

Année 2010



**L'ANIMAL MÉDICAMENT,  
L'OPOTHÉRAPIE AU DÉBUT DU XXI<sup>e</sup> SIÈCLE**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le.....

par

**Fanny BUISSON**

Née le 2 mai 1984 à Saint-Étienne (Loire)

JURY

**Président : M.**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL**

**Membres**

**Directeur : Dr. Sébastien PERROT**

Maître de conférences, Unité de pharmacie et de toxicologie ENVA

**Assesseur : Dr. Christophe DEGUEURCE**

Professeur, Unité d'anatomie des animaux domestiques ENVA



## LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François

LE BARS Henri, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques,

### DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p><b>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b> Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b> Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b> Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b> Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. TISSIER Renaud, Maître de conférences* M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b> M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p>	<p><b>-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b> M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences M. REYES GOMEZ Edouard, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE VIROLOGIE</b> M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b> M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE BIOCHIMIE</b> M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences* M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : ANGLAIS</b> Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p><b>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</b> M. PHILIPS, Professeur certifié</p>
---	---

### DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<p><b>- UNITE DE MEDECINE</b> M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Professeur M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b> M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Professeur* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mlle CHRISTMANN Undine, Maître de conférences Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel M. CARNICER David, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b> Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Professeur (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences* M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattaché au DPASP)</p> <p><b>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</b> Mme Françoise ROUX, Maître de conférences</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b> M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MOISSONNIER Pierre, Professeur M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérange, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences M. JARDEL Nicolas, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE</b> Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p><b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b> Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b> M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARGNAC Geneviève, Maître de conférences Mme HALOS Lénaïg, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT</b> M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</b> M. PARAGON Bernard, Professeur</p>
--	--

### DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<p><b>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b> M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Professeur Mme DUFOUR Barbara, Professeur Melle PRAUD Anne, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b> M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : BIostatistiques</b> M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences contractuel</p>	<p><b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b> M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Professeur*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b> M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences * Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences M. BELBIS Guillaume, Maître de conférences contractuel</p>
---	---

\* Responsable de l'Unité



# REMERCIEMENTS

## **Au Professeur,**

De la Faculté de médecine de Créteil,  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.  
Hommage respectueux.

## **Au Monsieur Sébastien PERROT**

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
Qui a dirigé ce travail.  
Que son efficacité, sa rapidité et sa patience trouvent dans ce travail l'expression de ma grande reconnaissance.  
Sincères remerciements.

## **À Monsieur Christophe DEGUEURCE,**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

À Romain.

À Serge, Marie-Charlotte et Laure, *carpe diem...*

À mes parents.

# TABLE DES MATIERES

Index des figures.....	3
Index des photographies.....	4
Index des tableaux.....	4
INTRODUCTION.....	5
PREMIÈRE PARTIE : L'OPOTHÉRAPIE.....	7
A Opothérapie : définition et aperçu historique.....	7
B Les grandes périodes de l'opothérapie [9,93].....	8
.B.1. Peuples anciens et période gréco-latine : l'opothérapie, médecine universelle.....	8
.B.2. Du Moyen Âge à la fin du 16ème siècle : l'opothérapie entre tradition et médecine savante.....	10
.B.3. La Renaissance, grande heure de l'opothérapie.....	10
.B.4. 17ème au 18ème siècle : opothérapie, abus et décadence.....	11
.B.5. Période scientifique de l'opothérapie.....	12
DEUXIÈME PARTIE: L'ANIMAL ENTIER COMME MÉDICAMENT.....	15
A La sangsue-thérapie.....	16
.A.1. Histoire de l'utilisation de la sangsue. [175,231,318].....	16
.A.2. Biologie de la sangsue.....	18
.A.3. Composition de la salive d' <i>Hirudo medicinalis</i> [76,231,245,319].....	20
.A.4. Indications de la sangsue aujourd'hui [19,232].....	24
.A.5. Contre indications effets indésirables [19,232].....	30
.A.6. Hirudiniculture et médecine.....	31
.A.7. Vers des sangsues mécaniques ?.....	31
.A.8. Bilan.....	33
B L'asticothérapie.....	34
.B.1. Historique.....	34
.B.2. Biologie et propriétés médicales des asticots.....	34
.B.3. Utilisation des asticots.....	35
.B.4. Quelques exemples d'asticothérapie :.....	36
.B.5. Perspectives .....	39
C Utilisation de l'abeille vivante.....	40
.C.1. Principe de la thérapie et application pratique.....	40
.C.2. Abeille et affections rhumatismales.....	44
.C.3. Abeilles et sclérose en plaque.....	47
.C.4. Abeilles et douleurs musculo-squelettiques.....	49
.C.5. Bilan.....	49
D La thérapie par des helminthes.....	50
.D.1. Les helminthes sont-ils immunosuppresseurs ?.....	51
.D.2. Helminthes : allergiques ou anti-allergiques ?.....	53
.D.3. Les dangers potentiels de l'usage thérapeutique des helminthes.....	55
.D.4. Les essais cliniques de traitement par les helminthes.....	56
.D.5. Bilan.....	58
E La thérapie par des poissons.....	59
.E.1. Les célèbres poissons de Kangal.....	60
.E.2. Utilisation des « doctor fish » dans le traitement du psoriasis.....	61
.E.3. Bilan.....	64
TROISIÈME PARTIE : BIOTECHNOLOGIES ET ANIMAL-MÉDICAMENT.....	65

<u>A Les animaux usines à médicaments.....</u>	<u>67</u>
<u>.A.1. La place des animaux dans la production de protéines pharmaceutiques.....</u>	<u>67</u>
<u>.A.2. Techniques de production d'animaux transgéniques.....</u>	<u>69</u>
<u>.A.3. Production de « bioproduits ».....</u>	<u>76</u>
<u>.A.4. Application commerciale des animaux transgéniques bioréacteurs.....</u>	<u>92</u>
<u>.A.5. Bilan.....</u>	<u>94</u>
<u>B Les animaux donneurs d'organes.....</u>	<u>95</u>
<u>.B.1. Introduction : pourquoi la xéno greffe ?.....</u>	<u>95</u>
<u>.B.2. Historique.....</u>	<u>96</u>
<u>.B.3. Le porc, donneur d'organe.....</u>	<u>98</u>
<u>.B.4. Les animaux transgéniques contre les barrières immunologiques de la xénotransplantation.....</u>	<u>101</u>
<u>.B.5. Techniques de xénotransplantation .....</u>	<u>112</u>
<u>.B.6. Bilan.....</u>	<u>124</u>
CONCLUSION.....	125
Liste des abréviations.....	127
Glossaire.....	129
BIBLIOGRAPHIE.....	144
ANNEXES.....	169

# INDEX DES FIGURES

Figure 1 Femme s'appliquant des sangsues, jarre de sangsue.....	16
Figure 2 Lancette.....	16
Figure 3 F.-J. -V. Broussais.....	17
Figure 4 Lithographie montrant la sangsue thérapie chez un patient.....	18
Figure 5 Anatomie d' <i>Hirudo medicinalis</i> .....	18
Figure 6 Effets de l'hirudine par rapport à l'héparine, sur la cascade de coagulation.....	21
Figure 7 Intervention des molécules de la salive d' <i>Hirudo medicinalis</i> sur les mécanismes de coagulation.....	22
Figure 8 Prototypage de sangsue mécanique.....	32
Figure 9 Localisation des glandes venimeuses de l'abeille ouvrière.....	43
Figure 10 Proposition sur l'effet anti-arthritique de la mélittine.....	45
Figure 11 Illustration de l'hypothèse de la boucle d'or (ou goldilocks en anglais) et de l'hygiène à travers l'exemple d'helminthes parasites digestifs.....	53
Figure 12 Illustration de l'infection helminthique au service de la santé.....	55
Figure 13 Carte de la Turquie.....	59
Figure 14 Les qualités respectives des différents systèmes de production de protéines (cf annexe 1 pour plus de détails).....	69
Figure 15 Différentes méthodes pour produire des animaux transgéniques.....	72
Figure 16 Un aperçu schématique des étapes de la production de poules transgéniques.....	74
Figure 17 Exemple schématique de séquence d'un transgène utilisé par BioProtein Technologies pour produire une protéine d'intérêt dans le lait de lapine.....	76
Figure 18 Schéma comparatif du cycle de reproduction de la vache, de la chèvre et de la lapine....	78
Figure 19 Diagramme de production d'une protéine transgénique dans le lait.....	83
Figure 20 Schéma du principe utilisé par Therapeutic Human Polyclonals.....	90
Figure 21 Greffe d'organe en France, évolution 2000-2008.....	93
Figure 22 Le dilemme de la transplantation :.....	96
Figure 23 Obstacles immunologiques de la xénotransplantation.....	101
Figure 24 Physiopathologie du rejet suraigu.....	103
Figure 25 Schéma de l'endothélium porcine lors de la réponse primaire de rejet.....	105
Figure 27 Chimérisme hématopoïétique et délétion thymique.....	111
Figure 28 Exemples de support ou remplacement xénogénique.....	112
Figure 29 Répartition de greffes en France en 2008.....	113

# INDEX DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1. <i>Hirudo medicinalis</i> dans son milieu.....	19
Photo 2 Sangsue thérapie : un cas d'avulsion nasale.....	25
Photo 3 Sangsue thérapie un cas d'avulsion auriculaire.....	26
Photo 4Sangsue thérapie : un cas d'avulsion digitée due à une bague.....	27
Photo 5 Utilisation de sangsue pour résorber un hématome.....	28
Photo 6 Application de sangsue.....	29
Photo 7 Asticothérapie pour une gangrène d'une amputation transmétatarsienne.....	37
Photo 8 Asticothérapie pour une gangrène d'une amputation transmétatarsienne.....	38
Photo 9 Asticothérapie pour un ulcère du pied.....	39
Photo 10 Pot à prélèvement d'abeilles.....	41
Photo 11 Application de l'abeille sur la peau.....	60
Photo 12 Garra rufa.....	60
Photo 13 Plaques de psoriasis classique.....	61
Photo 14 Patient assis dans la piscine de soins durant la thérapie avec les Garra rufa.....	62
Photo 15 Trois patients avant et après ichthyothérapie combiné aux radiations UVA pendant 3 semaines.....	63
Photo 16 Pédicure par ichthyothérapie .....	64
Photo 17 Photographie d'un cœur de porc transplanté.....	106
Photo 18 Photographie du même cœur de porc.....	106
Photo 19 Photographie de la méthode d'adsorption des anticorps naturels.....	109
Photo 20 Segments d'aorte et d'artère pulmonaire.....	114

# INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 Opothérapie rapportée par quelques auteurs grecs anciens.....	9
Tableau 2 Tableau chronologique résumant les taux d'infections publiés dans la littérature médicale suite à une thérapie par les sangsues.....	30
Tableau 3 Les effets de l'apipuncture (BVA) sur l'arthrite rhumatoïde.....	46
Tableau 4 Exemple d'un protocole de piqûres chez un patient atteint de SEP.....	48
Tableau 5 Helminthes dont les propriétés de protection/induction/exacerbation.....	54
Tableau 6 Efficacité et tolérance des helminthes dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (résultats en intention de traiter).....	57
Tableau 7 Comparaison du temps requis pour obtenir des protéines recombinantes.....	79
Tableau 8 Niveau possible de production de protéines recombinantes dans le lait.....	79
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.....	81
Tableau 10 Quelques protéines pharmaceutiques en cours d'étude produites dans le lait.....	86
Tableau 11 Groupes européens et Nord américains produisant des bioproduits ou modèles biomédicaux chez les animaux transgéniques d'élevage.....	91
Tableau 12 Histoire clinique de la xénotransplantation.....	97
Tableau 13 Avantages et inconvénients des différents animaux source.....	100
Tableau 14 Distribution de l'épitope galactosyl dans le règne animal.....	102
Tableau 15 Résultats d'études de transplantation d'organes entiers de porcs à des primates-non-humains.....	117

# INTRODUCTION

Buffon disait : « Si les animaux n'existaient pas, ne serions-nous pas encore plus incompréhensibles à nous-mêmes ? ». L'animal a été et est au cœur des progrès de la médecine; il est source d'observations, fait office de modèle puis de support expérimental, sans oublier son utilisation en tant que médicament. Dès la préhistoire, l'Homme cherche autour de lui des remèdes pour soulager ses maux et l'animal, source de nourriture, joue un rôle central. L'alimentation carnée est en quelque sorte la première utilisation de "l'animal -médicament". Cette alimentation est l'amorce de l'opothérapie, terme désignant la thérapeutique par tous les produits animaux.

Mais qu'en est-il aujourd'hui : L'animal tient-il encore une place dans l'arsenal thérapeutique de la médecine humaine conventionnelle ? Vous avez peut-être entendu parler de zoothérapie, et bien non, vous n'y êtes pas ! L'animal n'y est pas médicament mais thérapeute, ce qui n'est pas ici l'objet étudié. Il faut donc poser les limites du sujet : l'utilisation de l'animal comme soutien psychologique ou moteur ne sera pas abordée, le terme "animal médicament" s'entend ici comme animal possédant des propriétés curatives ou préventives. Loin de l'idée de faire un catalogue des substances animales utilisées, ce travail s'attache à faire découvrir l'usage de l'animal entier à destination de la médication humaine.

Dans cette optique, de nombreuses questions sont soulevées. Comment "l'animal médicament" traverse-t-il les siècles jusqu'à notre époque? Est-il encore d'actualité? L'animal médicament, à l'heure des biotechnologies et cultures cellulaires, n'appartient-il pas au passé ? Et si l'on combinait "animal médicament" et manipulations génétiques : de la brebis Dolly aux Organismes Génétiquement Modifiés, quelles en seraient les perspectives?

Cette thèse espère vous donner un petit aperçu de la part que tient l'animal entier dans la médication humaine d'aujourd'hui et de demain. Je vous invite à plonger dans le mystère de "L'animal médicament, l'opothérapie au XXI<sup>e</sup> siècle"

Dans un premier temps, nous retracerons succinctement quelle a été l'utilisation historique de l'animal médicament à travers l'opothérapie. Ensuite, nous découvrirons l'usage actuel de l'animal-médicament en médecine et réapprendrons les vertus de la sangsue, des asticots, abeilles... Pour finir, nous nous attarderons sur les promesses de la technologie au service de l'animal-médicament.



# PREMIÈRE PARTIE : L'OPOTHÉRAPIE

## A Opothérapie : définition et aperçu historique

Opothérapie vient du grec *Opos* (suc) et de *thérapéia* (traitement), c'est donc l'utilisation thérapeutique d'organes ou d'extraits d'organes d'origine animale (Le Petit Larousse Illustré 1996). Créé par Landouzy, ce terme désigne une thérapeutique aussi vieille que l'humanité. L'opothérapie a traversé l'Histoire, non sans quelques déboires, pour finalement participer aux progrès de la médecine et plus particulièrement de l'endocrinologie.

Une première idée conductrice et très simple est utilisée depuis l'origine et universellement, en Chine, en Inde, en Grèce, chez les arabes, du Moyen Âge au XX<sup>ème</sup> siècle. L'idée que « *les viscères séparés du corps conservent une partie de leurs propriétés et que leur ingestion supplée à l'insuffisance d'organes similaires* » [93] conduit à l'usage thérapeutique de produits organiques tels que sang, **bile**, foie, testicules...

L'attraction de l'Homme vers le fantastique et le merveilleux s'ajoute à cet usage et lui fait employer une série de remèdes animaux dont le caractère extrême ou répugnant constitue leur seule valeur. Un remède prenait d'autant plus de valeur qu'il était susceptible de frapper violemment les esprits, de faire appel à l'imagination, la magie, le morbide. Partout l'Homme s'est ainsi délecté d'excréments d'animaux (chauve-souris, chien...), absorbés avec la même ferveur que les bouillons de vipère ou scorpion, graisse des pendus, **mumie** d'Egypte (momie réduite en poudre), avec incantations magiques au clair de lune. Les extravagances de certaines pratiques finirent par discréditer tous les médicaments animaux et l'opothérapie sombre alors dans le ridicule et l'oubli.

Il fallut toutes les recherches sur la physiologie des glandes et les « *merveilleux résultats de l'opothérapie thyroïdienne* » [93] pour démontrer la valeur des extraits d'organes et remettre l'opothérapie sur pied, non sans quelques excès. La découverte de principes actifs et le concept d'hormone préfigurent une nouvelle ère thérapeutique pour l'opothérapie et plus largement pour la médecine.

L'histoire de l'opothérapie s'écrit en quatre grandes périodes : peuples anciens et période gréco-latine, du Moyen Âge à la fin du 16<sup>ème</sup> siècle, du 17<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> siècle et la période scientifique.

## B Les grandes périodes de l'opothérapie [9,93]

### .B.1. Peuples anciens et période gréco-latine : l'opothérapie, médecine universelle

L'emploi de remèdes animaux se retrouve dans la plupart des peuples, en voici quelques usages non exhaustifs.

#### B.1.1 Indiens

Malgré leur répugnance pour la chair animale, ils utilisaient par exemple « *des testicules de bouc comme aphrodisiaque lorsqu'ils avaient de trop nombreuses épouses à contenter* » ou encore un « *remède composé de crocodiles, rats, grenouilles et moineaux donnait à l'homme une puissance de coït infinie pourvu qu'il ne touchât pas le sol* »[93].

#### B.1.2 Chinois

La pharmacopée chinoise dont certains usages thérapeutiques persistent encore aujourd'hui, employait dans le même but que les indiens, du pénis séché de bouc. Pour les maladies de l'intestin, elle préconisait des matières fécales desséchées, de la fiente de poulet pour les ballonnements de ventre, de la peau de couleuvre pour les paralysies, un **bézoard** de vache pour les **catarrhes** pulmonaires, du sang de cerf tiré de l'animal vivant pour la **phtisie**, du sang d'âne de la même façon pour guérir la folie, du « N'go-kia » colle de peau d'âne pour arrêter diarrhée et crachement de sang.

#### B.1.3 Hébreux

Les hébreux connaissaient l'usage du **fiel** dans les **ophtalmies**. Tobie guérit la cécité de son père en frottant les yeux avec du fiel de poisson. Cet usage est encore retrouvé en 1910 en Grèce, à Rome, chez les Arabes sud oranais.

#### B.1.4 Grecs anciens

Là encore, on retrouve de nombreux remèdes animaux. Dans l'Iliade [119], Chiron Le Centaure nourrissait Achille son élève, de moelle de lions pour lui donner leur courage. Les temples d'Esculape (dieu de la santé et de la médecine), recommandaient de la chair de vipère aux lépreux. Le tableau suivant donne un aperçu de l'utilisation de l'opothérapie rapportée par les grecs anciens (Tabl. 1).

**Tableau 1. Opothérapie rapportée par quelques auteurs grecs anciens**

Auteur	Remèdes animaux proposés
<b>Hippocrate</b>	Donna une longue liste de médicaments animaux dont beaucoup se sont conservés jusqu'en 1900 : -comme <b>diurétique</b> : une infusion de miel et vin de <b>cantharides</b> dont il ôtait les ailes et les pattes. Les cantharides sont utilisées en 1900 pour les néphrites. -du fiel de taureau en suppositoire avec du miel contre l'engorgement intestinal.
<b>Arété</b>	- inventa les cantharides en vésicatoire -usa également de <b>castoréum</b> pour les maladies chroniques, de cervelle de vautour pour l' <b>épilepsie</b> , de chair de vipère pour l' <b>éléphantiasis</b> - plongeait les pieds du malade dans le ventre encore chaud d'une chèvre nourrie d'iris pour guérir la <b>goutte</b> .
<b>Asclépiade Pharmacien</b>	Eut la gloire, vite partagée, de faire manger des excréments animaux et humains dans diverses maladies
<b>Musa</b>	Introduisit à Rome: -la chair de vipère contre les ulcères malins -du sang encore chaud des gladiateurs pour les épileptiques -du foie de pigeon frais et cru contre l'hépatite -du foie de renard desséché pour l' <b>asthme</b> -des limaçons pilés avec leur coquille comme cicatrisant.
<b>Andromaque, médecin de Néron</b>	Inventa la <b>thériaque</b> avec la chair de vipère, médicament dont l'usage s'est conservé longtemps.
<b>Galien</b>	Conseille du foie de loup en cas de <b>jaunisse</b>
<b>Coelius Aurélianus</b>	Opposa hygiène et thérapeutique, s'insurgeant contre toutes ces « <i>matières [...]</i> toutes si abominables » [93]
<b>Pline l'Ancien</b>	Trouva les remèdes animaux plus efficaces que ceux des plantes et en relatait une variété considérable: -encore des foies de loup/belette dans les maladies du foie -cervelle de chameau/âne pour l'épilepsie -poumon de renard, vautour, lièvre, ours pour les douleurs du rein ou l'incontinence urinaire -testicule (ours, hyène, sanglier, cheval) en cas d'impuissance -cendres d'excréments de chameau/sanglier/bouc, pour les diarrhées -présure de chevreau ou lièvre cheval pour les gastrites -cantharides pilées avec de la poix fondue contre l' <b>alopécie</b> Quant aux serpents, Pline les pensait rangés dans les attributs du Dieu de la médecine car ils fournissaient des remèdes précieux

Les médecins grecs considéraient qu'un viscère sain possédait une spécificité propre contribuant à rétablir l'organe malade correspondant. Pline et Discordine notamment, employaient les organes selon cette loi de l'identité. Cette théorie mena à l'utilisation de testicules pour les impuissants, de foie pour les troubles hépatiques, jusqu'à la décoction de « derrière de bœuf » à ceux affligés d'**hémorroïdes**.

### **B.1.5 Arabes**

Avicennes, vers l'an 1000, conseillait aux nourrices des tétines de brebis/chèvre cuites dans leur lait et pour les douleurs articulaires, de l'huile dans laquelle un renard a cuit.

### **.B.2. Du Moyen Âge à la fin du 16<sup>ème</sup> siècle : l'opothérapie entre tradition et médecine savante.**

L'opothérapie était étudiée par l'École de Salerne, haut lieu de la médecine médiévale. Cependant, le Moyen Âge reste une époque d'ignorance où la tradition se perpétue. Les bourreaux faisaient commerce fructueux des cadavres de suppliciés, utilisés contre l'épilepsie et l'**apoplexie**, mais la majorité des remèdes étaient d'origine animale.

