans le **précolostrum** des vaches. L'incorporation de loci entiers d'immunoglobulines humaines devrait permettre au bétail de produire des anticorps humains fonctionnels face à un antigène spécifique, d'intérêt médical. Une étape est franchie dans la production d'anticorps thérapeutiques polyclonaux humains. Le groupe Hematech à l'origine du financement de cette première étude, envisage d'utiliser le système de bovins transchromosomiques, pour produire des anticorps humains polyclonaux contre de nombreux antigènes, notamment l'anthrax. Des améliorations sont nécessaires pour augmenter l'efficacité de la production qui n'est pas encore économiquement viable. D'autres études devraient suivre pour montrer si ce chromosome additionnel a une expression stable et s'il est transmis d'une génération à l'autre.

✚ THP a développé une approche différente, la séquence correspondant à l'immunoglobuline du lapin a été invalidée et remplacée par une séquence d'immunoglobuline humaine (Fig.20). Des lapins produisant des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines humaines ont été produits avec des taux d'IgG jusqu'à 2 mg/ml de lait [28]

Figure 20 Schéma du principe utilisé par Therapeutic Human Polyclonals pour produire des anticorps humanisés chez le lapin



Source : R. Buelow, W. van Schooten. *The Future of Antibody Therapy Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings (2007), Vol. 4, pp. 83–106*

Quant aux poules, des études récentes montrent l'expression d'anticorps monoclonaux humanisés dans le sérum et les œufs [140,166,238].

Ces techniques devraient avoir de nombreuses applications futures, comme le traitement ou la prévention de maladies infectieuses humaines, les infections résistantes aux antibiotiques, les maladies auto-immunes, le cancer... En 2002, 11 anticorps recombinants avaient été autorisés par la Food and Drug Administration. Près de 400 anticorps recombinants, obtenus par divers moyens, sont en étude. La capacité de production mondiale de protéines recombinantes était estimée à 400 000 L vers 2000, mais cette capacité de production devrait être multipliée par 5 à 6 pour répondre aux besoins actuels [122].

Tableau 11 Groupes européens et Nord américains produisant des bioproduits ou modèles biomédicaux chez les animaux transgéniques d'élevage

System	Company/Group, Country	Company/Group Website	Products or Models	Status
Goats	GTC Biotherapeutics, United States	www.transgenics.com	Antithrombin III (ATryn) Monoclonal antibodies Malaria vaccine	ATryn received EU approval and is in clinical trials in the United States. Other products in preclinical
	Pharmathene, United States/Canada	www.pharmathene.com	Butyrylcholinesterase	Research
Cattle	Hematech, United States	www.hematech.com	Polyclonal antibodies	Research
	GTC Biotherapeutics, United States	www.transgenics.com	Human serum albumin	Research
Pigs	Revivacor, United States	www.revivacor.com	Xenotransplantation (cartilage implants) Polyclonal antibodies	Research
	Progenetics	http://www.progtx.com/	Factor-IX	Research
	Foulum Research Center, Denmark	http://www.agrsci.org/ny_navigation/forskning/centre/forskningscenter_foulum	Alzheimer's model	Research
	North Carolina State University (R.M. Petters), United States	http://www.ncsu.edu	Retinal pigmentosa model	Research
	University of Missouri (R. Prather), United States	http://www.missouri.edu	Xenotransplantation	Research
Rabbits	Pharming, The Netherlands	www.pharming.com	C1-inhibitor	Phase II clinical trials
	BioProtein Technologies, France	www.bioprotein.com	Recombinant proteins	Research
	Therapeutic Human Proteins, United States	www.polyclonals.com	Humanized polyclonal antibodies	Research
Chickens	Avigenics, United States	http://www.avigenics.com/	Interferon	Clinical trials
	Origen Therapeutics, United States	www.origen Therapeutics.com	Recombinant proteins	Research
	Viragen, United States	www.viragen.com	Interferon alpha and single chain antibody	Research
	Vivalis, France	www.vivalis.com	Recombinant proteins using cell-based system	Research

^aCompany products and status are estimations due to limited types of available information (e.g., press releases, articles in popular press, etc.).

Source : Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2007. *The Role of Transgenic Livestock in the Treatment of Human Disease. Issue Paper 35.* CAST, Ames, Iowa.

.A.4. Application commerciale des animaux transgéniques bioréacteurs

Avec l'avancée technique des méthodes de production, la « démocratisation » des animaux bioréacteurs doit faire face à des questions commerciales, éthiques, environnementales et sociales.

A.4.1 Questions commerciales

L'utilisation d'animaux transgéniques pour produire des protéines dans le cadre de la recherche est réalisée sans contraintes mais l'utilisation devient vite limitée lorsque les applications commerciales sont envisagées. De nombreux aspects des méthodes décrites précédemment ont été brevetés pour les applications agricoles et biomédicales et sont réglementés par des instances nationales et internationales (EMEA, National Institutes of Health, FDA...). Par exemple, un promoteur spécifique est absolument nécessaire pour exprimer une protéine particulière dans la mamelle et les séquences régulatrices concernées sont souvent couvertes par des brevets qui limitent leur utilisation. Se rajoutent également les brevets sur la séquence d'ADN codant pour la protéine pharmaceutique que l'on veut produire, il y a de grandes chances pour que la protéine elle-même et son usage thérapeutique soit breveté. Ensuite, les méthodes de transfert nucléaire ou de clonage utilisées pour parvenir à la production de la protéine, nécessitent une multitude de brevets pour divers aspects de la procédure. Par exemple, BioProtein Technologies possède une licence exclusive de l'INRA protégeant les applications du promoteur WAP (Whey Acidic Protein) de lapin du gène codant une protéine du lait (EPO Patent Application N° 92 401 635.5, US patent N° 5,965,788) et sur la séquence isolatrice du gène (EPO Patent Application N° 00 403 658.8) La protection de ce procédé permet à BioProtein Technologies d'exploiter librement sa technologie et de produire efficacement des protéines à usage thérapeutique et des vaccins recombinants dans le lait de lapines transgéniques. De nombreux brevets sont basés sur de légères modifications d'une technique, aussi est-il difficile de déterminer quelle technique a été utilisée pour obtenir le produit final. La description détaillée des procédures doit être produite et doit respecter les droits de propriété intellectuelle.

C'est pourquoi, commercialiser une protéine produite par des animaux transgéniques est fastidieux et prend beaucoup de temps par rapport à l'avancée des recherches.

Peut-être le plus gros challenge de l'application de cette technologie est l'établissement d'une commercialisation viable. Au même titre que n'importe quel médicament, ces protéines issues d'animaux transgéniques, n'échappent pas aux décisions commerciales basées sur la faisabilité économique et/ou un financement insuffisant. Les problèmes commerciaux ne sont pas toujours des défis techniques, des facteurs inconnus et imprévisibles sont soulevés comme lors de tout développement de nouvelle technologie. Les directives complétant les démarches réglementaires à suivre ont été produites en concomitance avec le développement de cette nouvelle technologie, créant une hésitation au sein des groupes commerciaux concernant les coûts et les opportunités associés à la production de protéines recombinantes.

Par exemple, l'EMEA (Agence européenne des médicaments) a retardé l'autorisation de la méthode de production de l'ATryn® pour des questions de temps de clairance et d'immunogénicité. En effet, il a fallu produire des recherches supplémentaires spécifiques à la protéine humaine produite par des animaux transgéniques. L'acceptation par l'EMEA de la mise sur le marché de l'ATryn® est un événement important à plusieurs titres. Les entreprises impliquées dans la préparation des protéines thérapeutiques par les animaux transgéniques n'ont jusqu'à maintenant que des retours sur investissement très limités et il faudra encore quelques années pour que ces entreprises puissent

réaliser des bénéfices significatifs par la vente de protéines. Le fait que l'EMEA ait donné son accord, même pour une utilisation restreinte de l'ATryn[®], est un signal fort pour les différents acteurs et en particulier pour les investisseurs. L'ATryn[®] est acceptée malgré ses imperfections. Cela signifie que les réglementations concernant ce procédé de production de protéines sont stabilisées et réalistes. Les experts de l'EMEA ont montré qu'ils n'étaient pas attachés à tout prix au concept d'identité de structure entre la protéine native et son homologue recombinant mais que les critères d'acceptation reposaient sur des données montrant, au cas par cas, les avantages et les risques du produit. La menace de faillite qui pèse sur les entreprises concernées, trop lentes aux yeux de certains, à produire des résultats financiers significatifs s'en trouve allégée, pour le bénéfice potentiel des patients. Une autre protéine produite dans le lait de lapine, l'inhibiteur C1, vient de se voir refuser à deux reprises l'agrément de l'EMEA pour une mise sur le marché. Les experts ont en effet considéré que les effets thérapeutiques n'ont pas été établis avec un nombre suffisant de patients et que ses effets immunogènes n'ont pas été suffisamment évalués. Cette protéine concerne une maladie orpheline et elle n'a pas d'équivalent non recombinant, contrairement à l'ATryn[®]. Son étude en est rendue plus complexe. Avec de nouvelles informations, une nouvelle demande d'autorisation a été déposée en 2009.

Parce que les essais cliniques sont coûteux, le développement de certains produits transgéniques a été arrêté après analyse du rapport coût/bénéfice. Si les protéines recombinantes sont utilisées pour traiter une maladie, les protéines purifiées pourraient-elle être produites en quantité suffisante pour répondre au marché et si c'est le cas, à quel prix ? La protéine doit être compétitive par rapport aux autres produits du marché et doit avoir un profil de vente rentable. L'alpha-1-antitrypsine humaine recombinante, là encore, reflète bien ce problème. Le premier projet de production développé par l'ancienne compagnie écossaise PPL a été arrêté en 2003 après que l'associé, Bayer, aie conclu que le projet n'était pas assez compétitif pour mériter de plus amples financements sur les essais cliniques et la conformité réglementaire.