Albert Le Grand (12<sup>ème</sup> siècle) prêchait toujours la loi de l'identité avec un remède récurrent dans la littérature médicale : le testicule de porc pour les impuissants.

Pour encore plus d'efficacité « *quand on veut donner de l'amour, on cherche l'animal qui est le plus chaud à l'heure à laquelle il est le plus vigoureux dans l'accouplement, parce que, pour lors, il a le plus de force au combat amoureux ; ensuite on prend de lui la partie la plus propre à l'amour. Si donc l'homme est peu puissant, il faut lui faire manger des testicules de porc ; pour faire concevoir la femme, il faut lui faire prendre de la matière de lièvre* » (la vertu des animaux)

Gilbert d'Angleterre prétendait faire expulser des calculs vésicaux en faisant boire du sang de jeune bouc nourri avec des herbes diurétiques comme du persil ou du **saxifrage**.

Mesué, arabe chrétien, préconisait à l'apothicaire de posséder dans sa pharmacopée 56 drogues animales dont il établit la liste (foie de loup mélangé à l'**athanasie** pour les maladies du foie...). Ses formules passent dans la pharmacopée jusqu'à la fin du 16<sup>ème</sup> siècle. Mesué avait déjà la préoccupation de fournir un remède animal le plus sain possible, des poumons de renard, il disait qu'ils devaient « *être bien sains, tirés de l'animal récemment tué ; il ne faut pas que l'animal soit mort de maladie de peur que le viscère ne fût imbu de méchante impression, ni ait péri de vieillesse, car serait privé d'esprit* » [93].

### **.B.3. La Renaissance, grande heure de l'opothérapie.**

Jean Gaddesden, au début du 16<sup>ème</sup> siècle rétablissait la mémoire avec du cœur de rossignol, traitait les **hémorragies** avec des excréments de porc et faisait tomber les dents avec de la graisse de reinette.

Paracelse chercha ensuite à se mettre à l'abri des putréfactions animales en tentant d'extraire la quintessence des organes par des moyens chimiques « *tout est poison, rien n'existe sans poison et l'ont doit, par conséquent, utiliser les poisons* ». Il employait surtout des remèdes fantastiques : glu de vers de terre, mousse de crâne de cadavres, cendres de grenouille. La mumie était également encore très prisée.

Ambroise Paré, chirurgien et anatomiste français, utilisait de "l'huile des petits chiens" pour cautériser des plaies (chiots nouveaux nés bouillis dans de l'huile de lys avec des vers de terre et de la **térébenthine**). L'usage de remèdes issus de canidés était courant. Le loup a d'ailleurs été l'objet d'un traité entier par Gabelchover sur son usage en médecine.

Jean de Renou, médecin d'Henry IV suivait les conseils de Mesué « *il n'est pas malséant au pharmacien d'en tenir dans sa boutique et particulièrement de la fiente de chèvre, paon, pigeon, du musc de civette* » sans compter l'*album graecum* qui correspond à de l'excrément de chien desséché.

Du batracien aux mammifère, tout animal a un intérêt médical, il n'en est pas perdu une miette comme le montre l'utilisation du hérisson : en décoction ou réduit en cendres et bu pour empêcher les fuites urinaires, son foie desséché et pulvérisé pour les maladies rénales, la **cachexie**, l'**hydropisie**.

#### **.B.4. 17<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> siècle : opothérapie, abus et décadence**

Dans tout le 17-18<sup>ème</sup>, on trouve les mêmes pratiques sans grandes modifications pendant que la science progresse...

Les essais opothériques continuèrent. Ettmuller assura avoir guéri une femme à demi morte d'une perte de sang rebelle à tout autre remède par prise de fiente de chien en poudre.

Vers 1624 : Ducheson (sieur de la Violette) recommandait encore des dragées faites de poumon de renard contre toutes les maladies du poumon. Renard, lièvre, loup, hyène seraient pour les gens riches, veau et agneau suffisants pour les pauvres. Certains pensaient encore que les animaux sauvages étaient plus efficaces. Sans doute étaient-ils difficiles à se procurer, ce qui en faisait leur valeur médicale?

Mme de Sévigné écrivait à sa fille "*M<sup>elle</sup> de la Fayette vient de prendre du bouillon de vipère qui lui donne des forces à vue d'œil*", et d'elle même "*j'ai pris 8 gouttes d'essence d'urine de vipère pour mes vapeurs* »[93].

Des poudres confectionnées par La Voisin étaient livrées à beaucoup de dames de qualité. Celle qui devait aider Mme de Montespan à conserver l'amour du roi contenait poussière de taupe séchée, sang de chauve-souris.

L'alchimiste David Planis Campy dit l'Edelph (1646) reprît Paracelse en rapportant que : l'eau distillée de sang était admirable contre les affections internes et la **pleurésie**, l'eau des crabes contre les cancers, l'eau de semence de grenouille contre les brûlures et l'**érysipèle**, de la vessie de hareng pour l'expulsion des urines.

*"Le sang des animaux bu tout chaud par un homme communique au buveur les façons et les airs de la bête : du sang d'âne, animal pesant et assoupi, tiré près des oreilles guérit les maniaques les plus dangereux, de la râpure de corne de taureau râpée pendant le coït rend les gens vigoureux en amour ou du sang et cerveau d'un moineau tué en même temps. "* [93]

Kirikirius dans son "**Art Magnétique**" formulait que les parties des animaux conviennent aux mêmes parties que l'homme, par exemple : foie de loup/renard pour les atteintes hépatiques.

Daniel Becker (1622) appliquait le même principe « *la belle et divine harmonie qui se trouve entre les parties et par laquelle un membre est propre à soulager le même membre et les mêmes parties, prouve combien il est évident et certain qu'ont peut tirer de très grands remèdes du corps humain, les choses semblables étant conservées par leurs semblables si véritablement que certaines parties des bêtes soulagent et guérissent les mêmes parties du corps de l'homme.* »

Le bouillon de grenouilles eut l'honneur en 1791 de conduire à la découverte de la pile électrique. Galvani en préparant un bouillon pour sa femme observa pendant un orage les mouvements électriques des pattes de grenouilles qu'il avait pendues à un balcon de fer. Il chercha alors les lois du phénomène.

Enfin, en 1798, La Pharmacopée universelle de Lérémy [163] signa l'apogée de l'opothérapie.

Inévitablement, avec les progrès de la science, les médecins étaient de plus en plus septiques au sujet des médecines animales, plus bizarres qu'efficaces. Après les abus, vint donc la décadence de l'opothérapie. Les préparations organiques si difficiles à conserver, si répugnantes, aussi bien à l'esprit qu'à l'estomac disparurent. Persistèrent comme remèdes animaux, les cantharides, le castoréum et les yeux d'écrevisse.

Les remèdes animaux furent oubliés pendant un siècle dans le monde médical mais les traditions populaires conservaient l'usage de certains[9]:

- Testicules de taureau difficiles à avoir car très recherchés par les gitans comme stimulant sexuel.
- Le sang artériel bu à l'abattoir pour les **anémies**, menstruations irrégulières, **chlorose**.
- Un pigeon ouvert en deux, vivant, placé sur la tête du malade de **méningite**.
- La **thériaque**, antipoison courant, utilisant entre autre de la chair de vipère séchée, devint botanique puis chimique avec les progrès rapides de la science.

## **.B.5. Période scientifique de l'opothérapie**

### **B.5.1 La naissance de l'endocrinologie**

Avec les découvertes physiologiques du 19<sup>ème</sup> siècle et l'avènement de la médecine expérimentale sur les animaux, l'opothérapie entre dans l'ère scientifique.

Claude Bernard découvrit les fonctions de glande mixte du foie et pose en 1867, le principe des sécrétions internes "*celles qui sont versées dans le milieu organique intérieur*" et externes "*celles qui s'écoulent au dehors*". Le rôle physiologique de ces sécrétions fut reconnu avec les "diastases glandulaires"<sup>1</sup>, des synergies interglandulaires furent mises en évidence. Les déficiences pathologiques de ces sécrétions internes furent alors étudiées menant par exemple à l'emploi de certains extraits digestifs tels que la pepsine, pancréatine, bile, huile de foie de morue...

Brown-Séguard succéda à Claude Bernard en 1878 à la chaire de médecine expérimentale, au Collège de France. Il édifia l'opothérapie en véritable corps de doctrine en reprenant dans les "*mêmes termes et avec une conception aussi simpliste des choses, ce qu'avaient, à l'envi, proclamé tous les peuples anciens*" (d'après Carnot [93]). Il annonça en juin 1889 s'être injecté sous la peau un extrait aqueux de testicules broyés de chien et de cochon d'Inde. Il affirma que ces injections lui avaient rendu ses forces physiques et ses capacités, que l'âge avait atténuées. Il concéda toutefois que cette méthode n'en était qu'à ses premiers balbutiements. Il explora la pathologie endocrinienne pendant plusieurs dizaines d'années, suivi par de nombreux chercheurs.

En 1905, la revue Lancet publia l'article de Bayliss et Starling [190] qui créent le terme «hormone», du grec hormao (ὁρμάω, qui signifie «je relève» ou «j'excite»), pour définir des substances chimiques telles que la sécrétine, qui sont capables, dans des quantités extrêmement faibles, de stimuler des organes à distance. Ces hormones étaient utilisées pour leur action homostimulatrice si aucun déficit de la glande correspondante n'était observé et si l'expérimentation avait démontré une efficacité particulière : extrait hypophysaire pour les **hémoptysies**. Les hormones étaient également utilisées pour leurs actions freinatrices : extrait ovarien dans l'hyperthyroïdisme ou pour empêcher les infections ovariennes.

Les travaux se multiplièrent dans tous les pays, l'endocrinologie s'affirma comme une des sections les plus importantes de la médecine, d'autres principes actifs comme l'adrénaline, la thyroïdine et l'insuline furent découverts.

Physiologistes, médecins, chimistes cherchaient à obtenir des produits purs d'une efficacité maximum, ils voulaient isoler le principe actif et le reconstituer synthétiquement. Schiff compara les effets de la thyroïdine avec les extraits thyroïdiens mais les extraits complets étaient parfois plus efficaces que le produit chimique.

---

<sup>1</sup> Diastases glandulaires : (vieux) substance organique qui accélère une réaction biochimique.

### **B.5.2 Essor de l'opothérapie et organisation de la filière des matières premières**

Carnot s'éleva contre les abus et fantaisies de la méthode en déclarant qu'on "*se remet à absorber toutes sortes d'organes au hasard et souvent avec les mêmes excès que jadis*" [93]. Dans l'ordre de fréquence d'emploi, voici quelques exemples d'extraits utilisés [93,138] : ovaire, thyroïde, surrénales, hypophyse, foie, pancréas, fœtus, estomac, intestin, bile, rate, moelle osseuse, nœud lymphatique. Les testicules, premiers à avoir été employés étaient peu à peu abandonnés. D'autres extraits existaient mais étaient plus rarement utilisés en France : thymus, mamelle, placenta, tissu nerveux, poumon, rein, prostate, parotide, derme, os, corps ciliaire de bœuf.

Ce nouvel essor de l'opothérapie, augmenta grandement la demande en matière première. La récolte des organes et des substances était difficile et demandait du personnel formé, engendrant une mutation profonde du réseau. Au départ les organes étaient prélevés par le tueur; aussi, des erreurs anatomiques étaient possibles. Celui-ci en avait l'entier bénéfice en les revendant au ramasseur du laboratoire. Puis, les tripiers de gros s'assurèrent le monopole.

Des conditions de conservations douteuses étaient rapportées avant 1914-1918. En effet, la demande était supérieure à l'offre ; on importait même de l'Europe, les organes attendaient donc enchères et tractations, conservés quelque fois mais pas toujours dans de la glace, livrés dans des poubelles ou boîtes en fer blanc. Les organes de peu de poids étaient conservés dans de l'alcool (qui sert jusqu'à épuisement) pour attendre un nombre suffisant [9]. "*En réalité les procédés actuels de récolte des organes animaux aux abattoirs constituent un véritable sabotage*" [35]. L'hygiène et les conditions de récolte et de conservation jusqu'alors laissées de côté, devinrent des préoccupations centrales. L'animal à prélever devait avoir été inspecté et déclaré sain. Il fallait éviter la putréfaction des organes à l'origine de nombreuses intoxications. De nombreuses méthodes étaient proposées : stérilisation par la chaleur, emploi d'antiseptiques (acide chlorhydrique), filtration [9]. Des ateliers spécifiques se développèrent dans certains abattoirs.

### **B.5.3 Isolement des principes actifs**

Deux phases se succédèrent alors [182],

- une première, correspondant aux années 1900-1923, durant laquelle le concept d'hormone se précisa avec l'inventaire et la description détaillée des effets que ces substances produisent,
- une seconde, entre 1923 et 1935, au cours de laquelle les hormones furent d'abord isolées chimiquement, puis fabriquées par synthèse.

Le retentissement de ces succès scientifiques fut considérable et donna naissance à une spécialité médicale nouvelle, l'«endocrinologie», mot datant de 1912. En 1924, Courrier réussit à isoler l'«hormone ovarienne» ou «folliculine». Mais, en 1929, Corner et Willard Myron Allen en découvrirent une autre, la "progestine" (progestérone). Obtenir la folliculine et la progestine à l'état cristallisé devint l'objectif des chimistes dans les années trente. En 1932, Girard extrayait un kilogramme d'œstrone cristallisée à partir de sept cents tonnes d'urines de juments. Butenandt réussit, en 1934, à isoler l'hormone du corps jaune: en traitant six cents kilos d'ovaires de truies, soit 50 000 animaux, il en avait extrait 12 milligrammes de «progestine» cristallisée.

Pour se libérer du facteur limitant animal et pour éliminer le risque viral, on chercha à synthétiser toutes les nouvelles hormones découvertes. En 1938 apparaît le premier œstrogène artificiel le trop

célèbre diéthylstilboestrol<sup>2</sup>

Par génie génétique, dans les années 1990, des cellules de mammifères en culture (hamsters) furent rendues capables, après transfection, de synthétiser de la FSH, de la LH, de l'hCG recombinantes. En thérapeutique, ces hormones sexuelles ont paru présenter des vertus incroyables comme la capacité de guérir la schizophrénie, le pouvoir de rajeunir les personnes âgées.

L'industrie, à la fin du siècle, a ensuite commercialisé de nombreuses hormones recombinantes et l'officine de l'endocrinologie devient indépendante de l'animal.

---

<sup>2</sup> Diéthylstilboestrol : Distilbène® responsable quand il est absorbé par une femme enceinte, de malformations de l'appareil génital et de cancers vaginaux si le fœtus est une fille.

# **DEUXIÈME PARTIE :**

## **L'ANIMAL ENTIER COMME MÉDICAMENT**

Utilisons-nous encore aujourd'hui l'animal-médicament ? Nous verrons que sangsues et asticots sont encore d'usage. Abeilles, vers parasites et poissons, méritent également que nous nous y intéressions pour que le tour d'horizon actuel soit complet.

## A La sangsue-thérapie

La sangsue est utilisée depuis la plus haute antiquité, elle a connu des moments de gloire puis de désuétude pour finalement redevenir l'objet d'une pratique courante aujourd'hui. Nous allons suivre son parcours historique et nous intéresser ensuite à ses caractéristiques et son utilisation actuelle.

### .A.1. Histoire de l'utilisation de la sangsue. [175,231,318]

Figure 1. **Femme s'appliquant des sangsues, jarre de sangsue**



Source : Bossche, Guillaume van den, Bruxellas, Typis Joannis Mommarti, 1639 *Historia medica, in qua libris IV*

L'utilisation des sangsues, en médecine (Fig.1 et 4), remonte jusqu'à la 18<sup>ème</sup> dynastie égyptienne (1567-1308 avant J.-C.). Sa première référence, écrite du second siècle avant J.-C., relate de son utilisation lors de morsures venimeuses. Mentionnée également dans le Sanscrit, la littérature perse et arabe, elle reste sujette à polémique dans la société gréco-romaine. Pline l'Ancien la préconise dans le traitement des **phlébites** et des hémorroïdes. Utilisée volontiers par l'école méthodiste, elle est généralisée par Avicennes pour éliminer du corps les substances antipathiques et ainsi restaurer la balance des 4 humeurs (sang, phlegme, bile jaune, bile noire) altérée par la maladie.

Figure 2.  
**Lancette**



© Parks Canada  
2009  
*Dictionnaire  
descriptif et visuel.*

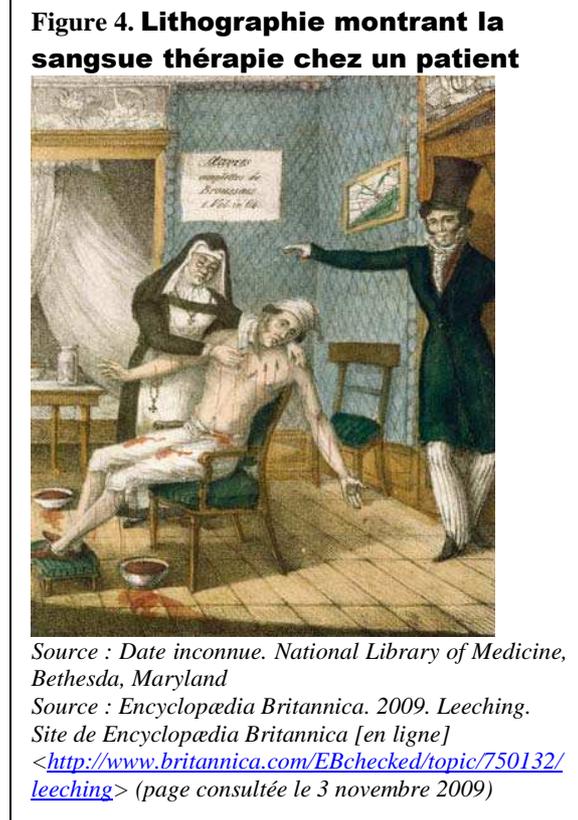
Au Moyen-âge, les utilisations de l'application de sangsue se multiplient puis déclinent ensuite à la faveur de la pratique de la saignée avec la **lancette** (Fig. 2) du barbier chirurgien.

C'est à la Révolution que la pratique de phlébotomies et de saignées avec les sangsues reprend en raison du manque de chirurgiens.

Au 19<sup>ème</sup> siècle, les sangsues ont la faveur des médecins dont le célèbre chirurgien en chef de l'armée de Napoléon, François-Joseph-Victor Broussais

(Fig. 3) qui contribue à favoriser directement ou indirectement l'emploi des sangsues. Ses souscriptions se limitaient à la saignée ou à la diète ; il suivait à la lettre la doctrine physiologique : « *Toute maladie étant une hyperstimulation, le plus souvent une inflammation de l'estomac, il faut la combattre par des mesures anti-inflammatoires, « antiphlogistiques », par l'application de sangsues, de préférence sur l'abdomen et par une diète stricte* ». On en prescrivait alors plusieurs millions chaque année pour soigner les **pharyngites**, les problèmes ophtalmiques, l'obésité, les désordres mentaux...

Surnommé par ses adversaires « le vampire de la médecine », on lui attribua à tort ou à raison de nombreux « assassinats médicaux » notamment celui de Casimir Perier, mort en mai 1832 du **choléra**... aidé par les saignées.



L'engouement pour les sangsues épuise vite les réserves françaises et celles des pays voisins, les marais sont dépeuplés par une pêche abusive de sangsues entre 1820 et 1840. Le commerce de la sangsue s'organise, prélevée en eau douce ou en eau de mer, elle est importée de Hongrie, Grèce, Turquie. Les plus recherchées sont celles de Terre-neuve, du golfe de Guinée, des eaux chiliennes. Avec le transport, la mortalité est élevée, les prix flambent. Ce commerce florissant conduit au développement d'élevages de sangsues mais aussi à des tromperies. Vendues au poids, les sangsues n'avaient pas le tube digestif vide, des fraudeurs les vendaient déjà à moitié gorgées de sang. Les hôpitaux parisiens utilisent à eux seuls plus d'un million de sangsues par an.

On a dû reconnaître que l'usage des sangsues n'avait pas les effets escomptés... surtout face aux épidémies de choléra. Pasteur et l'avènement de l'**asepsie** achevèrent l'engouement pour les sangsues, celles-ci apparaissant comme de grands vecteurs de germes.

Au XX<sup>ème</sup> siècle, les sangsues disparaissent des officines, mais ne disparaissent pas de la thérapeutique. En 1920, l'engouement renaît suite aux travaux menés en France sur le traitement des **thromboses** et phlébites. C'est à cette époque que le Dr Heinz Bottenberg publie « The Leech Therapy » qui reste encore une référence aujourd'hui. Il décrit les effets locaux et généraux de

l'application des sangsues dans les troubles vasculaires. La sangsue doit ce renouvellement d'intérêt à ses propriétés anticoagulantes. Cependant la découverte de l'héparine par Mac Lean en 1916 finit par inverser une nouvelle fois la tendance.

Dès 1884, Haycraft découvre l'**hirudine** et son pouvoir anti-coagulant. Cette découverte associée au développement de la microchirurgie, remet la sangsue d'actualité. En effet, certains voient dans la sangsue une solution aux problèmes de stase et de congestion lors de greffe. En 1960, les chirurgiens Derganc et Zdravic sont les pionniers du phénomène, ils publient un article dans le « British Journal of Plastic Surgery » sur les avantages d'utilisation de sangsues dans la technique de transplantation cutanée par rotation de lambeau. Puis le Dr Roy Sawyer, scientifique américain, contribue à l'essor de cette thérapie en créant au Pays de Galles la première ferme d'élevage de sangsues à rayonnement mondial.

En France, c'est le Professeur Baudet, spécialiste de la chirurgie plastique au C.H.U. de Bordeaux qui initie l'utilisation des sangsues en chirurgie réparatrice. Il est le premier en 1972 à les utiliser pour la réimplantation des doigts.

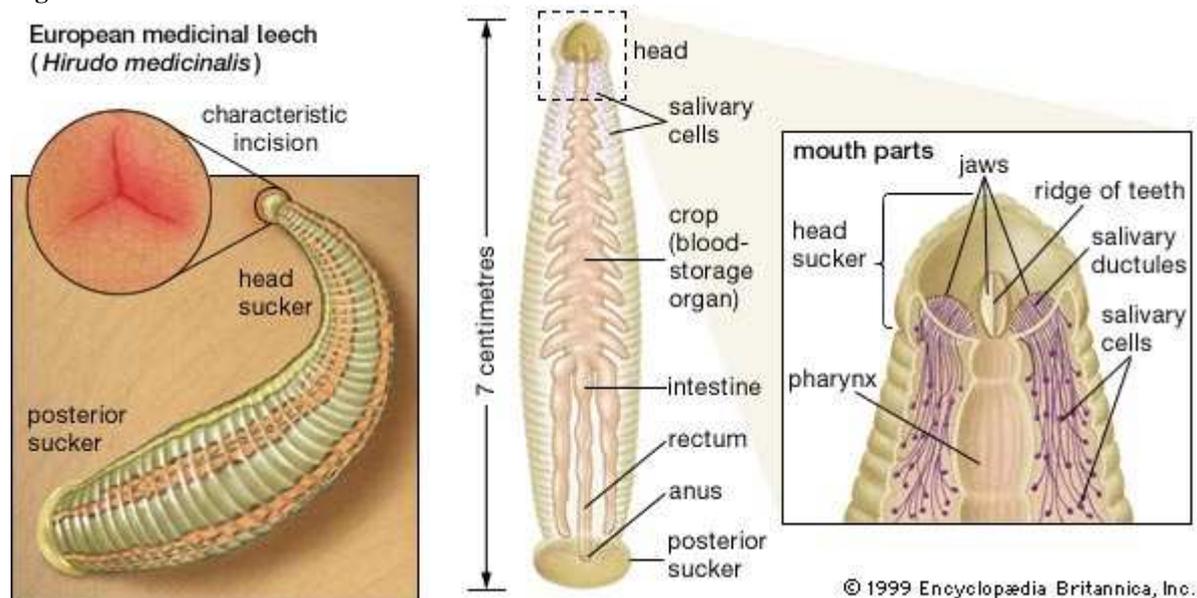
## **.A.2. Biologie de la sangsue.**

Les sangsues appartiennent à l'embranchement des Annélides et forment la classe des hirudinées. Elles sont souvent ectoparasites de Vertébrés.

### *Morphologie*

Les sangsues sont des vers segmentés, hermaphrodites naissant mâle et devenant femelle. Elles possèdent 2 ventouses (Fig.5), une antérieure et une postérieure. La première, de petite taille, correspond à la bouche et fonctionne comme un organe de succion; la seconde sert uniquement à l'ancrage et au déplacement.

**Figure 5. Anatomie d' Hirudo medicinalis**



© Source : Encyclopædia Britannica. 2009. Leeching. Site de Encyclopædia Britannica [en ligne]  
 <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/750132/leeching>> (page consultée le 3 novembre 2009)

Le genre *Hirudo* a bénéficié d'études approfondies du fait de l'utilisation médicale d' *Hirudo medicinalis*. Cette espèce appartenant à l'ordre des Gnathobdelliformes se distingue notamment par un pharynx armé de trois mâchoires dentées [245]. *Hirudo medicinalis* mesure environ 12 cm de long une fois gorgée et peut se contracter, réduisant de 2/3 sa taille [231]. De la même manière, son diamètre varie de 6 à 7 mm en fonction de la date du dernier repas.

#### *Reproduction*

La sangsue se reproduit un fois par an du printemps jusqu'en été. Elle pond 1 à 9 mois plus tard, des cocons qui vont éclore sous 6 à 8 semaines. La sangsue a une espérance de vie de 12 à 20 ans avec une croissance lente qui se termine au bout de 5 ans.

#### *Répartition géographique*

Il n'y a pas d'endroit au monde qui n'ait été colonisé par les sangsues, eaux douces (grande majorité) ou marines, sangsues terrestres ou troglodytes, même les installations sanitaires sont parfois concernées... L'Europe et l'Amérique du Nord comptabilisent la plus forte population. *H. medicinalis* est une espèce en voie de disparition (convention de Washington) depuis 1981, on la retrouve en France dans des étangs vaseux avec une végétation abondante (Photo 1), en Normandie et en Camargue.

**Photo 1. *Hirudo medicinalis* dans son milieu**



© Source : Ricarimpex. La sangsue. Site de Ricarimpex - élevage de sangsues [en ligne] <http://www.sangsue-medicinale.com/default.php> (page consultée le 28 juillet 2009)

#### *Alimentation*

Les sangsues se nourrissent très rarement et d'après certains auteurs, elles peuvent vivre 200 jours sans manger [231]. *H. medicinalis* est réputée exclusivement **hématophage**, mais les très jeunes sangsues médicinales mangent des larves d'insectes, de même les sangsues soumises au jeûne peuvent se nourrir sur des lombrics et des grenouilles.

Les sangsues affamées restent à la surface de l'eau et nagent aussitôt dans la direction d'une source de vibration. De plus, la recherche de nourriture et la morsure sont stimulées par la température corporelle des mammifères et la présence de sodium et d'arginine dans le sang. De puissants muscles actionnent leurs mâchoires créant ainsi une incision en Y (Fig. 5) par laquelle est injectée une salive riche en produits actifs. Les substances salivaires agissent sur l'incision elle-même et sur l'aspiration de sang par le maintien d'un flux constant. Elles comprennent un anesthésique local (supposé), un vasodilatateur, de la hyaluronidase, de la collagénase, des inhibiteurs de l'agrégation

plaquettaire et de la coagulation. Au cours d'un repas, la sangsue reste en place 20 à 40 min. Elle prélève 5–15 ml de sang soit 5 à 10 fois son poids, ce qui constitue un repas pour une année entière. La sangsue se détache d'elle-même de son hôte une fois « pleine ».

Le sang prélevé est déshydraté puis digéré dans l'intestin par la flore commensale (*Pseudomonas hiridinis* et *Aeromonas hydrophila*), pendant plus de trois mois, période durant laquelle la sangsue ne mordra plus [231,245]. Aucune enzyme digestive n'a été identifiée pour l'instant chez *Hirudo medicinalis*.

Après s'être détachée, la sangsue s'écarte pour gagner le fond de l'eau et se protéger sous une roche. Le cycle alimentaire de la sangsue est une succession de phases de faim et de satiété.

### **.A.3. Composition de la salive d'*Hirudo medicinalis*** **[76,231,245,319]**

*H. medicinalis* est la sangsue la plus étudiée parmi 650 espèces de sangsues, chaque espèce possédant un arsenal enzymatique diversifié, en rapport avec les différents comportements alimentaires. Les effets thérapeutiques de la sangsue reposent sur l'effet lié à la saignée mais aussi sur l'action de la salive. La salive de la sangsue est l'objet de nombreuses recherches, ses molécules et propriétés sont peu à peu précisées. Voici un bref aperçu de ses propriétés.

#### **A.3.1 Inhibition de l'agrégation plaquettaire**

Dans le plasma, les plaquettes peuvent s'agréger sous l'influence de nombreuses substances, telles l'ADP, l'épinéphrine, la thrombine et le **collagène**. La salive de sangsue contient plusieurs substances facilitant l'écoulement de sang, nourriture pour l'animal.

##### ***Hirudine***

La morsure de sangsue doit son effet anticoagulant à l'hirudine. Découverte par Haycraft en 1884, l'hirudine était employée au cours des transfusions sanguines en 1915 [175].

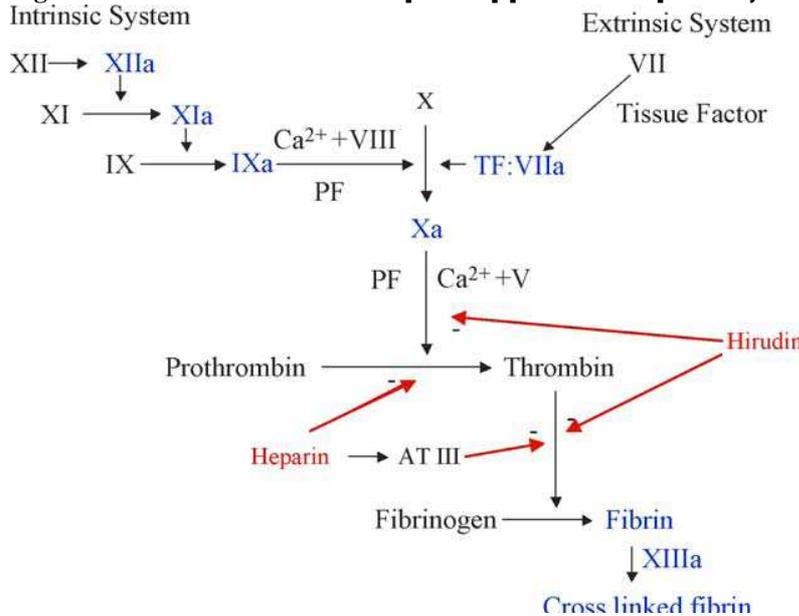
Elle fût l'objet de nombreuses recherches et est aujourd'hui produite par génie génétique [113]. Elle est utilisée dans les **thromboses** veineuses chez les patients développant une **thrombopénie** induite par l'héparine.

L'hirudine est un inhibiteur très spécifique de la thrombine, avec une affinité beaucoup plus élevée que le substrat naturel, le **fibrinogène**. Le mécanisme d'action de l'hirudine comme anti-coagulant commence seulement à être compris (Fig.6).

Le substrat pour la fixation de l'hirudine est la **thrombine**, qui est une enzyme protéolytique, qui, par activation (par le facteur X activé) à partir de sa forme zymogène, la prothrombine, coupe le fibrinogène dans le flux circulatoire pour le transformer en fibrine qui est nécessaire à la formation du caillot de sang.

Elle agit également sur le facteur Xa qui catalyse la conversion de la prothrombine en thrombine. Elle accélère fortement le relargage du facteur Xa à partir de cellules **endothéliales**. Le facteur Xa passe donc en solution dans le **plasma** où il est soumis à l'action de ses inhibiteurs.

**Figure 6. Effets de l'hirudine par rapport à l'héparine, sur la cascade de coagulation**



L'héparine inhibe la conversion de la prothrombine en thrombine ainsi que l'activité de la thrombine par l'anti-thrombine III (AT-III). L'hirudine a un effet inhibiteur direct sur la thrombine et pourrait avoir une activité contre le facteur X activé.

Source : Whitaker I.S., Cheung C.K., Chahal C.A.A., Karoo R.O.S., Gulati A., Foo I.T.H. By what mechanism do leeches help to salvage ischaemic tissues? A review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* (2005) 43, 155–160

L'hirudine est dégradée après environ 15 minutes alors que le saignement persiste plusieurs heures. Ce saignement serait attribué à une inhibition des fonctions plaquettaires par les molécules qui suivent.

### ***La caline***

Cette protéine interfère directement sur l'interaction plaquette-collagène mais aussi sur la liaison **facteur de Willebrand** et du collagène. Ces 2 effets pourraient contribuer à inhiber l'adhésion plaquettaire.

### ***L'apyrase***

Il s'agit d'un phosphohydrolase qui réalise l'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP. C'est un puissant anti-agrégant plaquettaire.

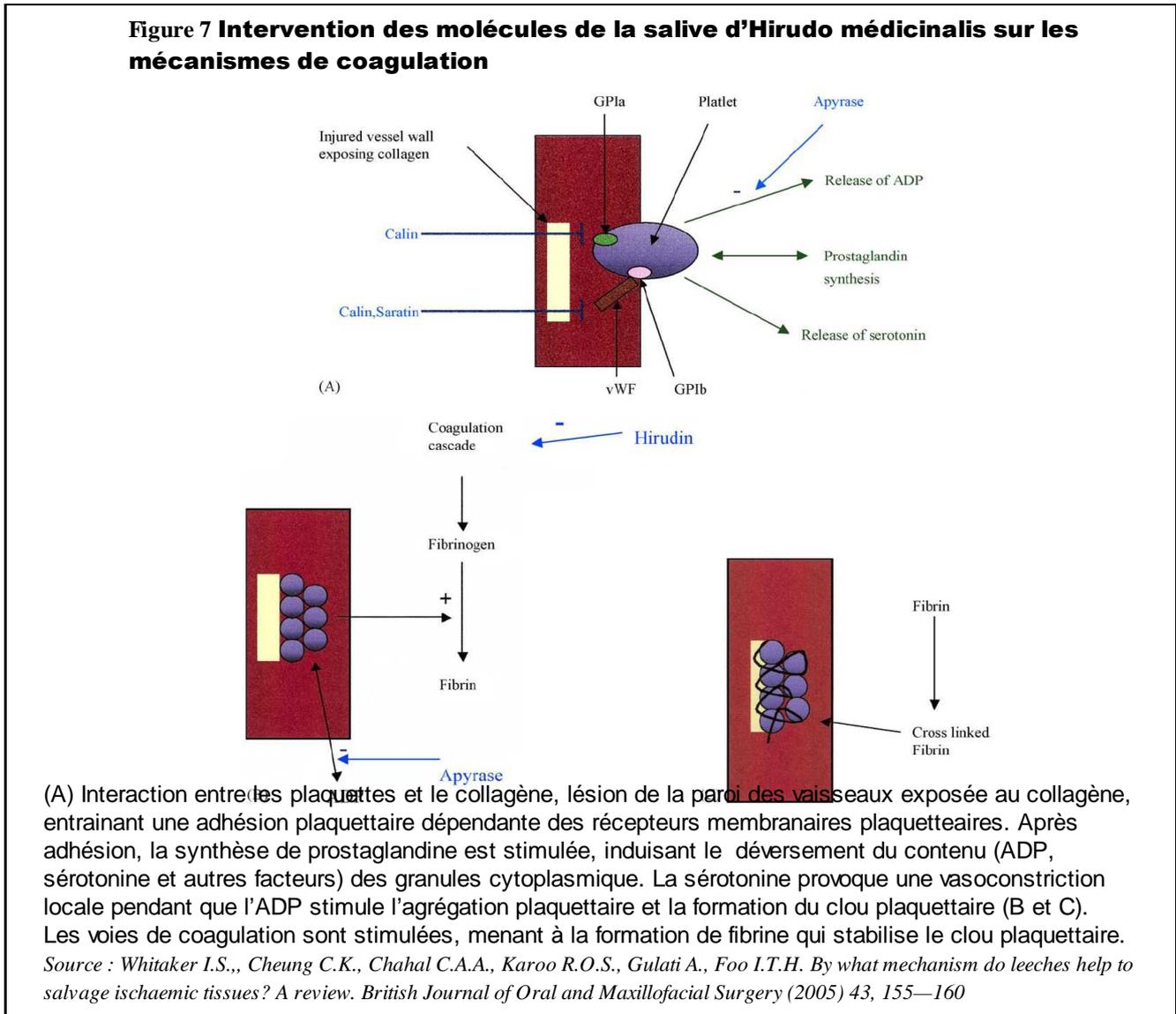
### ***La collagénase***

Cette enzyme clive la chaîne du collagène. Or le collagène intervient dans l'activation de l'agrégation plaquettaire.

### ***Une prostaglandine***

Ce composé agit comme la prostacycline et ses analogues et intervient sur l'agrégation plaquettaire en empêchant l'attachement et la diffusion des plaquettes sur le collagène et en activant l'adényl-cyclase des membranes plaquettaires, générant ainsi une molécule anti-agrégante.

Toutes ces substances contribuent à l'effet anticoagulant de la salive d'*Hirudo medicinalis* (Fig.7)



### A.3.2 Les inhibiteurs de protéase

#### *La bdelline*

Cette enzyme est un inhibiteur de la trypsine et de la chymotrypsine. Son action s'oppose à l'action de l'hirudine au niveau de la coagulation sanguine. Il en existe 2 types, la bdelline A et la bdelline B.

### ***L'églïne***

C'est un inhibiteur de protéinases lysosomiales et bactériennes, libérées lors de certains processus inflammatoires (exemples : chymotrypsine et élastase produites par les neutrophiles humains, cathepsine G et autres enzymes fabriquées par les granulocytes humains).

Cette enzyme peut jouer un rôle préventif de l'**emphysème pulmonaire**. En effet, l'équilibre élastase/antiélastase joue un rôle critique dans le maintien de l'intégrité des structures alvéolaires pulmonaires humaines.

### ***L'anti-kallikréine***

Il s'agit d'un inhibiteur des facteurs de coagulation que sont la kallikréine et le facteur XIIIa qui jouent un rôle dans le processus intrinsèque de coagulation.

## **A.3.3 Les protéases**

### ***La déstabilase***

Elle agit comme une isopeptidase c'est-à-dire qu'elle permet de liquéfier la fibrine soluble en lysant les liaisons  $\epsilon$ -( $\gamma$  glutamyl)-lysine de la fibrine stabilisée par le facteur XIIIa en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette enzyme confère donc aux sangsues la capacité de lyser les caillots, il ne s'agit donc plus uniquement d'un processus anticoagulant mais d'alimentation fibrinolytique.

### ***Les lipase et estérase***

Les sécrétions salivaires d'*Hirudo medicinalis* sont douées d'un pouvoir lipolytique pour digérer le sang ingéré. Deux enzymes sont responsables de la digestion lipidique : une lipase et une cholestérol-estérase.

### ***La hyaluronidase***

L'extrait de sangsue présente un facteur de diffusion. L'enzyme responsable de cette activité est une endo- $\beta$ -glucuronidase stricte avec pour seul substrat l'acide hyaluronique. Cette enzyme, la hyaluronidase, dégrade l'acide hyaluronique augmentant ainsi la diffusion de tous les principes actifs inoculés par la morsure de l'annélide.

### **Une substance vasodilatatrice**

C'est une substance similaire à l'histamine qui aurait un rôle vasodilatateur lors de la succion.

### **Une substance anesthésiante**

La morsure de sangsue étant quasiment indolore, cela suggère la présence de molécules anesthésiantes mais cela n'a pas été démontré.

## **.A.4. Indications de la sangsue aujourd'hui [19,232]**

Aujourd'hui, des préparations à base d'extrait de sangsues existent sur le marché comme Hirucrème® [175], qui se recommande pour les affections veineuses, **varices**, **ecchymoses**, hémorroïdes... L'hirudine n'est aujourd'hui produite que par génie génétique. L'héparine gardant la plus belle part, l'hirudine ne possède à ce jour qu'une indication, la prévention des thromboses veineuses profondes après chirurgie orthopédique programmée.

Reste enfin l'usage fréquent de la sangsue thérapie, généralement réservé aux hôpitaux, par l'intermédiaire des services de chirurgie plastique et traumatologique.

### **A.4.1 Sangsues et chirurgie**

Chaque année des milliers de patients subissent une réimplantation d'organes ou de membres perdus lors d'accidents. La microchirurgie sait sans peine suturer bout à bout les artères lésées, mais la réanastomose du réseau veineux plus fragile est beaucoup plus difficile. Le flux sanguin afférent est rétabli alors que la circulation retour n'est pas assurée. Le sang s'accumule alors, entraînant la congestion du greffon qui cicatrise mal. La compression des tissus par la masse sanguine conduit à un défaut d'oxygénation des tissus, puis à une **nécrose** locale. Dans ce cas, le recours aux sangsues est conseillé. La sangsue absorbe le sang qui s'accumule au niveau de la greffe faute de retour et permet ainsi d'éviter le détachement de la greffe par hyperpression.

La principale indication est donc la présence d'une insuffisance veineuse dont voici les critères de diagnose :

- ✚ Observation de la couleur cutanée : bleuâtre ou brunâtre.
- ✚ Un temps de remplissage capillaire court.
- ✚ Réponse à la piqûre : écoulement rapide d'un sang sombre.
- ✚ Historique de trouble de retour veineux.
- ✚ Présence éventuelle d'**œdème** dont la taille augmente rapidement.

L'application des sangsues permet de sauvegarder des tissus dont l'état veineux est médiocre, alors que la vascularisation artérielle est efficace [168]. Grâce à cette technique, 60% des transplantations digitales sont ainsi réussies [169].

L'application précoce de sangsues améliore la réussite des greffes de tissus dont la prise est compromise par une mauvaise vascularisation. Utilisée pour des chirurgies plastiques ou reconstructives maxillo-faciales [226], des doigts [24,69,107,168,264,300], du nez (Photo 2) [192,260], des lèvres [311], des oreilles (Photo 3) [39,131,293], des seins [102], des lambeaux cutanés [37] et même du pénis [189].

**Photo 2 Sangsue thérapie : un cas d avulsion nasale  
traitée au Thomas Jefferson University emergency department**



(1)



(2)



(3)

- (1) Avulsion traumatique d'une narine après morsure humaine durant une altercation, le tissu amputé contient une microvascularisation qui ne peut être anastomosée chirurgicalement.  
(2) Le tissu nasal amputé est greffé, une congestion vasculaire apparaît aussitôt.  
(3) Des sangsues sont immédiatement appliquées

*Source : Peter Seymour, Ron Winokur, Greg Artz, Edmund Pribitkin: Successful Non-Microvascular Nasal Tip Replantation After Traumatic Avulsion. The Internet Journal of Plastic Surgery. 2006. Volume 2 Number*

Après 4 à 5 jours de saignements minimes dus à l'application de sangsues, une néo-vascularisation apparaît et remplace les vaisseaux lésés. Le traitement dure trois à sept jours jusqu'à l'apparition de nouveaux vaisseaux et le rétablissement d'une circulation fonctionnelle, donc d'une peau rose. La simple fonction d'anticoagulant n'est pas la seule responsable de ce résultat. Des essais d'injection d'héparine dans des micro-perforations intentionnelles se sont révélés inefficaces. Un tel résultat est dû à l'action combinée des constituants salivaires de la sangsue. On sait que grâce à la collagénase et la hyaluronidase salivaire, il y a lyse des tissus et instauration d'une circulation capillaire, maintenue par injection d'anticoagulants, d'agents anti-agrégants et de substances vasodilatatrices.