Note : *La société britannique PPL Therapeutics, où Dolly avait vu le jour, est à vendre. L'entreprise avait déjà vendu en avril dernier sa division "xénogreffe" et son laboratoire écossais de recherche sur le clonage avait été fermé. La société annonce avoir enregistré un doublement de ses pertes avant impôts sur le premier semestre 2003. L'arrêt de ses activités de développement de l'ATT, une substance pour protéger les poumons des lésions, lui aurait valu une perte de 8 millions de livres. Ses effectifs ont été réduits de 161 à 55 employés.*
Le Quotidien du Médecin 19/09/03 - Libération 16/09/03

A.4.2 Questions Ethiques et environnementales

Cette technologie doit faire face à d'autres problèmes d'ordre éthique et environnemental concernant la transgenèse. L'intégration d'un transgène dans le génome peut perturber l'expression de gènes endogènes. Par le passé, certaines études de transfert de gène aujourd'hui arrêtées, ont créé des animaux affectés ou même malades [178,222]. Toute manipulation génétique rendant un animal souffrant n'est pas acceptable aussi bien pour les scientifiques que pour le public et les instances de contrôle.

Les questions environnementales associées aux O.G.M. concernant la nourriture, la contamination des écosystèmes, la menace de la biodiversité, ont fait réagir l'opinion avec force. Ces questions sont généralement plus problématiques pour les plantes transgéniques que pour les animaux. La

majorité des applications sur les animaux transgéniques sont biomédicales et les animaux n'entrent pas dans la chaîne alimentaire. Contrairement aux plantes, il y a peu de chance que les animaux transgéniques domestiques rencontrent des congénères sauvages pour s'accoupler. Concernant la biodiversité, des mesures ont déjà été prises pour préserver quelques races rares de la sélection génétique des animaux d'élevage. Théoriquement, ajouter un transgène dans une population augmente la biodiversité mais on peut craindre que les lignées transgéniques remplacent les autres lignées qui seraient moins résistantes à une maladie. C'est l'éternel problème d'une sélection à outrance qui, ici serait accélérée par les manipulations génétiques.

A.4.3 Question sociale

Les questions sociales à propos des animaux transgéniques mettent la science des biotechnologies au centre d'un examen sans précédent. La plupart des questions sont tournées sur l'éthique concernant l'usage des animaux transgéniques : la sécurité des produits, la santé des animaux génétiquement modifiés, des questions auxquelles une partie des réponses est scientifique. Parmi les interrogations soulevées, la plus difficile à aborder et à régler est la perception sociale des animaux et des produits créés. Par exemple, une protéine recombinante isolée de l'urine d'un animal transgénique engendre une perception négative du public et porte préjudice à la commercialisation du produit. Les sociétés voulant commercialiser des protéines recombinantes issues d'animaux transgéniques, développent de plus en plus leurs supports de communication vis-à-vis de grand public. Par exemple, Nexia a un site internet riche en informations sur le développement de ses chèvres transgéniques. La firme présente les conditions de logement de ses animaux pour prouver que ses produits sont fabriqués en respectant le bien être animal [95], point particulièrement sensible pour l'opinion publique.

Si une majorité ou une minorité agissante de la population contestent fortement l'usage des systèmes transgéniques de production, les compagnies deviendraient réticentes quant à la commercialisation de ces produits et le gouvernement en retarderait l'autorisation. Les groupes n'approuvant pas l'exploitation commerciale des animaux pour la production de nourriture, n'acceptent pas *a fortiori* le système de production transgénique. Le développement d'informations claires, disponibles gratuitement, sur les contrôles réglementaires des méthodes de production, sur les tests des produits, devrait aider tout un chacun à avoir une vision complète du sujet. Avec le développement d'internet, l'information est plus accessible, elle est vulgarisée par des sites internet tenus par des universités, gouvernements ou associations.

.A.5. Bilan

Tout travail sur les animaux transgéniques ne doit pas faire abstraction des problématiques qui l'entourent, les avantages promus doivent être démontrés ainsi que l'innocuité des produits dérivés. Cependant certains obstacles sociaux sont parfois insurmontables pour certains produits. Ce sujet reste une question publique très sensible. Même si en apparence les produits pharmaceutiques produits par les animaux transgéniques offrent des avantages significatifs en comparaison à une production conventionnelle, il est difficile de franchir la barrière de l'autorisation réglementaire et de la viabilité commerciale. Alors que les agences gouvernementales de réglementation doivent considérer seulement la sécurité et l'efficacité des produits, les législatures gouvernementales reflètent les préoccupations de la société et doivent considérer la balance des questions éthiques et du rapport coût/bénéfice pour la société, de l'usage d'animaux pour produire des biomédicaments.