**Photo 3 Sangsue thérapie : un cas d'avulsion auriculaire**



(1) Lacération avulsive complète de 10 cm s'étendant de la partie inférieure à postérieure : du méat auditif à l'hélix, avec une rétraction postérieure de l'oreille de son lit



(2) Congestion veineuse, tissus oedémateux et sombres



(3) Sangsues administrées deux fois par jour sur la zone lésée



(4) Apparence de l'oreille après traitement par les sangsues



(5) 4 semaines après l'opération, le patient n'a pas de déficience sensorielle et l'oreille montre une revascularisation complète

Source : Hullett, Spinnato, and Ziccardi. *Adjunctive Leech Therapy to Treat Ear Laceration*. *J Oral Maxillofac Surg* 2007.

#### A.4.2 Sangsues et phlébite et varice

Les varices compliquées d'œdème et d'**ulcères** posent un véritable problème quant à leur traitement. Des chercheurs indiens ont mené une étude qui évalue l'efficacité des sangsues médicinales pour aider à la décongestion veineuse, à la résorption des œdèmes, à la disparition de l'hyperpigmentation et à la guérison des ulcères variqueux [15]. Vingt patients souffrant de varices se sont vu appliquer des sangsues sur la zone où se situe l'ulcère variqueux. Tous les ulcères ont été guéris, 95% des patients montraient une réduction de l'aire de l'œdème et 75% des patients une diminution de l'hyperpigmentation. De plus, la comparaison de la pO<sub>2</sub> du sang prélevé par la sangsue et celui du sang veineux des patients montre que la sangsue prélève préférentiellement du sang veineux et aide donc ainsi à la guérison des ulcères.

#### A.4.3 Sangsues et congestion localisée avec semi amputation [300]

Lors d'une **avulsion** digitée due au port d'une bague, l'extrémité du doigt se met à gonfler, bleuir puis noircir (Photo 4). Le principe est identique à celui du mauvais retour veineux pour les greffes. L'application régulière d'une sangsue toutes les 4 à 6 heures pendant 8 jours rétablit la circulation sanguine, ce qui permet d'envisager une greffe de peau après 3 semaines (pas systématiquement nécessaire).

Photo 4. **Utilisation de sangsue lors d'un cas d'avulsion digitée due à une bague**



(A) Patient vu 3 jours après le début des symptômes, noter la cyanose marquée, une insuffisance veineuse évidente.

(B) Doigte traumatisé après 4 jours d'application de sangsues.

(C) Vue dorsale à 17 mois de suivi, la flèche montre le site de traumatisme.

(D) Vue palmaire à 17 mois de suivi, la flèche montre le site de traumatisme. Noter l'excellente cicatrisation par seconde intention (la déviation radiale légère du doigt traumatisé est une déformation antérieure au traumatisme, présente également sur le majeur)

Source : Tuncali D, Terzioglu A, Cigsar B, Aslan G. The value of medical leeches in the treatment of class IIC ring avulsion injuries: Report of 2 cases. *J Hand Surg [Am]* 2004;29:943-946

#### A.4.4 Hématome/congestion veineuse [162]

L'utilisation de sangsues permet une réduction accélérée et plus efficace d'un **hématome**. Le sang est drainé par la morsure après action de la salive. En effet, l'hirudine a un effet antithrombotique et la hyaluronidase, enzyme mucolytique, favorise sa diffusion. Les sangsues sont efficaces pour prévenir l'extension des hématomes dans des régions critiques [183].

Les sangsues ont été utilisées avec succès dans le traitement d'un patient souffrant d'une compression du nerf due à un hématome de l'avant-bras. 13 sangsues ont été placées et ont prélevé environ 145 ml de sang [115]. Des résultats positifs sont ressentis au bout de 24 heures et les symptômes avaient pratiquement disparu le lendemain, aucun autre traitement (en particulier chirurgical) n'a été nécessaire. Un autre exemple est rapporté pour un hématome sublingual [162] (Photo 5) ou encore pour un hématome du scrotum [96].

**Photo 5 Utilisation de sangsue pour résorber un hématome : cas d'un hématome sublingual**



(1) Hématome sublingual à l'admission



(2) Application de sangsue



(3) Hématome sublingual après 48h de sangsue-thérapie



(4) hématome sublingual après une semaine de sangsue-thérapie

*Source : Lee N.J., Peckitt N.S. Treatment of a Sublingual Hematoma With Medicinal Leeches: Report of Case. J Oral Maxillofac Surg 1996;54(1):101-103*

#### A.4.5 Sangsues et douleur chronique

Quelques études ont été menées sur l'utilisation de sangsues pour diminuer la douleur dans les **ostéoarthrites** du genou [186] et du poignet [188]. Pour le traitement, des sangsues sont disposées en zone périarticulaire et plus particulièrement sur les endroits les plus douloureux à la palpation. La sangsue thérapie, comparée à un traitement classique aurait des effets antalgiques plus puissants et plus persistants. Les auteurs ont suggéré que les effets obtenus étaient dus à l'activation nociceptive de contre irritation, aux anticoagulants, aux anti-inflammatoires et à la hyaluronidase de la salive. Il est difficile d'évaluer l'effet placebo dans ce traitement inhabituel et le nombre de personnes traitées reste faible. Par exemple, l'étude de Michalsen *et al.* [186] a été menée sur 16 patients souffrants d'**arthrose** du genou : 10 reçurent 4 sangsues pendant 80 min sur le genou, 6 autres eurent un traitement conventionnel. Les patients traités par les sangsues ont eu une diminution de la douleur en moins de 24h et 4 semaines plus tard, l'effet positif du traitement se faisait encore ressentir.

Des études de plus grande envergure sont nécessaires pour en évaluer l'efficacité.

#### A.4.6 L'application de sangsues en pratique [19,76]

Dans l'esprit des gens, la sangsue reste un être nuisible. Il peut être repoussant et effrayant de se voir appliquer ce ver gluant à même la peau pour en subir la morsure. Le protocole doit être clairement expliqué au patient. Il doit être rassuré sur l'absence de douleur.

Le déroulement de la séance est répété avec lui en lui rappelant que l'objectif est de laisser le sang couler (ce qui n'est pas simple à faire accepter).

Une fois l'indication vérifiée et le nombre de sangsues déterminé, l'infirmière se charge de la pose des sangsues.

**Photo 6 Application de sangsue**



Source : Ricarimpex. Les applications médicales. Site de Ricarimpex - élevage de sangsues [en ligne] <http://www.sangsue-medicinale.com/default.php> (page consultée le 28juillet 2009)

La zone d'application est désinfectée avec un **antiseptique** puis rincée soigneusement au sérum physiologique, les sangsues étant très sensibles aux odeurs. Un trou de 1 centimètre est réalisé avec des ciseaux dans une compresse humidifiée qui servira de « guide à sangsue ». Manipulée avec des gants, elle est sortie de son bac et appliquée sur la peau à l'aide d'une pince **inerte** ou d'un guide (Photo 6). La tête est présentée au niveau de l'orifice de la compresse, si l'animal ne veut pas mordre, une petite piqûre faisant sourdre une goutte de sang est pratiquée. L'attachement est en général rapide. Dès que les sangsues sont gorgées de sang, elles tombent spontanément. Il faut éviter de les arracher sous peine d'occasionner de petits **phlegmons**. La sangsue reste attachée en moyenne 30 à 60 minutes. Si le repas est beaucoup plus court, c'est signe d'insuffisance artérielle, il ne faut donc pas insister et proposer une chirurgie artérielle.

Des compresses sont placées tout autour de la plaie pour contenir le saignement, il faut ensuite retirer régulièrement les caillots sanguins qui se forment toutes les 20 minutes pendant

les premières heures. Il faut également estimer la réponse du tissu au traitement et vérifier qu'une infection locale ne se développe pas.

Les sangsues sont appliquées 1 à 2 fois par jour jusqu'au rétablissement de la circulation capillaire à travers la lésion par **angiogénèse** soit 4 à 5 jours environ.

Les sangsues utilisées sont détruites afin de ne pas être réutilisées sur un second patient et de risquer une contamination (VIH...).

Jamais exposées directement aux rayons du soleil, elles sont conservées dans des récipients fermés, percés de petits trous. Elles baignent dans de l'eau distillée ayant une osmolarité adaptée, la température optimale se situe entre 5-7°C et ne doit pas dépasser 15°C. Les salles dédiées à la sangsue thérapie ne doivent donc pas être surchauffées.

### **.A.5. Contre indications effets indésirables [19,232]**

L'utilisation des sangsues est contre-indiquée chez les patients sous anticoagulants, anti-agrégants plaquettaires, présentant une anémie sévère ou un problème hémorragique. Le sang étant rendu incoagulable, des hémorragies peuvent survenir en particulier chez les patients atteints de troubles hépatiques.

Lors d'insuffisance artérielle, le risque de surinfection est accru, la sangsue thérapie est donc aussi déconseillée.

Le dommage tissulaire créé par la morsure de sangsue, associe un contact prolongé direct entre le tube digestif de la sangsue et les tissus, ce qui fait qu'une infection est possible. De plus, l'infection est favorisée par le saignement diminuant la vitesse de cicatrisation et par la plaie qui doit rester découverte. La flore digestive de la sangsue peut contaminer le site, le risque d'infection est d'autant plus élevé que la zone est déjà traumatisée et peu immunocompétente.

En dépit d'une décontamination externe, une incidence assez élevée d'infection est rapportée, elle varie dans la littérature entre 2,4% et 36,2% (Tabl.2) [320].

**Tableau 2 Tableau chronologique résumant les taux d'infections publiés dans la littérature médicale suite à une thérapie par les sangsues**

Nombre de patients	Durée (années)	Taux d'infection	Auteurs	Année
30	3	20%	Mercer et al [37]	1987
42	Non rapporté	7%	Lineaweaver et al.[38]	1992
18	5	11%	De Chalain et al.[39]	1996
122	5	4,1%	Sartor et al.[40]	2002
47	2	36,2%	Bauters et al.[41]	2007

Source : Whitaker I.S., Chir M.B.B., Kanya C., Azzopardi E.A., Graf J., Kon M., Lineaweaver W.C. Preventing infective complications following leech therapy : is practice keeping place with current research? *Microsurgery*. 2009;29(8):619-25.

Plus de 99% des bactéries présentes dans le tube digestif de la sangsue ne sont pas cultivables [320], c'est avec les progrès de la microbiologie que la gamme des **symbiontes** de la sangsue ne cesse de s'élargir. La bactérie présente systématiquement dans le tractus digestif et responsable de nombreuses complications, est *Aeromonas spp*, qui est parfois résistant aux céphalosporines de première génération, pénicillines, augmentin, tétracyclines. Des études ont démontré qu'une **antibioprophylaxie** appropriée (ciprofloxacine) prévenait de toute infection liée à l'emploi de sangsue. Malgré ces recommandations, une enquête au Royaume Uni et en Irlande montre que certains hôpitaux ne respectent pas cette règle [320].

## **.A.6. Hirudiniculture et médecine**

Les deux plus grands producteurs de sangsues sont Singapour et le Sri Lanka, en raison de l'immensité de leurs marais naturels et de la main d'œuvre disponible. Cependant, les sangsues produites ne démontrent pas une sécurité d'emploi suffisante pour être utilisées en thérapeutique par les pays développés.

En 2004, les autorités de santé américaine et française ont reconnu la sangsue comme traitement médical et la sangsue thérapie est désormais remboursée à 40% par la sécurité sociale. La Food and Drug Administration des États-Unis a approuvé l'utilisation d' *Hirudo medicinalis*, à titre de dispositif médical. Quant à l'Allemagne, elle considère les sangsues comme des médicaments depuis août 2008. En France, le statut de la sangsue n'est pas encore fixé. En attendant les recommandations de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSaPS), selon la législation française, ces organismes vivants pourraient être considérés comme des matières premières d'origine biologique.

Les recherches médicales et certifications ont été effectuées avec une sangsue qui était supposée être *H. medicinalis*. Cependant une récente étude moléculaire a révélé récemment que les sangsues vendues n'étaient pas *H. medicinalis* mais *H. verbana* [268].

Les hôpitaux se fournissent actuellement auprès de laboratoires certifiés dont le géant Biopharm (Pays de Galles) et le nouveau « Leeches USA ». La France a également un laboratoire fournisseur : la société Ricarimpex en Gironde produisant plusieurs tonnes destinées pour moitié à l'exportation essentiellement vers les États Unis.

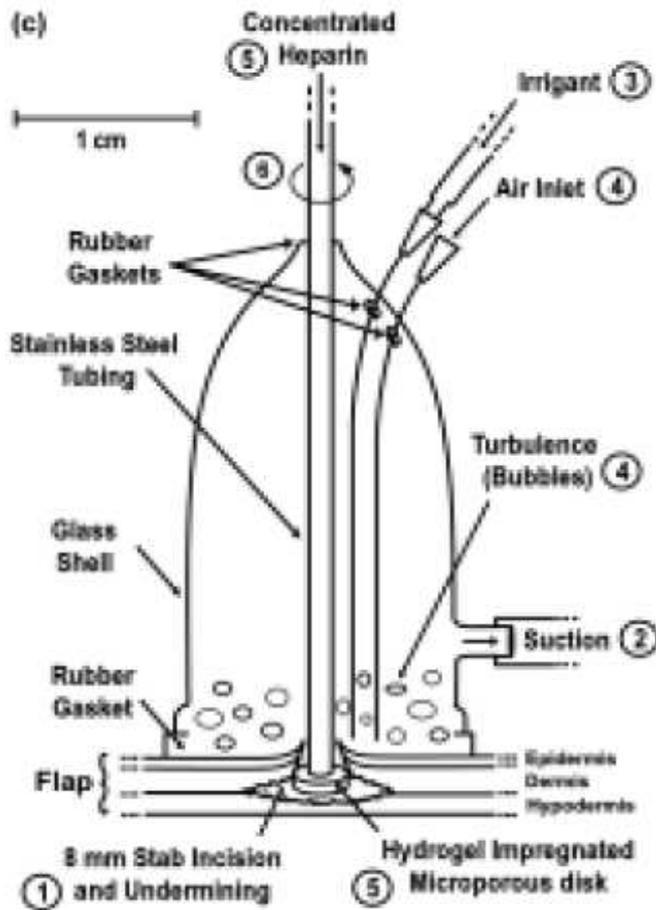
## **.A.7. Vers des sangsues mécaniques ?**

La sangsue-thérapie comporte quelques limites :

- impact psychologique ou émotionnel négatif de l'usage des sangsues
- risque infectieux
- tendance des sangsues à migrer du tissu ciblé
- coût de la méthode nécessitant l'utilisation de nombreuses sangsues pendant plusieurs jours
- coût de la surveillance continue pendant le traitement
- incapacité de la méthode à agir sur des zones étendues de tissu

Dans l'espoir de surmonter ces obstacles, des équipes ont tenté de mettre au point des dispositifs mécaniques qui pourraient remplacer les sangsues. Une équipe américaine de chirurgie [46] tente de mettre au point un prototype de sangsue mécanique (Fig.8). Parmi les quatre substituts testés, deux ont montré une capacité d'anticoagulation sous-cutanée avec une extraction de volume sanguins supérieure à la sangsue-thérapie, un volet de 6×7 cm a été ainsi décongestionné après 4 h d'obstruction veineuse complète.

Figure 8 **Prototype de sangsue mécanique**



- ① Réalisation d'une incision de 8 mm de long à travers l'épiderme et le derme, d'un diamètre de 8-10mm
- ② Succion constante contrôlée par un logiciel entre 50-70mmHg
- ③ Anticoagulation chimique par irrigation (héparine diluée à 10 U/mL dans une solution saline isotonique) déversée dans la blessure à 200 à 500mL/h par une aiguille hypodermique
- ④ Application d'une succion créant une turbulence dans la solution d'irrigation mélangée avec le sang.
- ⑤ Anticoagulation chimique par injection et perfusion :
  - 6 injections intradermiques (0.2ml chacune) d'héparine (1000 U/ml Elkins-Sims) dont 3 avant l'incision (équidistantes, à 5-8mm du centre de la future incision), 3 après le retrait du mécanisme à 15mm du site.
  - Infusion continue d'héparine (1000 U/mL Elkins-Sims) dans un hydrogel inséré en sous-cutané.
- ⑥ Anticoagulation mécanique par agitation du disque (rotation manuelle de 90° toutes les 10 à 20min)

Source : Conforti M.L., Connor N.P., Heisey D.M., R. Vanderby, Kunz D., Hartig G.K. Development of a mechanical device to replace medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) for treatment of venous congestion. *Journal of Biomedical Research*, 2003, 13(1), 1-10.

## **.A.8. Bilan**

La chirurgie reconstructrice greffe des tissus toujours plus étendus (greffe de la main) et l'usage de sangsues mécaniques pourrait aider à décongestionner des volumes importants. Toutefois, la sangsue mécanique n'a été testée que sur des porcs et il convient de faire une anesthésie locale avant de faire l'incision. Étant donné la taille de l'appareil son usage est limité à des zones étendues (inutilisable pour le doigt, les oreilles...). Le prototype nécessite quelques améliorations. Peut-être alors sera-t-il envisageable de comparer le prix de revient et l'efficacité de la sangsue-thérapie à la thérapie par sangsue mécanique ? La sangsue-thérapie a encore de beaux jours devant elle. A suivre...

## B L'asticothérapie

### .B.1. Historique

Les asticots sont utilisés depuis l'Antiquité. En effet, les plaies des soldats sur lesquelles étaient retrouvés des asticots, cicatrisaient plus vite ! Au 16<sup>ème</sup> siècle, Ambroise Paré décrit les bienfaits de cette utilisation dans «le traité des blessures par arquebuse ». Les larves de mouche verte sont aussi utilisées sous Napoléon pour éviter le développement de gangrène sur les blessures de soldat.

Dans les années 20, Baer [11] a ensuite été l'un des premiers reconnu pour utiliser les larves de mouches Calliphoridées dans le traitement des plaies ouvertes suppurées . Sur 89 patients souffrant d'**ostéomyélite** chronique il a obtenu un taux de succès de 90% alors qu'à cette époque, le taux de mortalité des fractures ouvertes du membre inférieur est de 75%. L'apparition des antibiotiques et l'amélioration des techniques chirurgicales ont suppléé à cette technique. Ce n'est que vers le fin des années 80 que l'asticothérapie a connu un regain d'attention aux États Unis, en Allemagne, Grande-Bretagne, Suède, Suisse, Israël... Devant les échecs de la médecine moderne dans le traitement de certaines plaies infectées, des essais ont été tentés en dernière alternative avant l'amputation.

### .B.2. Biologie et propriétés médicales des asticots

L'asticot est une forme immature de mouche. La mouche pond tous les 3 jours des paquets de 225 à 250 œufs qui éclosent pour donner des asticots de 1-2mm de long. Au bout de 4 jours, ils atteignent 1 centimètre. Cette prolificité rend l'élevage de mouches relativement aisé.

L'asticothérapie utilise des larves de mouches qui ont la particularité de se nourrir uniquement de tissus morts et d'exsudats sans léser les zones saines contrairement à d'autres larves de mouches. Les larves utilisées appartiennent à la famille des Calliphoridées, *Lucilia (phaenicia) sericata* est utilisée en grande majorité mais on rencontre aussi *Lucilia illustris*, *Phormia regina*. *Lucilia sericata*, mouche métallique verte, se rencontre partout dans le monde, elle est responsable de **myases** cutanées des ovins, Homme et autres mammifères. En effet, lors de surpopulation les tissus vivants sont attaqués induisant ainsi des myases, il est donc nécessaire de contrôler le nombre d'asticots, leur croissance et l'accumulation de déjections sur une plaie.

Pour expliquer l'action des asticots, différents mécanismes ont été décrits.

➔ Par simple action mécanique, leur présence entraîne une irritation conduisant à une sécrétion d'exsudat irrigant en continu la plaie (correspond à un rinçage de plaie), leur mouvement constant favorise directement la granulation. L'application d'asticots libres sur une plaie donne, en effet, un meilleur résultat que l'application de poches de gaze contenant des asticots [280].

➔ Quant aux mécanismes chimiques contribuant à la guérison de la plaie, ils sont progressivement éclaircis. L'asticot procède à une digestion extracorporelle en sécrétant des enzymes protéolytiques [251] (chymotrypsine, trypsine, métalloprotéase, aspartylprotéase) actives essentiellement sur les dépôts fibrineux nécrotiques humides. Les tissus nécrotiques sont liquéfiés puis ingérés avec les bactéries présentes. Un parage minutieux de la plaie est ainsi réalisé, plus

efficace que l'action manuelle d'un chirurgien. L'asticot stimule aussi la cicatrisation de la plaie par son excrétion/sécrétion. L'excrétion/sécrétion contient des facteurs trophiques favorisant la cicatrisation tels que l'allantoïne, le bicarbonate d'ammonium et des cytokines. Des travaux ont également mis en évidence un facteur de croissance agissant *in vitro* sur les fibroblastes [220]. L'excrétion/sécrétion inhibe la réponse pro-inflammatoire des neutrophiles sans affecter leur activité antimicrobienne [306]. Cette action enrayer le processus inflammatoire destructeur engagé lors de plaies chroniques.

➔ L'activité antibactérienne des asticots a fait l'objet de travaux avec des résultats contradictoires. Mumcuoglu *et al.* notaient que 80 % des *E. coli* étaient détruits au cours de leur passage dans le tube digestif des larves [195]. En revanche, Daeschlein *et al.* retrouvaient la persistance de souches vivantes de staphylocoques dans les déjections des larves [55]. Les travaux de Daeschlein *et al.* ont montré que les larves diminuent la charge bactérienne d'un facteur supérieur ou égal à 4, répondant plus aux caractéristiques d'un **antiseptique** que d'un **antibiotique**. Steenvoorde et Jukema ont suggéré que la répétition des applications pourrait améliorer l'action bactéricide [285].

### **.B.3. Utilisation des asticots**

L'asticot-thérapie est utilisée pour traiter des plaies chroniques [139,194,295], ulcères [266] et **escarres**. L'objectif de l'application est de nettoyer les plaies des tissus nécrotiques, réduire la contamination bactérienne et stimuler la granulation. En effet, malgré des techniques chirurgicales précises pour retirer les tissus en voie de nécrose, les blessures difficiles à soigner restent un problème majeur. Ce type de problème est rencontré chez les personnes diabétiques, paraplégiques, présentant des troubles circulatoires, des stases lymphatiques, souffrant de **thalassémie**, **polycythémies**, carcinomes... Par exemple, l'ulcère du pied diabétique frappe à lui seul 600.000 personnes dans le monde chaque année, conduisant à des milliers d'amputations. Le traitement classique de cette affection peut durer deux ans et coûter 30.000 dollars.

Le Dr Mucuoglu rapporte l'efficacité des asticots sur des plaies persistantes depuis 1 à 200 mois malgré un traitement classique. De même Sherman *et al.* obtenaient 80 % de détersion complète sous larvothérapie contre seulement 48 % sous traitement conventionnel dans une étude comparative sur 145 plaies [265]

Les larves sont utilisées sous forme libre ou contenues dans un petit sac à mailles larges, mais infranchissables du fait d'une gaze imprégnée de polyvinyle alcool. Dans la technique «libre», les larves sont déposées librement sur la plaie protégée en périphérie par un pansement **hydrocolloïde**, puis l'ensemble est recouvert de compresses légèrement humidifiées et d'une bande à mailles larges peu serrée. Dans l'autre technique, des sachets sont déposés sur la plaie en veillant à la protection des berges (**hydrocolloïde** ou pâte à l'eau); ils sont ensuite recouverts de compresses légèrement humidifiées et d'une bande à mailles larges peu serrée. Des sensations de chatouillement sont rapportées dans la majorité des cas, 20 à 34% des patients ont une majoration de la douleur [281], aisément contrôlée par des antalgiques. L'acceptabilité du traitement est très bonne de la part des soignants comme des patients. A la fin du traitement, les larves sont noyées dans l'alcool et traitées comme des déchets à incinérer.

#### **.B.4. Quelques exemples d'asticothérapie :**

● **Amputation transmétatarsienne suite à une gangrène du pied** après traitement de fractures métatarsiennes multiples sur un homme de 43 ans [133]:

- Le moignon cicatrise très mal, des irrigations biquotidiennes et des **parages** de tissus nécrotiques bihebdomadaires sont nécessaires pendant 4 semaines (Photo 7, vues 1 et 2).

- La douleur importante et le caractère fastidieux et chronophage de ces soins « classiques » conduisent à l'utilisation d'asticots : 500 asticots sont appliqués et laissés 48h (Photo 7, vues 3 et 4) au bout desquelles le tissu fibrotique est réduit et un tissu de granulation sain est découvert (Photo 7, vue 5).

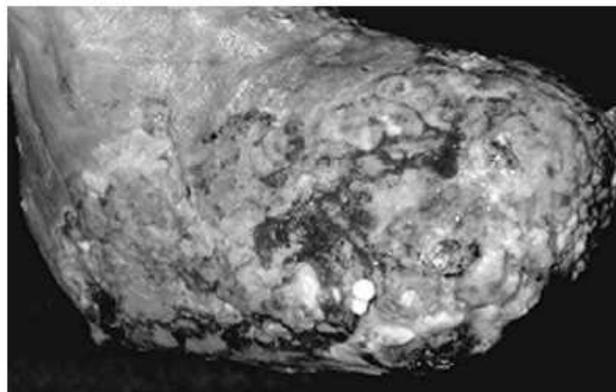
- L'application est renouvelée avec de nouveaux asticots pour 72h, parachevant le parage (Photo 8, vue 6).

- Le changement de pansement biquotidien et continué avec des irrigations, la peau repousse d'un cm par semaine et la plaie est entièrement cicatrisée 6 semaines après les applications d'asticots. (Photo 8 vue 7)

**Photo 7 Asticothérapie pour une gangrène d'une amputation transmétatarsienne  
I. Mise en place de la thérapie**



(1) Vue dorsolatérale du pied : début de gangrène  
Peau nécrosée et ischémique, traitement mis en place : changement quotidien du pansement et débridement hebdomadaire pendant 4 semaines



(2) Vue dorsolatérale du pied après 4 semaines :  
fibrose excessive, escarres empêchant une cicatrisation par seconde intention



(3) Mise en place de l'asticothérapie : 500  
asticots



(4) Asticots maintenus par un pansement  
hydrocolloïde semi imperméable pendant 48h



(5) Plaie 48h après l'application initiale des asticots : les asticots ont multiplié leur  
taille par 5, la plaie montre des saignements de bonne augure. Seconde application  
d'asticots pendant 72h

**Photo 8 Asticothérapie pour une gangrène d'une amputation transmétatarsienne II. Après asticothérapie**



Vue médiale du pied



Vue dorsolatérale du pied



Vue plantaire du pied

(6) A,B,C : Vues du pied après 2 applications d'asticots : les marges de plaie continuent à se fermer par seconde intention. Désormais, le traitement consistera en des soins de plaies traditionnels (pansements humides puis pansements secs)



(7) Fermeture totale de la plaie 6 semaines après l'initiation de l'asticothérapie : présence d'une escarre focale distale secondaire à l'irritation due au dort de la chaussure.

© Source : Zeeshan S. Husain, Lawrence M. Fallat. Maggot Therapy for Wound Debridement in a Traumatic Foot-Degloving Injury: A Case Report *The Journal of Foot & Ankle Surgery* 42(6):371-376, 2003

● **Usage de l'asticothérapie sur des plaies avec d'importants dépôts fibrineux et/ou nécrotiques humides** : lorsque la détersion autolytique classique associée à une détersion manuelle est soit inefficace, soit trop douloureuse, l'asticothérapie est indiquée. Exemple d'une détersion d'un ulcère du pied après application d'un sachet d'asticots pendant 3 jours (Photo 9) [33].

**Photo 9 Asticothérapie pour un ulcère du pied**



Ulcère du pied avant traitement



Larves en « biobaq » après trois jours



Le même ulcère après trois jours d'application des larves

© Source : E. Cartier, P. Combemale. Utilisation des larves de *Lucilia sericata* pour la détersion des plaies chroniques *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 2008; 135(10):685-688.

### **.B.5. Perspectives**

Il paraît de plus en plus évident que le rapport coût/efficacité/tolérance de l'asticothérapie est très avantageux. Thomas a estimé que la larvothérapie permettait un gain de temps important en termes de détersion [294], à l'origine d'un gain financier considérable. En France, le prix HT d'un sachet en avril 2008 varie de 129 euros pour le plus petit (2,5×4 cm= 150 larves) à 264 euros pour le plus grand (10×10 cm = 600 larves).

Depuis juin 2005, l'AFSSaPS a pris position par rapport au statut des larves de mouche qu'elle considère dorénavant comme répondant à la définition du médicament. En attente d'une AMM, leur utilisation est sous Autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative depuis le 16 septembre 2006. Cette ATU n'est délivrée que pour une utilisation en milieu hospitalier, à la demande du médecin responsable.

## C Utilisation de l'abeille vivante

L'apithérapie rassemble une gamme variée d'utilisations médicales des produits de la ruche. Miel, propolis, gelée royale, pollen sont utilisés depuis longtemps, des Egyptiens à Hippocrate, Avicennes et aujourd'hui encore. Remède de grand-mère contre le mal de gorge ; le miel est utilisé pour ses vertus cicatrisantes dans des hôpitaux. De même, la propolis et la gelée royale sont utilisées comme fortifiant, antiseptique. A cette énumération de produits appartenant à l'apithérapie, s'ajoute le venin d'abeille. On retrouve l'utilisation du venin d'abeille dès l'Antiquité. Pour la médecine traditionnelle chinoise, le venin représente le feu, un des 5 éléments fondamentaux. Le venin correspond donc au cœur et à l'intestin grêle et facilite la circulation du sang, régule le rythme cardiaque, agit sur le système nerveux central et les fibres motrices [227].

La médecine par le venin des abeilles est l'apipuncture ou Bee Venom Therapy (BVT), elle utilise la piqûre de l'abeille ouvrière. L'**apipuncture** est pratiquée aujourd'hui dans monde entier [277] et de nombreuses organisations conduisent des recherches pour étudier les effets thérapeutiques de l'abeille vivante.

### **.C.1. Principe de la thérapie et application pratique**

#### **C.1.1 Généralités sur la piqûre d'abeille**

Le venin d'abeille, dans certains cas peut avoir des effets toxiques sur l'Homme. Il y a danger de mort à partir de 150 piqûres au m<sup>2</sup>, ce qui équivaut à un seuil de 250 piqûres pour un adulte moyen (1,8 m<sup>2</sup> de peau). La mort survient après une hémorragie cérébrale et/ou une insuffisance rénale. Environ 0,5% à 2% de la population est allergique aux piqûres d'insectes; certains articles rapportent une fréquence de 4 à 5% [90]. Cette différence de prévalence s'explique par une définition de l'**hypersensibilité** différente selon les études.

La piqûre de l'abeille est toujours douloureuse. L'organisme de la plupart des individus s'habitue assez rapidement aux piqûres et y réagit très faiblement ou même pas du tout. Toutefois, même les personnes immunisées ressentent immédiatement, lors de la piqûre, une douleur assez forte qui reste raisonnable pendant quelques instants, s'amplifie puis décroît. Une substance (le peptide MCD) attaque les cellules de l'**épiderme** et les **mastocytes**, provoquant la libération de plusieurs substances dont l'**histamine**. C'est une question de quelques dizaines de secondes. Une petite **papule** apparaît, rougit, grossit, s'étend, durcit, brûle et est douloureuse, un œdème s'installe. L'infiltration de venin avec toutes ses conséquences atteint son apogée le lendemain de la piqûre, diminue et s'estompe, en règle générale, le surlendemain ou les jours qui suivent. Des réactions locales plus intenses peuvent être observées avec un gonflement important [25].

Généralement, on développe une certaine résistance aux piqûres d'abeilles, mais on connaît des cas de réactions systématiques et même anaphylactiques chez des personnes pourtant habituées depuis longtemps aux effets du venin. Les symptômes se manifestent dans les courts instants suivant la piqûre (30 minutes). La respiration devient difficile, des vomissements peuvent survenir, la tension artérielle peut baisser fortement, entraînant des pertes de conscience et parfois la mort par collapsus respiratoire et circulatoire (état pathologique caractérisé par un malaise soudain, intense avec ou sans perte de connaissance, une baisse de la tension, une accélération du pouls, des sueurs froides). Environ 50 décès par an aux États-Unis, 25 à 30 en France, sont dénombrés suite à des piqûres d'abeille [25].

### C.1.2 Pratique de l'apipuncture

L'apipuncture utilise l'abeille vivante comme seringue à injection d'une solution active. Le prélèvement des abeilles dans la ruche doit être fait précautionneusement en veillant à ne pas nuire à la viabilité future de l'essaim [66]. Les abeilles sont récoltées dans un bocal ventilé contenant du miel pour les attirer (Photo 10).

**Photo 10 Pot à  
prélèvement  
d'abeilles**



© Source : Bernard  
NICOLLET. *Abeille et nature.*  
<http://www.abeille-et-nature.com/boutique1.php?dev=EUR>

**Photo 11 Application de l'abeille sur la peau**



© Wang Zhuo, publié dans le reportage *Un hôpital de médecine chinoise piqué au vif* sur le site [run web.com](http://runweb.com)

L'idéal est de prélever les abeilles juste avant la séance de piqûres, mais cela n'étant pas toujours possible, le prélèvement peut tout à fait s'effectuer des heures avant ou même la veille. Une abeille est prélevée à l'aide d'une pince et appliquée sur la zone cutanée déterminée (Photo 11).

Pour prévenir de la douleur de la piqûre, un matériau froid peut être appliqué au préalable pendant dix secondes. Si la personne se révèle trop sensible, le dard peut être retiré pour effectuer des micro piqûres de quelques secondes, moins douloureuses, un seul dard pouvant servir vingt fois d'affilée.

Avant chaque début de séance, même s'il ne s'agit pas de la première, une micro-dose est utilisée sur le poignet ou le genou pour s'assurer de l'absence de risque allergique [276]. Pour cela,

l'abeille est retirée après une fraction de seconde en ayant pris soin d'intercaler entre la peau et l'insecte une grille ou toile étamine qui évitera que le dard reste planté dans la peau. Certains désinfectent la peau avec de l'alcool ou une solution iodée, ce qui n'est pas nécessaire puisque le désinfectant est rapidement détruit par le venin. Il suffit simplement de laver la zone avec de l'eau tiède puis de sécher.

De la vitamine C est prescrite pendant la cure, pour aider l'épithélium cutané à retrouver son intégrité. On ne peut pas repiquer un endroit encore gonflé et rouge..

Certains préfèrent utiliser un extrait préparé de venin d'abeille comme Apitox<sup>®</sup>, sous forme de capsules prêtes à l'emploi, ou d'aiguilles d'acupuncture avec réservoir, plutôt que l'abeille elle-même. Le venin préparé est obtenu en électrocutant les abeilles. Agressées, elles piquent à travers une membrane très fine en caoutchouc. On recueille le venin derrière cette membrane puis on le lyophilise. On en obtient ainsi de grandes quantités. Les partisans de l'apithérapie par l'abeille vivante soutiennent que la sécrétion la plus efficace (la plus pure) ne peut être obtenue qu'en laissant l'abeille piquer.

Les piqûres sont douloureuses, certaines personnes les supportent plus que d'autres, il faut être détendu et calme. L'administration de venin par des aiguilles d'acupuncture est moins douloureuse et l'ont peut même y associer de la lidocaïne (anesthésiant, Xylocaïne<sup>®</sup>) pour désensibiliser la zone piquée.

### ***Contre-indications***

Le venin d'abeille ne doit pas être utilisé sur des personnes ayant un diabète insulino-dépendant, la **syphilis**, **gonorrhée**, tuberculose, une allergie sévère, une insuffisance rénale, une maladie cardiovasculaire grave ou à un stade avancé.

De même, certains traitements ont une influence directe sur la libération d'histamine et l'application de venin est fortement déconseillée : salicylés, morphiniques, codéine, protamine, amphétamines, macromolécules (dextran), produits de contraste iodés, certains anesthésiques généraux (D tubocurarine, halothane), certains antibiotiques (polymyxine B, colimycine, néomycine), anti-hypertenseurs (réserpine, hydralazine), thiamine, quinine, scopolamine, pilocarpine, chymotrypsine, ACTH, bêtabloquants (utilisés notamment contre l'hypertension artérielle).

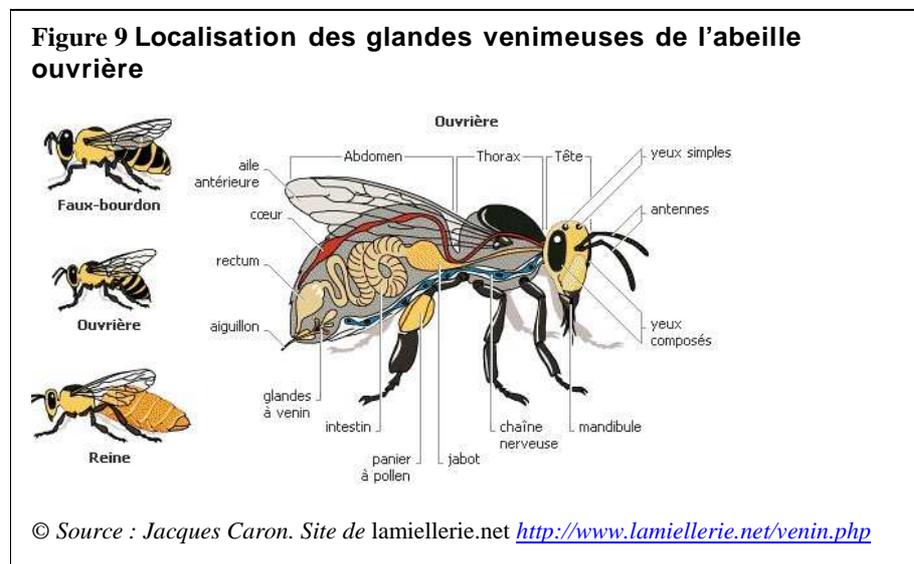
Il est important d'éviter les piqûres au niveau des yeux, des tempes, des sourcils, car l'inflammation provoquée peut conduire à une **névrite** du nerf optique.

L'auto-traitement est parfois pratiqué avec l'assistance d'un proche dont la tolérance au venin est testée. Il faut s'assurer de l'intervention rapide d'un médecin en cas de réaction anormale et avoir à portée de main une seringue d'adrénaline (délivrée sur ordonnance). Aucun décès imputable à cette pratique n'est rapporté à ce jour. Des malades possèdent ainsi leur propre ruche.

L'apipuncture est pratiquée couramment aux États-Unis et en Chine, en France elle n'est pas reconnue et peu encadrée même si des associations sont créées la créat(à travers les associations d'apithérapie).

### C.1.3 Composition du venin d'abeille [8,90,42,274]

Sécrété par les glandes venimeuses de l'abeille ouvrière (Fig.9), le venin est un mélange d'enzymes et de peptides utilisé comme moyen de protection face à l'agresseur.



La composition du venin d'abeilles n'est pas constante. Elle évolue selon les saisons et l'alimentation de l'abeille. Cette composition évolue avec l'âge de l'abeille. Il existe aussi de petites différences entre les individus et les espèces. Pratiquement inexistante avant le troisième jour, la production va augmenter jusqu'au 13<sup>ème</sup> jour et rester constante jusqu'à la mort de l'abeille. On enregistre un pic entre le 16<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour au moment où l'abeille prend le rôle de gardienne. La production de venin cesse en cas de carence en pollen et diminue au fil de l'été.

Ce venin est incolore, de pH 5-6, à l'odeur forte caractéristique, il se compose de :

✚ 85% d'eau

✚ 2-3% de composants volatils (c'est cette fraction qui pousse certains thérapeutes à préférer l'usage de l'abeille vivante, car le venin reconstitué ne contient plus les huiles volatiles)

✚ Dans les 12% restants on retrouve du plus petit pourcentage au plus grand, avec leurs principales propriétés:

→ Des amines : l'histamine impliquée dans les réactions allergiques, la dopamine neurotransmetteur ayant une action vasomotrice, norépinéphrine.

→ Des enzymes : essentiellement la phospholipase A (donnant le lysolécithine par scission), une hyaluronidase.

→ Des composés non aminés tels que les sucres, les phospholipides, l'acide vanilmandélique.

→ Des peptides dont :

- La mélittine : principale toxine du venin, est un antioxydant puissant. Toxique majeur des membranes cellulaires, hémolyse, elle inhibe la phospholipase A2. Ses propriétés anticancéreuses font l'objet de nombreuses recherches [274] et d'essais sur des modèles de cancers animaux.

Orsolich *et al.* ont rapporté une réduction significative du nombre de métastases pulmonaires chez des souris, suite à l'administration de venin d'abeille par intraveineuse [205].

- La tertiapine : inhibe la calmoduline et modifie donc les échanges ioniques sodiques au sein des cellules.

- L'apamine : neurotoxique, inhibiteur des canaux  $Ca^{2+}/K^{+}$ , inhibe la relaxation induite par le NO dans l'activité contractile du myomètre.

- Le « MCD peptide »: induit la production d'histamine pour de faibles concentrations et inhibe la dégranulation des mastocytes pour de fortes concentrations.

- L'adolapine : effet analgésique, anti-inflammatoire, inhibiteur COX, neurotransmetteur

- Un cardiopeptide : antiarythmique.

## **.C.2. Abeille et affections rhumatismales**

### **C.2.1 Aperçu des affections rhumatismales traitées par les abeilles**

L'**arthrite rhumatoïde** (AR) est une affection grave avec une prévalence de 0,5% [274] chez l'adulte. Elle cause des douleurs articulaires, une invalidité sévère et peut prédisposer un individu à une mort précoce. L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire auto-immune dont le mécanisme initial est inconnu même si a été déterminée une cascade de réactions immunologique et inflammatoire. Ces réactions produisent une inflammation de la **synovie**, suivie rapidement d'une destruction articulaire et osseuse irréversible.

L'**ostéoarthrite** est également une des formes la plus connue d'arthrite, elle est appelée aussi arthrite dégénérative ou arthrose et concerne les personnes d'âge moyen ou âgées. Elle touche les articulations supportant le plus de poids, comme le genou, engendrant des modifications locales du cartilage, une hypertrophie de l'os sous-chondral, une prolifération osseuse, une déformation des articulations, une inflammation.

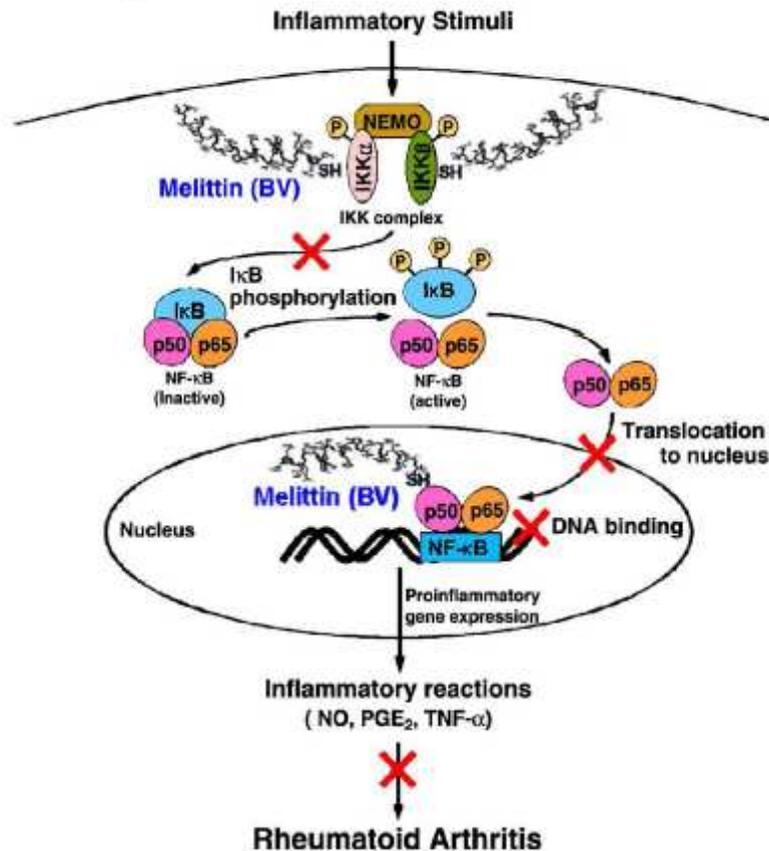
Le traitement classique emploie des méthodes conservatives avec médication (anti-inflammatoires) et thérapie physique, le traitement chirurgical est parfois envisagé (**arthroscopie** et **débridement**, prothèse). Ces traitements ne sont évidemment pas dénués d'effets secondaires et la Bee Venom Therapy (BVT) est présentée comme une méthode alternative par ses praticiens.

### **C.2.2 BVT et rhumatismes**

Les effets anti-arthritiques [274] de la BVT ont été démontrés sur divers modèles animaux (arthrite provoquée par injection d'un adjuvant, carraghénate, lipopolysaccharide). C'est en 1979 que Chang et Bliven rapportent les premiers que l'administration sous-cutanée de venin d'abeille supprime le développement de l'œdème de la patte, induit par le carraghénate chez le rat. D'autres études sur le rat ont montré les mêmes effets.

L'adolapine, isolée du venin d'abeille en 1982, démontre des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires efficaces sur les modèles animaux d'arthrite. Puis les propriétés antioxydantes (inhibant la production d' $O_2$ ) de la mélittine sont découvertes. Les chercheurs veulent découvrir les mécanismes d'action du venin d'abeille sur l'**arthrite**. On découvre que le venin a de multiples effets inhibiteurs sur l'expression et l'activité de la COX2, sur les médiateurs inflammatoires comme PGE2, NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Fig.10).

Figure 10 Proposition sur l'effet anti-arthritique de la mélistine



L'activité du NF-κB est induite par de nombreux stimuli anti-inflammatoires. Le complexe IKK, composé des kinases IKKα et IKKβ et de la sous-unité régulatrice NEMO (ou IKKγ), est un point de convergence pour les 3 voies de signalisation. Les complexes IKK phosphorylent le IκBα, ce qui conduit à leur dégradation et permet aux dimères de NF-κB d'entrer dans le noyau, où ils se fixent aux sites de liaison apparentés de l'ADN et activent l'expression de gènes pro inflammatoires. On envisage que la mélistine inhibe la sortie du IκB à travers l'inhibition des IKKs. Cette inhibition pourrait être due à l'interaction entre la mélistine et le groupe SH des IKKα et IKKβ, ce qui inactive le NF-κB et réduit donc la production de médiateurs inflammatoires. La mélistine peut aussi agir directement avec le p50 du NF-κB et ainsi inhiber la translocation du p50 dans le noyau.

P, phosphore; Ub, ubiquitine; NF-κB, nuclear factor-κB; IκB, inhibitor of NF-κB; IKK, IκB kinase; NEMO, NF-κB essential modulator

© D'après D.J. Son et al. / *Pharmacology & Therapeutics* 115 (2007) 246-270

Dans l'arthrite rhumatoïde, les **fibroblastes** de la synovie changent de phénotype et prolifèrent de façon anarchique avec une perte de la capacité d'apoptose. Ils détruisent le cartilage adjacent et l'os. Sur une culture de ces cellules issues de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, le venin d'abeille a induit une apoptose [120], ce qui laisse présager un effet bénéfique sur l'arthrite rhumatoïde.

Dans la BVT, la méthode d'injection est souvent associée à la Bee Venom Acupuncture. On utilise l'abeille vivante ou des aiguilles d'acupuncture avec un réservoir contenant du venin d'abeille, sur des points d'acupuncture précis. Cette pratique est très courante en Corée qui effectue de nombreuses études sur l'acupuncture et le venin d'abeille. Ces chercheurs suggèrent que les effets de la BVA dépendent de la localisation des injections, les injections au niveau des points

d'acupuncture ont des effets plus forts que des injections au hasard chez le rat (dans le dos) [147,274,327]. Il s'avère que la plupart du temps, les points d'acupuncture utilisés sont des points proches de la lésion.

Malgré la pratique courante de cette technique sur l'Homme, peu d'essais cliniques sont recensés. Les essais cliniques de la BVA sur l'arthrite rhumatoïde (Tabl. 3) souffrent d'un protocole peu rigoureux (pas toujours de groupe témoin, pas de dosage de la concentration du venin...) avec des échantillons de petite taille. Les essais concluent tous les trois à une diminution marquée des symptômes.

**Tableau 3 Les effets de l'apupuncture (BVA) sur l'arthrite rhumatoïde**

Auteur (année)	Construction de l'étude	Groupes et interventions	Mesures et résultats
Lee SH, Hong SJ <i>et al.</i> (2003)	Essai randomisé contrôlé (deux groupes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients avec une arthrite rhumatoïde (<math>n = 80</math>): groupe BVA (<math>n = 40</math>) et groupe contrôle (<math>n = 40</math>).</li> <li>• Traitement: 2 fois par semaine pendant 2 mois, BVA sur les articulations phalangiennes proximales et distales, au niveau des points d'acupuncture: SI5, LI5, PC7, TE4, LI11, TE10, HT3, SI8 ST36, GB34, SP9, EX-LE2, EX-LE4, GB40, BL62, SP5 et KI6, selon les zones atteintes des patients</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluation de la sensibilité articulaire : BVA &lt; contrôle (<math>P &lt; 0.05</math>)</li> <li>• Evaluation de gonflement articulaire: BVA &lt; contrôle (<math>P &lt; 0.05</math>)</li> <li>• Ankylose matinale: BVA &lt; control (<math>P &lt; 0.05</math>)</li> <li>• Paramètres de laboratoire: • ESR: BVA &lt; contrôle (<math>P &lt; 0.05</math>); • CRP: BVA &lt; contrôle (<math>P &lt; 0.05</math>);</li> </ul>
Lee SH, Lee HJ <i>et al.</i> (2003)	Essai incontrôlé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients avec une arthrite rhumatoïde. (<math>n = 22</math>)</li> <li>• Traitement: 2 fois par semaine pendant 3 mois, BVA sur les articulations phalangiennes proximales et distales, au niveau des points d'acupuncture SI5, LI5, PC7, TE4, LI11, TE10, HT3, SI8, ST36, GB34, SP9, EX-LE2, EX-LE4, GB40, BL62, SP5 and KI6, selon les zones atteintes des patients</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluation de la sensibilité articulaire : avant &gt; après (<math>P &lt; 0.01</math>)</li> <li>• Evaluation du gonflement articulaire: avant &gt; après (<math>P &lt; 0.01</math>)</li> <li>• Effet analgésique évalué avec une échelle visuelle : avant &gt; après (<math>P &lt; 0.001</math>)</li> <li>• Ankylose matinale: avant &gt; après (<math>P &lt; 0.01</math>)</li> </ul>
Kwon KR <i>et al.</i> (1998)	Essai incontrôlé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients avec une arthrite rhumatoïde (<math>n = 10</math>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 90% d'amélioration clinique des symptômes. Amélioration remarquable, 2 cas ; bonne amélioration, 5 cas, amélioration efficace, 2 cas.</li> </ul>

ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein

Source : Jae-Dong Lee, Hi-Joon Park, Younbyoung Chae, Sabina Lim. *An Overview of Bee Venom Acupuncture in the Treatment of Arthritis. eCAM 2005;2(1)79-84*

Quant à l'**ostéoarthrose**, elle a fait l'objet de deux essais cliniques sur la BVA par la même équipe, un essai cas/témoin et un essai sans groupe de contrôle ( [156,312] d'après [274]). Les conclusions sont les mêmes que pour l'arthrite rhumatoïde, les symptômes cliniques sont diminués. Un essai clinique de phase II sur la BVT dans la douleur et l'inflammation des ostéoarthroses en cours aux États-Unis [301]

Il faut rester prudent sur l'utilisation de la BVT pour soulager les douleurs et l'encadrement médical est important. En effet, Un cas de **lupus érythémateux disséminé** (LED), débutant après un traitement par la BVA, est rapporté par une équipe d'une l'université de médecine interne de Corée [230]. La patiente souffrant de douleurs diffuses depuis 6 mois avait essayé la BVA pour ses douleurs au genou après avoir refusé tout examen complémentaire pour investiguer une possible maladie auto-immune. Elle se présente à l'hôpital 10 jours après pour fièvre et **dysurie** et présente un angioœdème. Un LED est diagnostiqué, l'hypothèse que la BVA ait déclenché la flambée de la maladie, est avancée.

## **.C.3. Abeilles et sclérose en plaque**

### **C.3.1 La sclérose en plaque en quelques mots**

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie auto-immune associée à une démyélinisation inflammatoire chronique du système nerveux central. La cause de la SEP n'est pas connue à ce jour, une origine infectieuse a longtemps été débattue, on incrimine un facteur environnemental, une susceptibilité génétique. Le mécanisme déclencheur reste mystérieux. L'inflammation cause la démyélinisation de certaines régions (la myéline est la gaine isolante autour des fibres nerveuses) ce qui crée une plaque, région où la conduction normale est ralentie ou bloquée. La localisation de la plaque détermine les déficits neurologiques qui en résultent. La plupart des nouvelles lésions se résorberont spontanément, soit partiellement, soit complètement. Ni le patient ni le médecin, ne peuvent prédire le déroulement d'une sclérose en plaque chez un individu. On estime qu'il existe deux millions de personnes atteintes dans le monde dont 50000 en France, 70% des cas sont des femmes. L'âge de début varie entre 20 et 40 ans [50]. En dépit de recherches étendues, aucun traitement spécifique efficace n'a encore été trouvé.

Le traitement symptomatique est donc primordial dans la prise en charge de la maladie. Il a pour but de traiter les complications urinaires, la **spasticité**, les douleurs, la fatigue, ou la dépression.

Les épisodes de poussées inflammatoires relèvent d'un traitement symptomatique, avec la plupart du temps la nécessité d'une hospitalisation de courte durée, pour de débiter une corticothérapie intraveineuse à forte dose.

Les traitements de fond visent à réduire le processus inflammatoire et démyélinisant : l'interféron bêta est actif sur le nombre de poussées (il réduit le nombre de poussées d'environ 37%) et les lésions IRM. Par contre, son efficacité sur la survenue et la gravité du handicap à long terme est moins probant [50].

Les médicaments utilisés actuellement ont des effets modestes sur la progression de la maladie, c'est pourquoi les malades se tournent souvent vers au moins une médecine alternative (50-75% des personnes atteintes de SEP [132,196]).

### **C.3.2 La thérapie par le venin d'abeille (BVT) et la sclérose en plaque**

Voici comment se déroule la thérapie par le venin d'abeille pour la sclérose en plaque, proposée par le Dr Domerego (D'après [38] et après avoir respecté les modalités décrites au paragraphe sur la pratique de l'apipuncture)

Le traitement s'applique sur les zones «yang» du corps : dos, face postéro-latérale des membres, fesses, dessus des épaules, dos des mains, des pieds. Les autres zones peuvent favoriser les réactions adverses/allergiques.

Il faut commencer par une seule piqûre au niveau des lombes à côté de la colonne vertébrale. Augmenter très progressivement le nombre de piqûres. La première séance débute souvent par seulement deux piqûres. Les piqûres sont faites de chaque côté de la colonne vertébrale au niveau des lombes puis en remontant le long du tronc jusqu'au cou. Ensuite on continuera sur les fesses, le

bassin, les épaules. Des points locaux peuvent être piqués en fonction de la localisation des symptômes.

Le nombre de piqûres ira de 1 à environ 20 piqûres ou plus, deux à trois fois par semaine pendant plusieurs mois (Tabl.4).

**Tableau 4 Exemple d'un protocole de piqûres chez un patient atteint de SEP**

1ère séance	Cuisses + jambes (face avant) + tête
2ème séance	Colonne 20 piqûres + tête
3ème séance	4 piqûres par bras (face avant) + 3 pubis + 3 ventre + tête
4ème séance	Cuisses + jambes (face externe) + tête
5ème séance	Colonne + tête
6ème séance	Bras (face externe) + pubis + ventre + tête
7ème séance	Cuisses + jambes (face arrière) + tête
8ème séance	Colonne + tête
.....	.....

Source : Cudo Jean-Michel. Un protocole. Site de Sclérose en plaque et apithérapie. [http://abeille-alternative.chez-alice.fr/html/un\\_protocole.html](http://abeille-alternative.chez-alice.fr/html/un_protocole.html)

A la régression des symptômes et amélioration de l'état général, le nombre de piqûres pourra être réduit et stabilisé.

Le patient est prévenu d'effets secondaires possibles apparaissant dans la deuxième ou troisième semaine de traitement sous forme d'une aggravation passagère des symptômes ou de l'apparition d'un granulome éosinophilique sur le lieu de piqûres multiples. Des «réactions de guérison» : une **gastro-entérite**, des vomissements, diarrhée, peuvent survenir transitoirement et sont très positives (d'après [38]). A la suite de cet épisode, des signes marqués d'amélioration se manifestent généralement.

Quelques études préliminaires ont été menées sur la BVT [34], suggérant de sa sûreté, cependant le nombre d'essais est insuffisant pour en conclure définitivement. Une seule étude croisée randomisée a été réalisée à ce jour par des chercheurs Néerlandais [317]. Cet essai est basé sur 24 semaines de BVT sur 26 patients avec rechute-rétablissement ou rechute secondaire progressive. Les piqûres étaient bien tolérées, il n'y a pas eu d'effets secondaires sévères. Il n'y a pas eu de réduction évaluable des lésions visibles à l'IRM. Il n'y a pas eu non plus de réduction significative du taux de rechute, ni d'amélioration du handicap, de la fatigue et de la qualité de vie.

La BVT est principalement utilisée dans des cliniques privées et les informations disponibles sur les observations et résultats sont limitées. Le manque de documents scientifiques, d'études contrôlées, rend difficile la détermination de l'efficacité de ce traitement. Les patients atteints de sclérose en plaque répondent différemment à la thérapie par piqûres d'abeilles. Certains montrent une amélioration en peu de temps, mais certains ont besoin d'une plus longue période. Dans certains cas, l'état du malade n'est pas amélioré. Actuellement, on ne connaît pas l'origine de ces différences : prise insuffisante de vitamine C, mauvaise nutrition, traitements médicamenteux, allergie, blocage mental, tout peut être évoqué...

Il faut garder à l'esprit qu'une simple administration de venin d'abeille ne suffit pas et qu'il faut suivre certaines lignes directrices qui ne sont basées que sur des observations qui semblent être effectives dans la majorité des cas.

Malgré le manque d'évidence scientifique, cette thérapie est utilisée par les gens atteints de sclérose en plaque pour stabiliser la maladie, réduire la fatigue et la spasticité. Les malades atteints de SEP doivent vivre dans l'incertitude de ce que le futur va leur apporter, tout en étant ballotté entre les rémissions et des aggravations imprévisibles. Imprévisible, susceptible de rémissions spontanées, incurable, la SEP est plus spécialement susceptible d'être la victime de traitements "miracles" et de leurs déclarations. Des études multicentriques avec un protocole plus précis sont nécessaires pour déterminer la réelle efficacité de la BVT. Actuellement, 30 à 40 personnes suivent ce traitement en France et aux États-Unis, cette solution thérapeutique est très pratiquée avec plus de 60 000 patients [6].

#### **.C.4. Abeilles et douleurs musculo-squelettiques**

Une injection de venin d'abeille peut avoir un effet nociceptif immédiat puis prolongé car il contient des substances potentiellement douloureuses : mélittine, histamine, PLA<sub>2</sub>. Le venin d'abeille est cependant utilisé pour soulager certaines douleurs, des études suggèrent que la voie d'action principale passe par son action sur les  $\alpha$ 2adrénocepteurs. Les données de la littérature concernant les conséquences de l'injection de venin d'abeille sont contradictoires [274], il n'y a pas encore d'explication d'une possible relation entre les effets nociceptifs et anti nociceptifs du venin.

Les abeilles sont donc utilisées pour soulager des douleurs musculo-squelettiques : douleur lombaire ou nucale, choc post-traumatique d'une articulation, entorse, **hernie discale**. Il est encore une fois difficile de tirer des conclusions concernant l'efficacité de la BVT envers ces pathologies. Une revue [161] sur le sujet a tenté d'en faire l'état des lieux en 2008 : il ressort que de nombreuses études proviennent de Corée du Sud, pays connu pour exposer un taux vraiment bas de résultats négatifs [307]. De plus les essais cliniques publiés présentent un échantillon total réduit ne permettant pas d'affirmer ou d'infirmer la validité de la BVT.

#### **.C.5. Bilan**

Malgré de nombreuses évidences infondées, la thérapie par le venin d'abeille est traditionnellement pratiquée pour traiter diverses maladies comme l'arthrite, les douleurs lombaires, les tumeurs et scléroses. On prête au venin d'abeille des effets anti-inflammatoires, anticancéreux, analgésiques qui sont confirmés par les propriétés de ses composants. Cependant, les mécanismes d'action exacts du composant majeur, la mélittine, restent inconnus. Les chercheurs ont attribué les effets cytotoxiques de la mélittine à l'induction de l'apoptose et/ou nécrose de certaines cellules cancéreuses et des fibroblastes synoviaux de l'arthrite rhumatoïde. De plus, Son *et al* [273] ont démontré que la mélittine induisait l'**apoptose** des cellules musculaires lisses de la média (SMCs) aortique chez le rat, laissant supposer le rôle thérapeutique de la mélittine dans l'athérosclérose. Mais cette propriété est à double tranchant et engendre l'hypothèse que la BVT pourrait mener à la formation d'un **anévrisme** aortique [91]. Il faudrait donc exclure de ce traitement les individus ayant des risques élevés de formation d'un anévrisme aortique (hypertension, hyperlipidémie, troubles des tissus conjonctifs). Cette découverte rappelle que l'utilisation de la BVT n'est pas sans risques. Les essais cliniques sur l'efficacité de cette thérapie doivent être précisés.

## D La thérapie par des helminthes

Les allergies sont de plus en plus courantes dans les pays développés et l'augmentation de cette incidence reste encore largement inexplicée [29,170]. La relation entre l'amélioration des conditions d'hygiène notamment au cours de l'enfance et les maladies allergiques et/ou auto-immunes, telles que les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ou l'asthme, fait l'objet d'une attention particulière [130]. Ainsi, une augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en voie de développement, parallèlement à leur niveau d'industrialisation [171] a été mise en évidence par des études épidémiologiques. Jusqu'à aujourd'hui, aucun traitement permettant de guérir d'allergies sévères n'a été trouvé et certaines thérapies mises en place ne sont pas dépourvues d'effets secondaires [216]. Le rôle possible d'une moindre exposition aux helminthes (vers parasites) lors d'**allergie** a été suggéré par plusieurs travaux [77].

Les helminthes sont des vers parasites infectant les humains partout dans le monde (spécialement dans les régions chaudes). Selon les espèces, la contamination se fait par contact avec de l'eau, un sol ou de la nourriture contaminés. Plus d'un tiers des humains en sont porteurs, spécialement les enfants vivant dans de mauvaises conditions sanitaires. L'homme est conduit à être exposé à d'autres helminthes à travers les pratiques agricoles ; la chasse, la proximité avec les animaux. Selon les espèces d'helminthes, le milieu de développement chez l'homme est différent : la lumière intestinale, les canaux biliaires, les poumons, le sang. Pour pouvoir se développer dans leur hôte, les helminthes doivent échapper au système immunitaire de cet hôte.

Des modèles expérimentaux d'allergie ont montré que les helminthes parasites pouvaient protéger contre la réaction allergique en induisant une certaine immunosuppression [197,254]. Ces constatations ont poussé certaines équipes à proposer des helminthes comme nouvelle piste thérapeutique afin de traiter certaines maladies allergiques.

Nous allons donc voir quelle est l'action des helminthes sur le système immunitaire et l'organisme avant d'envisager l'application clinique de l'helminthe-thérapie.

## **.D.1. Les helminthes sont-ils immunosuppresseurs ?**

### **D.1.1 Quelques bases sur les mécanismes immunitaires concernés [240]**

Après le passage des barrières physiques de l'organisme par le pathogène, une réponse immunitaire innée se déclenche. Associée à une réponse immunitaire adaptative, elle devrait éliminer l'intrus.

La réponse immunitaire innée se met en place grâce à la reconnaissance de caractéristiques moléculaires associées au pathogène. Ainsi, les **phagocytes** (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules cytotoxiques comme les natural killers NK) contrôlent l'invasion. Les cellules du système immunitaire inné, présentent les **antigènes** du pathogène rencontré à des **lymphocytes T** et B, induisant de ce fait une réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes B sécrètent des immunoglobines E (IgE), anticorps dirigés contre l'antigène (pour l'élimination des pathogènes extracellulaires). Les lymphocytes T quant à eux, éliminent les parasites intracellulaires et sont responsables des réactions allergiques. Cette réponse immunitaire adaptative est plus importante au fur et à mesure des expositions à un même antigène car il y a formation de cellules mémoires B et T (on parle alors de réponse immunitaire acquise).

Les lymphocytes T sont caractérisés par un antigène de surface appelé CD (Cluster of Differentiation). L'antigène présent sur tous les lymphocytes T est le CD3, faisant partie du récepteur reconnaissant les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Parmi les lymphocytes T, une différence est faite entre les lymphocytes T-cytotoxiques (CD8+) et les lymphocytes T helper (CD4+).

Les CD4+ peuvent orchestrer les deux réponses immunitaires innée et adaptative en « appelant à l'aide » macrophages, NK, lymphocytes T-CD8+, lymphocytes B. Les lymphocytes T helper (Th) se divisent en deux catégories : Th1 et Th2, coordonnant l'activité d'effecteurs différents. Les sécrétions différentes de cytokines distinguent les deux catégories.

La lignée Th1 est engagée dans l'éradication de pathogènes intracellulaires (bactéries, virus) et est caractérisée par la production d'IL-2 (Interleukine 2), d'IL-12 et de IFN $\gamma$  (interféron gamma). La lignée Th2 stimule la production d'anticorps par les lymphocytes B, le recrutement d'éosinophiles et est caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. La voie Th2 stimule l'élimination des infections parasitaires helminthiques et provoque les réponses allergiques.

Les **cytokines** produites par la voie Th2 régulent le développement et l'activité de la voie Th1 et inversement. Par exemple, l'IFN $\gamma$  produit par la voie Th1 amplifie le développement de Th1 et inhibe la prolifération des lymphocytes Th2. De cette manière, les helminthes peuvent induire une réponse immunitaire qui pourrait atténuer la voie Th1.

Une troisième catégorie de lymphocytes CD4+, désignée par Th17, a été découverte dernièrement et est caractérisée par la production d'IL-17. Les voies Th1 et Th2 peuvent inhiber la voie Th17 mais ce n'est pas réciproque. L'IL-17 est élevée dans diverses conditions inflammatoires dont l'arthrite rhumatoïde, l'asthme et les maladies inflammatoires de l'intestin.

Une autre population de lymphocytes T est regroupée sous le nom de lymphocytes régulateurs (Treg), avec un profil sécrétoire (IL-10) différent des Th1, Th2 et Th17. Ces lymphocytes Treg suppriment les réponses immunitaires excessives de Th1, Th2, Th17, ils jouent un rôle important dans la maintenance de l'auto-tolérance, prévenant des maladies auto-immunes et inhibant les maladies inflammatoires comme l'asthme et les maladies inflammatoires de l'intestin.

### D.1.2 L'hypothèse de l'hygiène

L'espèce humaine est en contact étroit avec les helminthes depuis plus de 100 000 ans. Cette co-évolution de longue durée aurait permis une sélection de traits antigéniques chez l'homme, permettant de tolérer dans une certaine mesure, l'infection helminthique. Selon cette hypothèse, appelée hypothèse de la « Boucle d'or » (goldilocks hypothesis), un inoculum parasitaire peu important stimulerait les lymphocytes Treg, qui assurent une tolérance par l'hôte humain. Une infestation massive pourrait quant à elle causer directement des lésions. A l'opposé, le fait de ne plus être en contact avec le parasite serait associé à un défaut de tolérance du système immunitaire prédisposant à l'apparition de désordres auto-immuns (hypothèse de l'hygiène) [157,315].

Le traitement industriel des eaux usées, l'amélioration des conditions d'élevage des animaux, le contrôle sanitaire des industries alimentaires, ont été à l'origine d'une rupture du cycle des helminthes dans les pays développés. Des études autopsiques menées aux États-Unis avant 1940 montraient que 17% des individus étaient exposés à *Trichinella spiralis* alors qu'aujourd'hui moins de 5 personnes par an contractent cette infection dans ce pays [157]. Cette moindre exposition aux helminthes favoriserait le développement de maladies auto-immunes et d'allergies.

Il a été montré chez l'homme que l'éradication des schistosomiasis ou des helminthiases intestinales augmentait la réactivité à la poussière domestique [304]. En opposition, une autre étude montrait qu'un traitement anti-helminthes pris pendant un an, n'avait pas d'effets sur le risque de maladies allergiques [48].

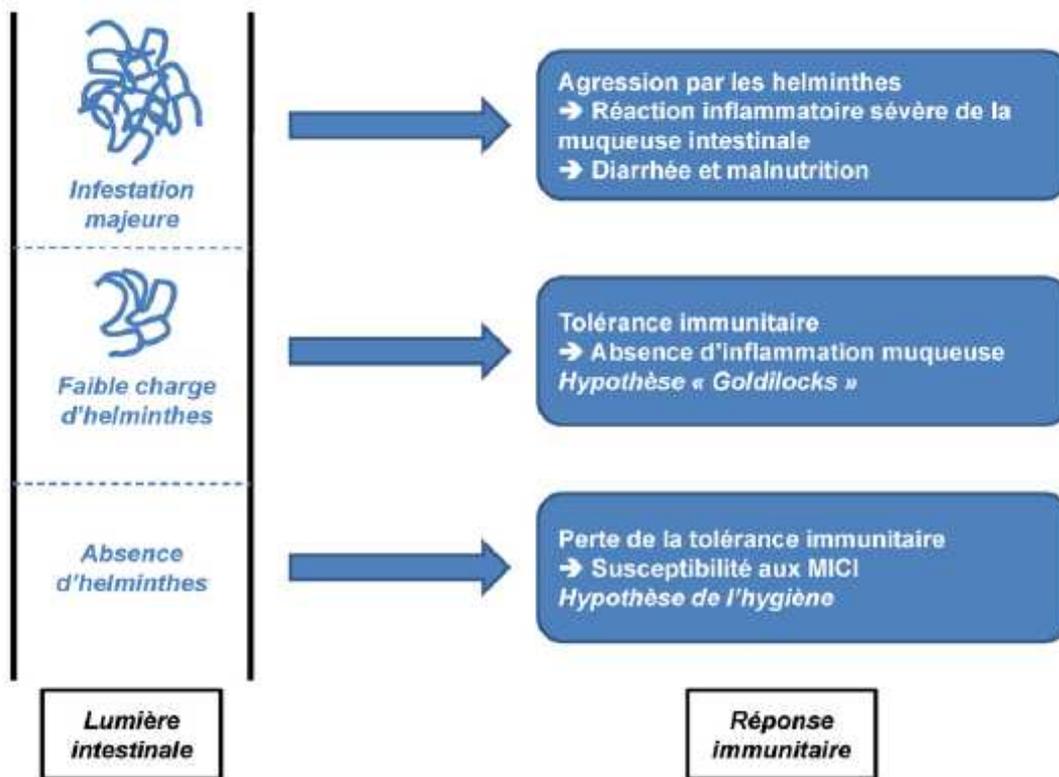
Une étude cas-témoin en Éthiopie [257] a montré que les gens infectés par les ankylostomes présentaient une basse fréquence d'asthme, observation rapportée également au Vietnam [84].

La sclérose en plaque est une autre maladie répartie selon un gradient nord-sud avec une prévalence grandissante dans les pays développés [83]. Cette augmentation est corrélée à la diminution du portage de *Trichuris trichiura* [83].

Concernant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les données sont nombreuses et montrent une corrélation inverse entre la prévalence des MICI et la fréquence de l'infection helminthique [157,315]. Les MICI comprennent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces maladies sont complexes et leur étiologie multifactorielle reste mal connue. L'hypothèse principale avancée pour expliquer le développement des MICI serait une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse. Cette réponse immunitaire, dirigée contre des éléments de la flore intestinale surviendrait chez des patients génétiquement prédisposés.

L'hypothèse de l'hygiène et de la boucle d'or (Fig.11) impliqueraient que les helminthes aient une certaine action anti allergique.

Figure 11 Illustration de l'hypothèse de la Boucle d'or (ou Goldilocks en anglais) et de l'hygiène à travers l'exemple d'helminthes parasites digestifs



Un faible inoculum d'helminthes stimulerait l'apparition de lymphocytes T régulateurs dont l'effet est d'assurer une tolérance immunitaire de ces parasites par l'homme. Une infestation massive peut causer des lésions de la muqueuse intestinale, alors que l'absence de contact avec le parasite serait associée à un défaut de tolérance du système immunitaire prédisposant ainsi à l'apparition de désordres auto-immuns (hypothèse de l'hygiène).

Source : Laclotte C., Oussalah A., Reyd P., Bensenane M., Pluvinage N., Chevaux J.-B., Trouilloud I., Serre A.-A., Boucekkine T., Bigard M.A., Peyrin-Biroulet L. Helminthes et maladies inflammatoires chroniques Intestinales. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* (2008) 32, 1064–1074

## .D.2. Helminthes : allergiques ou anti-allergiques ?

Les helminthes induisent majoritairement une forte réponse Th2 chez l'homme [80, 240,254]. De plus, tout en empêchant le développement d'une réponse Th1, les helminthes limitent le risque d'observer une réponse Th2 excessive... d'où l'idée de les utiliser comme immunomodulateurs. Alors les helminthes ont-ils un potentiel antiallergique ?

Les helminthes sont suspectés de soutenir certaines **atopies**, par l'induction d'IL-4 menant au développement accru de cellules allergisantes de la voie Th2 [80]. Les taux d'**éosinophiles** et de **mastocytes** activés élevés, peuvent augmenter l'inflammation de type allergique. L'irritation mécanique, par la migration larvaire, de sites d'inflammation allergique (dans les poumons, ou le tractus digestif), pourrait également augmenter l'expression d'une atopie. En effet, la réponse inflammatoire induite au niveau de ces sites, rend le système immunitaire plus sensible aux allergènes présents (qui seront détectés et présentés par les CPA).

Certains produits d'helminthes agissent directement comme des allergènes (par exemple *Anisakis simplex*) [80]. Il existe certains exemples dans lesquels l'infection par les helminthes est associée à une augmentation de l'allergie [80], cependant la plupart des études suggèrent l'opposé.

Une étude a montré que la présence d'IL-10 dans le sérum de patients infectés par des schistosomes était associée à un test allergique négatif [305]. Ces résultats suggèrent que l'IL-10 (sécrété par les lymphocytes Treg et les CPA) est sécrétée en réponse à une infection helminthique chronique et interfère avec les mécanismes effecteurs de l'allergie (dégranulation des mastocytes, prolifération des lymphocytes Th2). Lors de l'infection de la souris par différents helminthes, la réponse allergique est supprimée et associée à la présence d'IL10 et de lymphocytes Treg [80].

D'autres mécanismes sont impliqués dans la réduction de la réponse allergique [80] :

- induction de macrophages « alternatifs » : supprimerait les fonctions des lymphocytes T
- hypothèse peu probable des IgE bloquées : protection contre la dégranulation des mastocytes et des basophiles par saturation des sites de clivages de ces cellules aux IgE ; de ce fait les IgE spécifiques de l'allergène ne pourraient pas agir.
- induction de cellules B immunosuppressives

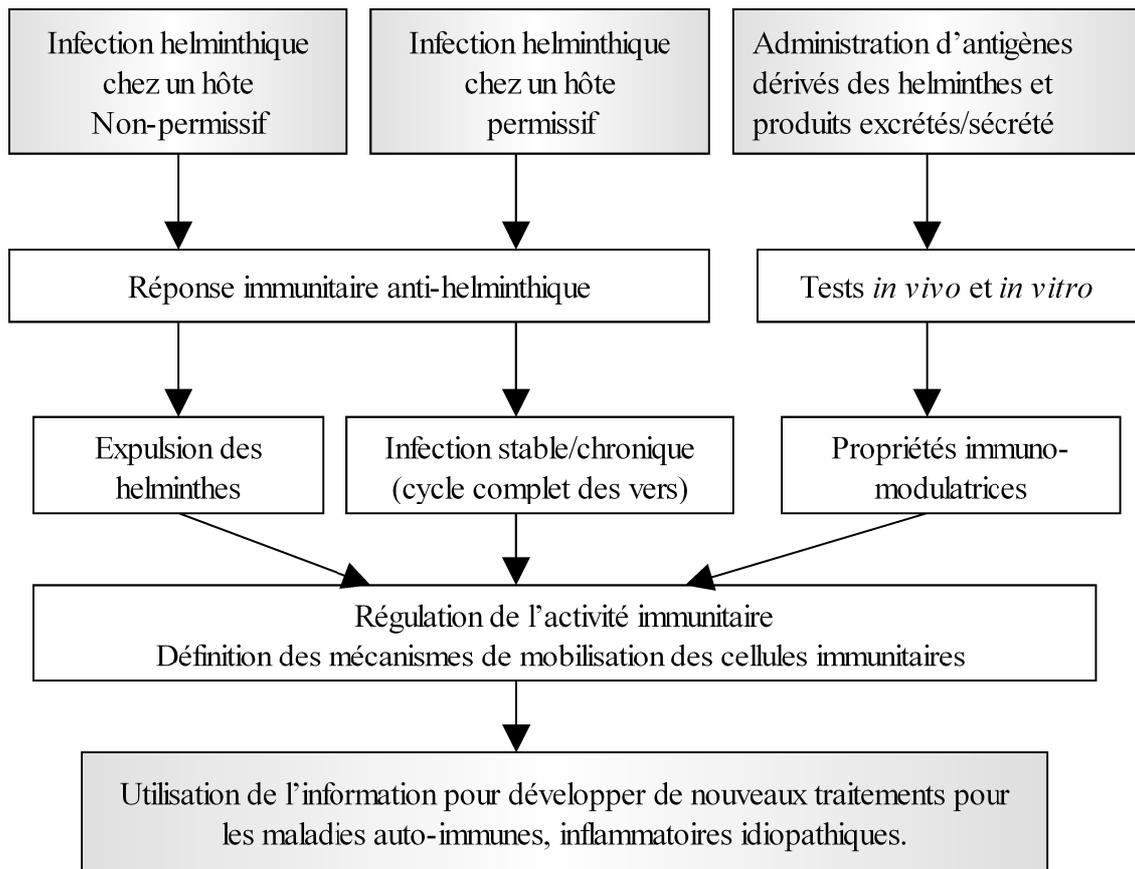
Les méta-analyses des données publiées arrivent à la conclusion que certains types d'helminthes favorisent l'exacerbation ou la génération de réponses allergiques alors que d'autres semblent protéger (Tabl.5) ou encore provoquer des effets controversés [80]. Les données fournies par les études sur les modèles animaux, laissent peu de doutes à propos de l'effet améliorateur de l'infection helminthique sur les immunopathologies : le bénéfice pour la santé est obtenu par plusieurs approches schématisés sur la figure 12.

**Tableau 5 Helminthes dont les propriétés de protection/induction/exacerbation des réponses allergiques ont été rapportées**

<b>Protection contre les allergies</b>	<b>Induction/exacerbation des réponses allergiques</b>
<b>Etudes épidémiologiques</b>	<b>Etudes épidémiologiques</b>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Anisakis simplex</i>
<i>Intestinal helminths</i> (en particulier les ankylostomes)	<i>Ascaris spp.</i>
<i>Enterobius vermicularis</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Enterobius vermicularis</i>
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Hook worm</i>
<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Toxocara spp.</i>
<i>Oxyuris spp.</i>	
<b>Expérimentation animale</b>	<b>Expérimentation animale</b>
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	<i>Ascaris suum</i>
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	<i>Brugia malayi</i>
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Toxocara canis</i>
<i>Strongyloides venezuelensis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
	<i>Schistosoma spp</i> et oeufs

Source : Erb K.J. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? Trends in Immunology Vol.30 No.2

Figure 12 **Illustration de l'infection helminthique au service de la santé**



Source : McKay D.M. *The therapeutic helminth? Trends in Parasitology Vol.25 No.3 (2008)*

### **.D.3. Les dangers potentiels de l'usage thérapeutique des helminthes**

Utiliser des helminthes vivants pourrait créer directement une pathologie immune sévère. Dans le cas d'helminthes résidant dans le tractus digestif, ils pourraient engendrer des vomissements, diarrhées connus pour certaines affections helminthiques. D'autres effets secondaires potentiels de leur usage seraient une réaction anaphylactique ou allergique. Cependant la plupart des infections helminthiques ne sont pas responsables d'anaphylaxie chez les personnes infectées parce que le parasite et l'hôte ont développé des mécanismes d'inhibition (vus aux paragraphes précédents). Nous avons vu également les controverses à propos de l'effet anti-allergique ou non des helminthes.

L'avantage dans l'utilisation de pathogènes humains est que les effets secondaires sont connus et que des médicaments antihelminthiques sont disponibles pour en tuer une grande partie. L'usage de *Trichuris suis*, un vers parasite de l'intestin du porc, a été testé chez l'homme dans le traitement de MICI. Les chances que cet helminthe soit pathogène pour l'homme sont faibles étant donné qu'il est parasite naturel du porc et qu'aucune infection pathogène à *T. suis* n'a été rapportée [157]. La prévalence d'infection à *T. suis* chez le porc varie de 19 à 45% à travers le monde alors que la prévalence de l'infection humaine pour ce parasite est très faible [157]. Les études produites sur

l'infection expérimentale de l'Homme par *T. suis* ne rapportent aucun effet secondaire. Dans les expériences de Summers *et al.* plus de 120 patients atteints de MICI ont reçu plus de 2000 doses d'œufs de *T.suis*, certains pendant plus de quatre ans [287]. En Europe, la tolérance rapportée est aussi excellente [287], même avec des traitements immunosuppresseurs en cours.

Deux cas de complication suite à un traitement par *T. suis* ont été rapportés. Le premier, a développé 6 mois après le traitement, une **iléocolite** étendue, de gravité modérée à sévère, associée à une atteinte rectale ulcérée et une sténose du côlon descendant [151]. Les biopsies ont retrouvé la présence intramuqueuse de *T. suis* traduisant une infection parasitaire patente. Le fait que le patient ait reçu un traitement par anti-TNF avant l'ingestion d'helminthes pourrait suffire à expliquer la survenue d'une infection parasitaire invasive puisque le TNF est connu pour être essentiel dans la défense de l'hôte contre les infections par helminthes. Les essais cliniques publiés n'utilisent pas l'anti-TNF. Le risque d'infection iatrogène peut cependant être par la suite maîtrisé par un traitement antihelminthique. Pour Hsu *et al.* [129], les patients non répondeurs au traitement par les helminthes devraient systématiquement bénéficier d'un traitement antiparasitaire pour plus de sécurité. Le second cas est un *sepsis* grave chez un patient traité par helminthes [267] : le parasitisme a favorisé le développement d'une co-infection par *Campylobacter jejuni*. La tolérance à long terme de ce traitement n'a pas encore été établie.

## **.D.4. Les essais cliniques de traitement par les helminthes**

### **D.4.1 Helminthe-thérapie avec *Necator americanus***

L'infection simultanée de *Necator americanus* et *Ancylostoma duodenale* est rencontrée parmi les gens pauvres sous les zones tropicales (740 millions de cas). L'effet pathogène majeur survient lorsque les parasites adultes causent une **anémie** par la perte intestinale de sang. En dépit de la morbidité associée à l'infection par ce vers, certains effets sont apparemment bénéfiques chez les hôtes souffrant de **Maladie de Crohn** ou de maladies liées à une suractivation immunitaire. Le Dr. David Pritchard de l'Université de Nottingham, UK et Jasper Lawrence d'Autoimmune Therapies, Tijuana, Mexico, se sont eux-mêmes infectés avec les vers et ont rapporté de bons résultats concernant la diminution des symptômes préexistants avec une stabilisation de la maladie [289]. Lawrence déclare que grâce à cette thérapie, son asthme sévère et ses allergies saisonnières sont en rémission.

Mortimer *et al.* [193] ont mené une étude pour déterminer la dose de larves à administrer pour obtenir un seuil voulu d'œufs par gramme chez l'humain, en vue de produire des essais cliniques sur l'asthme. L'infection par 10 larves de *N. americanus* est bien tolérée et paraît être une dose convenable pour des études cliniques préliminaires.

Ce parasite pourrait être utilisé pour traiter la maladie de Crohn [53]. La maladie de Crohn est un type de MICI où la paroi du tractus gastro-intestinal inflammée est à l'origine de diarrhées sévères et de douleurs abdominales.

## D.4.2 Helminthe-thérapie avec *Trichuris suis*

Summers *et al.* ont produit plusieurs études sur l'utilisation de *T. suis* chez des patients atteints de MICI (Tabl.6)

**Tableau 6 Efficacité et tolérance des helminthes dans la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (résultats en intention de traiter).**

Références	Type d'essai	Nombre de patients	Schéma thérapeutique et suivi	Objectifs	Résultats
Summers et al. [24]	Ouvert	4MC CDAI $\geq$ 220  3 RCH SCCAI > 4	2500 œufs de <i>T. suis</i> puis suivi toutes les deux semaines pendant 12 semaines. Pour deux MC et deux RCH : 2500 œufs toutes les trois semaines pendant 12 semaines	Tolérance  Efficacité CDAI SCCAI  IBDQ	Aucun effet secondaire clinique et biologique Efficacité : CDAI < 150 : 0,75 CDAI $\downarrow$ 100 points : 0,25 SCCAI < 4 : 3/3 IBDQ $\geq$ 170 : 6/7
Summers et al. [25]	Ouvert	29 MC CDAI $\geq$ 220	2500 œufs de <i>T. suis</i> toutes les trois semaines pendant 24 semaines	Tolérance  Efficacité CDAI à S12 et S24	Aucun effet secondaire Efficacité S12 : CDAI < 150 : 19/29 (66 %) S12 : CDAI $\downarrow$ 100 : 22/29 (76 %) S24 : CDAI < 150 : 21/29 (72 %) S24 : CDAI $\downarrow$ 100 points : 23/29 (79 %)
Summers et al. [26]	Randomisé contrôlé contre placebo, double insu	54 RCH  UCDAI $\geq$ 4	24 : placebo  30 : 2500 <i>T. suis</i> toutes les 2 semaines pendant 12 semaines	Primaire : UCDAI $\downarrow$ 4 points  Secondaire :  UCDAI = 0-1 Tolérance	43 % (13/20) vs 17 % (4/24) ; p = 0,04  10 % (3/30) vs 4,2 % (1/24), p = NS  Aucun effet secondaire

MC : maladie de Crohn ; RCH : rectocolite hémorragique ; CDAI : Crohn's Disease Activity Index ; SCCAI : Simple Clinical Colitis Activity Index ; UCDAI : Ulcerative Colitis Disease Activity Index ; NS : non significatif ; S : semaine ; IBDQ : Inflammatory Bowel Disease Quality of Life Index.

Source : Laclotte C., Oussalah A., Rey P., Bensenane M., Pluvinage N., Chevaux J.-B., Trouilloud I., Serre A.-A., Boucekine T., Bigard M.A., Peyrin-Biroulet L. Helminthes et maladies inflammatoires chroniques Intestinales. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* (2008) 32, 1064—1074

La première étude voulait déterminer la tolérance du traitement par helminthes chez les patients atteints de MICI [284]. Une rémission clinique (définie par un score CDAI -Crohn disease activity index- inférieur à 150) a été obtenue chez trois malades sur les quatre. Pour les patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH), une rémission clinique a été observée chez les trois patients avec une réduction de 57 % en moyenne du score d'évaluation. Afin de préciser la tolérance de ce traitement, quatre patients ont reçu plusieurs doses d'œufs de *T. suis* toutes les trois semaines pour une durée de suivi minimale de 30 semaines. Aucun effet secondaire clinique ou biologique (objectif principal) n'a été observé.

Le second essai ouvert a ensuite porté uniquement sur des patients atteints de MICI majoritairement réfractaires au traitement médical standard, dans l'intention de traiter la MICI [285]. Ils ont reçu 2500 œufs de *T. suis* toutes les trois semaines pendant 24 semaines. L'activité clinique de la maladie était évaluée aux semaines 12 et 24. Quatre sujets ont été sortis de l'étude avant la semaine 12 en raison d'une maladie toujours active et une femme en raison d'une grossesse. Une réponse clinique et une rémission clinique étaient observées chez respectivement, 76 % (22/29) et 66 % (19/29) des patients à la semaine 12 ; ces chiffres étaient respectivement, de 79 et 72 % à la semaine 24. Comme dans l'étude précédente, aucun effet secondaire n'a été observé chez les 29 sujets inclus.

Enfin, la dernière étude est un essai randomisé contre placebo chez 54 patients atteints de RCH active [286]. Vingt-quatre patients ont été traités par placebo et 30 patients ont reçu 2500 œufs de *T. suis* toutes les deux semaines pendant 12 semaines ; 52 sujets ont complété l'étude (2 ont été exclus pour violation du protocole). Une réponse clinique était plus fréquente chez les patients traités par helminthes que dans le groupe placebo (respectivement, 43,3 % versus 17 % ;  $p = 0,04$ ) ; les taux de rémission clinique n'étaient toutefois pas significativement différents dans les deux groupes. Plusieurs critiques de forme ont été émises à l'encontre de la mise en forme des résultats. Pour Mayer [179], le nombre de patients répondeurs et l'intensité de la réponse clinique étaient trop faibles pour tirer des conclusions définitives sur la place des helminthes dans le traitement de la RCH.

Une étude randomisée en double aveugle avec un groupe contrôle sous placebo, de Bager *et al.*, avait pour objectif de déterminer l'efficacité de l'helminthe-thérapie pour les rhinites allergiques [12]. Cent personnes atteintes de rhinite allergique induite par le pollen, ont été réparties ainsi : 47 personnes sous placebo et 49 personnes qui ont ingéré 8 doses de 2500 œufs à un intervalle de 21 jours. Des diarrhées transitoires à 41 jours ont été observées chez 33% des patients traités avec les œufs (2% pour le placebo). Une augmentation des taux d'éosinophiles, d'IgE *T.suis* spécifiques, d'IgG, d'IgA est mesurée chez le groupe traité sans aucun changement significatif des symptômes. Les auteurs concluent que la thérapie avec les œufs de *T.suis*, n'a aucun effet sur la rhinite allergique mais induit une réponse clinique et immunologique correspondant à une infection par les helminthes.

En résumé, le caractère monocentrique des études disponibles, avec des résultats qui n'ont pas été reproduits par des équipes indépendantes (concernant les MICI), et le fait que seuls deux essais randomisés contre placebo aient été menés à ce jour, ne permettent pas de tirer de conclusions définitives sur l'efficacité thérapeutique.

## **.D.5. Bilan**

Beaucoup de questions restent sans réponse quant à la protection des helminthes envers les désordres allergiques. Les données épidémiologiques ne permettent pas de conclure même si de nombreuses (mais pas toutes) expériences chez l'animal montrent une réduction de l'allergie. Ces expériences ne reflètent pas des conditions réelles avec des souris dans un environnement sans contact avec de multiples allergènes et des helminthes non-utilisables chez l'homme. L'application à l'homme donnera-t-elle les mêmes résultats ? La thérapie est-elle vraiment sûre pour les patients ? Sous quelles conditions (dose, durée) la thérapie pourrait-elle être efficace ? Quel est le mécanisme de protection ? L'étude des réactions aux infestations helminthiques a notamment été l'occasion de donner un nouvel éclairage sur l'épidémiologie et la physiopathologie des MICI.

## E La thérapie par des poissons

La Turquie, riche de 1800 sources chaudes, possède une source originale qui attire de nombreux curieux et personnes souffrant de problèmes dermatologiques [246].

Tout commence vers 1917 : d'après l'histoire locale, à 1660 m d'altitude, dans la province de Sivas (Fig.13), un berger, au pied blessé, se serait baigné dans les retenues d'eau naturelles qui auraient guéri sa blessure [144,246]. Ces sources thermales ont la particularité d'abriter de petits poissons qui ne sont pas étrangers au développement de cette station thermale appelée Kangal Hot Spring (leur site web : <http://www.balikli.org>). La station a une réputation mystique car on ne possède aucune information sur la manière dont les poissons sont arrivés dans la région. Les premières piscines thermales publiques ont été construites en 1963 et les premières cures pour traiter le psoriasis sont rapportées dès 1980 [314,144,246].

Après une brève présentation des poissons de Kangal et de leur milieu, nous nous pencherons sur leur usage pour traiter le psoriasis.

Figure 13 Carte de la Turquie



Source : World Factbook, édité par la Central Intelligence Agency des États-Unis d'Amérique.

## **.E.1. Les célèbres poissons de Kangal**

L'eau de la source est toute l'année à une température de 35°C, avec un pH légèrement alcalin de 7,2 et une valeur d'oxygène de 2,9 ppm [207]. L'eau est riche en calcium, magnésium et particulièrement en sélénium (1,3 mg/l) [144,246].

La caractéristique essentielle de Kangal spring est sans aucun doute, ses habitants aquatiques, surnommés par les locaux « doctor fish ». Deux espèces différentes appartenant à la famille des cyprinidés, sont retrouvées dans les étendues d'eau de la source [314,296] :

- *Cyprinion macrostomus macrostomus* surnommé « striker » : 15 à 20 cm de long, il possède une bouche terminale.
- *Garra rufa obtusa* (Photo 12): 19 cm de long maximum, sa bouche ventrale en forme de croissant lui permet d'adhérer par succion aux rochers pour se nourrir de plancton. Deux stades sont différenciés : le « jabber », forme immature qui va perdre ses spots latéraux durant la maturation pour devenir un « licker ».

*Gara rufa* est considéré comme le plus efficace dans le traitement des maladies de peau.

*Garra rufa* se retrouve dans les rivières du Nord et du centre du moyen orient, principalement en Turquie, Syrie, Iraq et Iran. Il est protégé de l'exploitation commerciale en Turquie en raison de la surexploitation des ressources pour l'export. *Garra rufa* peut être gardé en aquarium entre 17 et 27°C.

Ces deux poissons sont omnivores et se nourrissent normalement de zooplancton et de phytoplancton. Les températures élevées de l'eau de source sont la cause d'une quantité insuffisante de plancton pour les poissons. Ainsi, les poissons ont une croissance ralentie et deviennent des prédateurs agressifs. Dans les piscines, la pauvreté des ressources rend la peau humaine attractive. Les « strikers » (déchireurs) interviennent en premier, attaquant la peau affectée en mordillant la surface. Les « jabbers » (perceurs) creusent la peau ramollie par l'eau tiède et sont parfois à l'origine de saignements. Les « lickers » (polisseurs) avalent les débris en lissant ainsi la peau et sécrétant une enzyme utilisée dans le traitement topique du psoriasis (l'anthraline : freine la synthèse de l'ADN et la mitose de l'épiderme hyperplasique). La peau squameuse est attaquée en priorité par les poissons qui ne lèsent généralement pas la peau saine. Ce nettoyage est accompagné de sensations de chatouillement.

**Photo 12 *Garra rufa***



© Emma Turner, Source : Thoene Martin. Pictorial Species Search Index → *Garra* species. Site de Loaches oneline [en ligne]  
<http://www.loaches.com/species-index/pictorial-species-search-index/garra-species>

## **E.2. Utilisation des « doctor fish » dans le traitement du psoriasis**

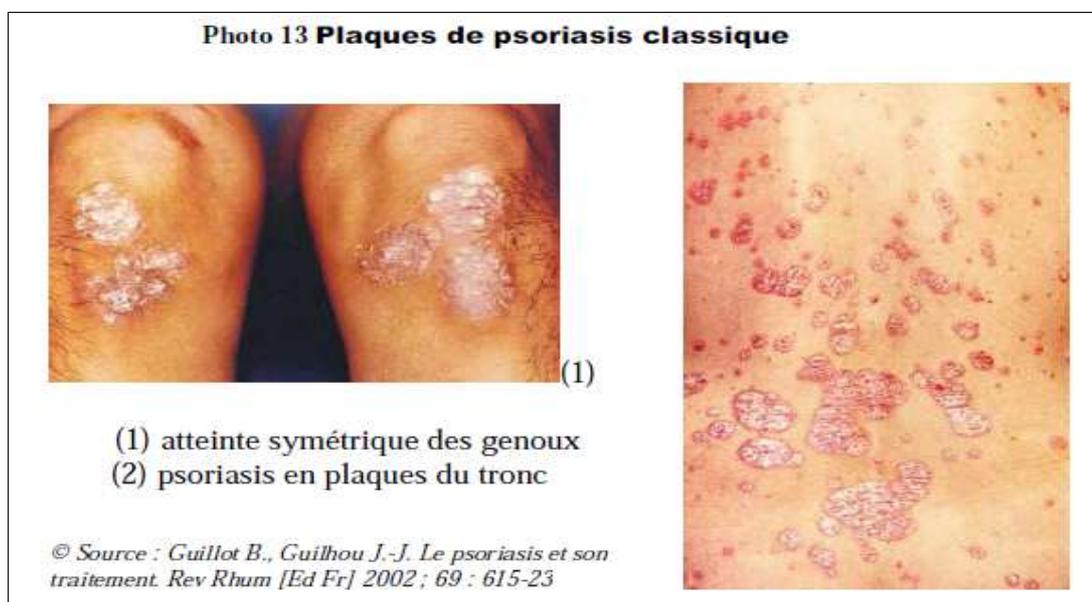
Un terme a été proposé récemment pour désigner le traitement par ces poissons : l'ichthyothérapie.

L'usage de ce traitement dans le psoriasis a fait l'objet de quelques études pour objectiver son efficacité et les phénomènes qui concourent à la guérison.

### **E.2.1 Mais avant quelques mots sur le psoriasis[106] :**

Le psoriasis est une maladie de la peau commune avec une distribution mondiale : la prévalence estimée en Europe et aux États-Unis est de 2%. Le psoriasis est une maladie multifactorielle responsable d'une anomalie de la prolifération et de la différenciation **kératinocytaire**. Il en résulte des lésions **érythémato-squameuses**, parfois **pustuleuses**, en particulier aux zones de friction (Photo 13). Le psoriasis peut atteindre la peau, les muqueuses buccale et génitale, ainsi que les articulations. Il peut apparaître sur une égratignure, sur des lésions dermatologiques déjà existantes, des zones de frottement, des zones d'anciens traumatismes et à nouveau sur des lésions de psoriasis dont le sujet souffre déjà : on parle de phénomène de Koebner. Inversement, lorsqu'une région de peau psoriasique blanchit après un traumatisme on parle de phénomène de Koebner inverse.

Des facteurs génétiques, environnementaux (stress, agents infectieux), immunologiques (inflammation chronique auto-immune) sont impliqués dans la pathogenèse. Des avancées considérables ont été réalisées dans la gestion de la maladie mais il n'y a pas de guérison possible ni de moyen de traitement sûr, simple et invariable. Le traitement du psoriasis fait appel à trois types de moyens : les traitements locaux, les traitements systémiques, la photothérapie. Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou en association. Certains patients se tournent vers des méthodes alternatives ou des traitements complémentaires.



## E.2.2 Etudes publiées sur l'ichthyothérapie

**Photo 14 Patient assis dans la piscine de soins durant la thérapie avec les *Garra rufa***



© Source : Grassberger M., Hoch W. Ichthyotherapy as Alternative Treatment for Patients with Psoriasis: A Pilot Study. eCAM 2006;3(4):483-488

L'ichthyothérapie fait partie des traitements alternatifs et/ou complémentaires.

En 2000 Ozcelik *et al.* [206] ont testé l'efficacité de l'ichthyothérapie des sources de Kangal sur 87 patients atteints de psoriasis classique. La durée minimale de traitement était de 11 jours avec une durée quotidienne de station dans les piscines de 7,4 heures. Une diminution significative du score calculé grâce au Psoriasis Area Severity Index (PASI), a été rapportée à chaque relevé (jours 3, 6, 9, 12, 15, 21). Le score PASI prend en compte l'extension des surfaces lésée ainsi que la sévérité de l'érythème, de la desquamation, et de l'induration (0 : pas de psoriasis, 72 : sévérité maximale). Chez 35 patients, ont été observées des rémissions plus longues que les rémissions obtenues par les traitements avec des corticoïdes topiques.

Entre 2002 et 2004, en Australie, Grassberger *et al.* [101], ont traité 67 patients atteints de psoriasis pour évaluer l'efficacité de l'ichthyothérapie en dehors de la région de Kangal. Contrairement à la méthode classique, le « bain avec les poissons » était limité à 2 heures quotidiennes dans des bassins individuels (Photo 14). La thérapie a été combinée avec une courte application d'UVA pour simuler les conditions naturelles de Kangal. Trois semaines après le début de la thérapie, le score PASI a baissé de 71% (Photo 15). Respectivement 46% et 45% des patients ont vu le score diminuer des 75% et 50%. A la fin du traitement, 90% des patients envisagent d'y avoir à nouveau recours.

**Photo 15 Trois patients avant et après ichthyothérapie combiné aux radiations UVA pendant 3 semaines**



© Source : Grassberger M., Hoch W. Ichthyotherapy as Alternative Treatment for Patients with Psoriasis: A Pilot Study. *eCAM* 2006;3(4)483-488

Les mécanismes complexes de l'action de l'ichthyothérapie de Kangal ne sont pas complètement compris. Le nettoyage par les poissons des plaques de psoriasis facilite ensuite la pénétration de la lumière ultraviolette naturelle et contribue à la « guérison » des lésions [206]. L'eau chaude pourrait également jouer un rôle, associée au stress psychologique réduit par la nature relaxante du traitement.

### **.E.3. Bilan**

Les *Garra rufa* sont aujourd’hui célèbres et leur usage se répand dans le monde. Des établissements mettent en place des cures spécifiques pour traiter le psoriasis et l’eczéma. Le monde de la cosmétique s’y intéresse et l’utilise en guise de gommage et de massage activant la microcirculation. En 2006, des spas utilisant le « doctor fish » ont ouvert à Hakone au Japon, à Umag en Croatie, où les poissons sont utilisés pour nettoyer les baigneurs et le spa [321]. D’autres spas ont ouvert également à Hainan en Chine, comme en Belgique, aux Pays-Bas, en Corée du Sud, à Singapour, en Slovaquie, à Surat en Inde, en Indonésie, en Malaisie et à Hong-Kong [321]. En 2008, aux Etats-Unis, un service de pédicure utilisant le “doctor fish” a fait l’objet d’un reportage à la BBC [18] (Photo 16), où il est vanté pour son effet de rajeunissement de la peau, de relaxation en communion avec la nature. La même année, la SARL Py-khuan voit le jour en France, elle propose notamment la fourniture des poissons et l’installation du matériel nécessaire à leur utilisation [67].

**Photo 16 Pédicure par ichthyothérapie**



© Source : Planetkdo. La nouvelle vague de pédicure débarque en France. Site de Orsérie [en ligne]  
<http://www.orserie.fr/style-attitude/article/la-nouvelle-vague-de-pedicure-2789> (page consultée le 20

# **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.



# 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.

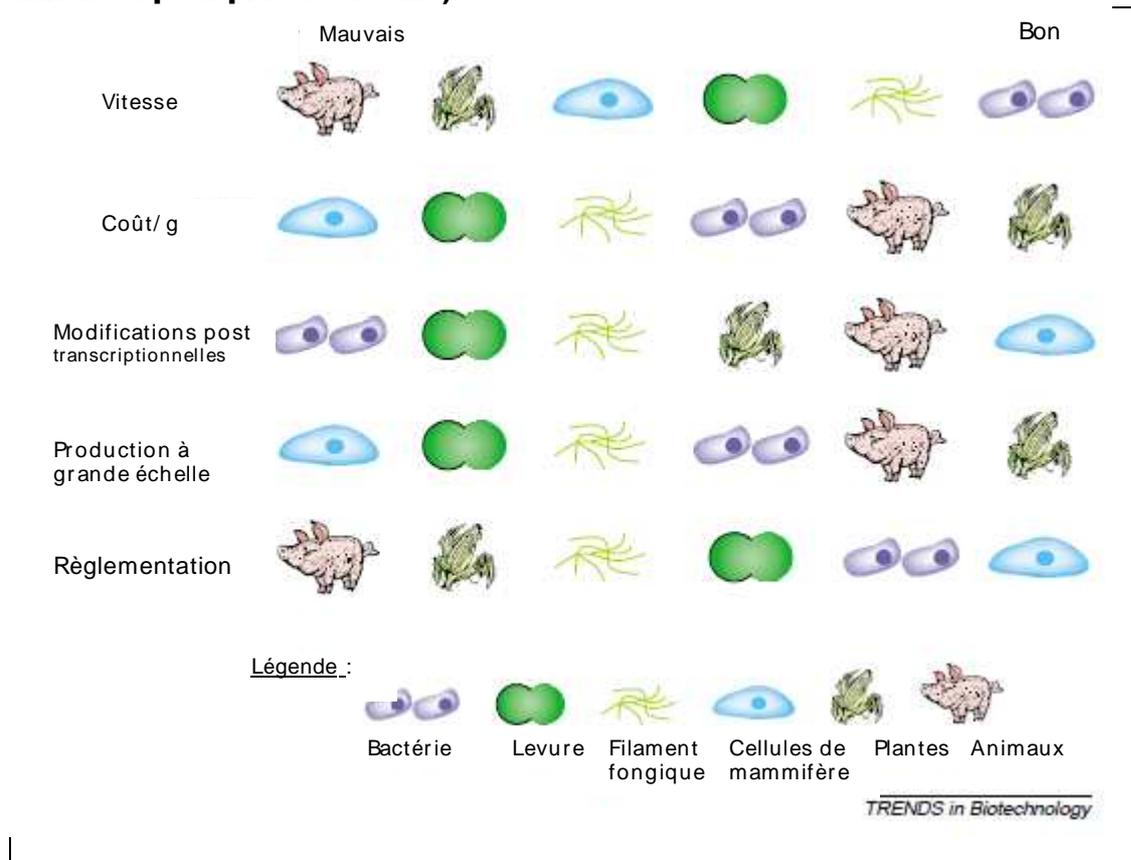
### **A.1.4 Protéines pharmaceutiques et animal**

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].

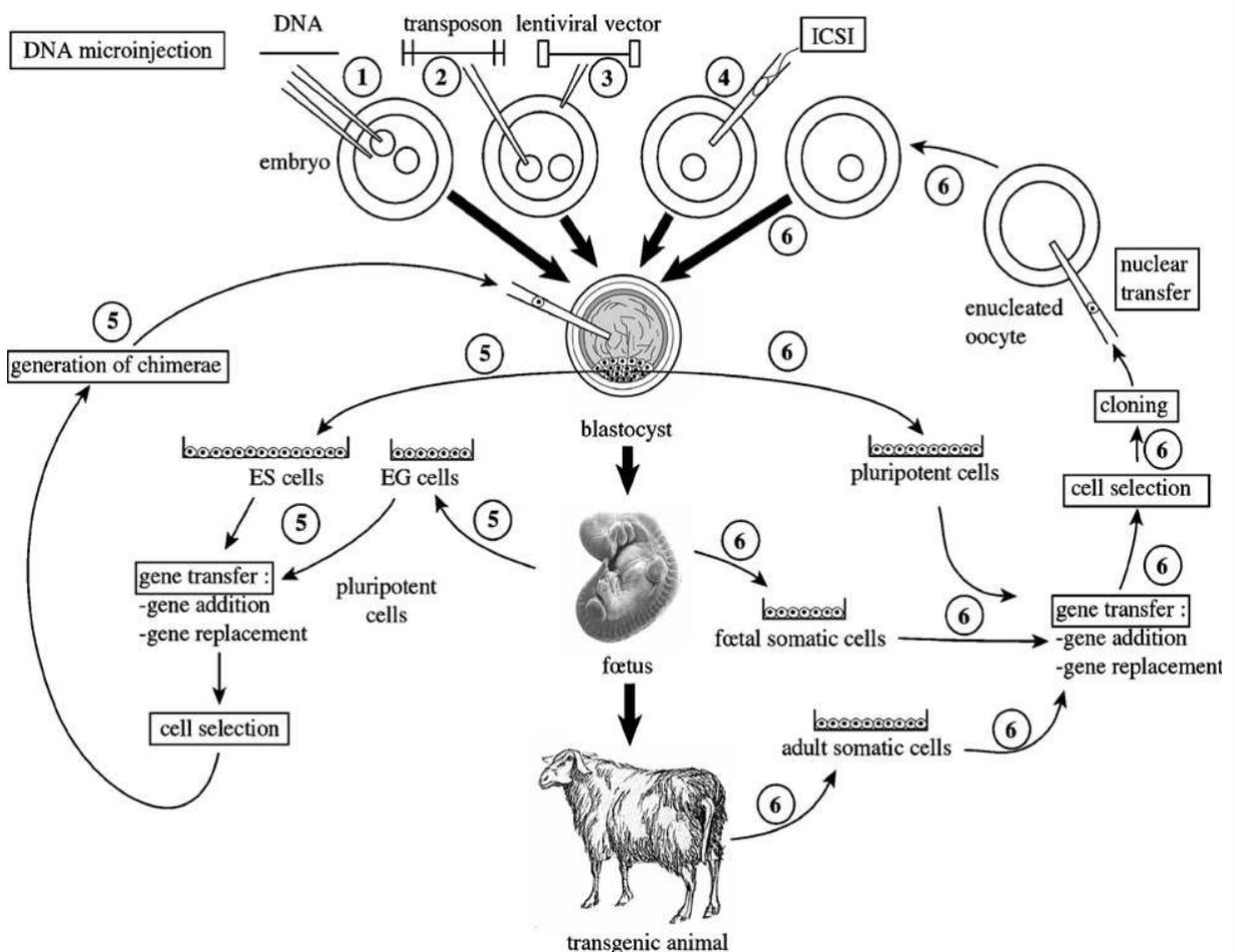
Certains types cellulaires paraissent être plus facilement génétiquement modifiables que d'autres ; l'efficacité du transfert nucléaire et la viabilité de la progéniture en est modifiée [142,309,316].

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 gonads 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].

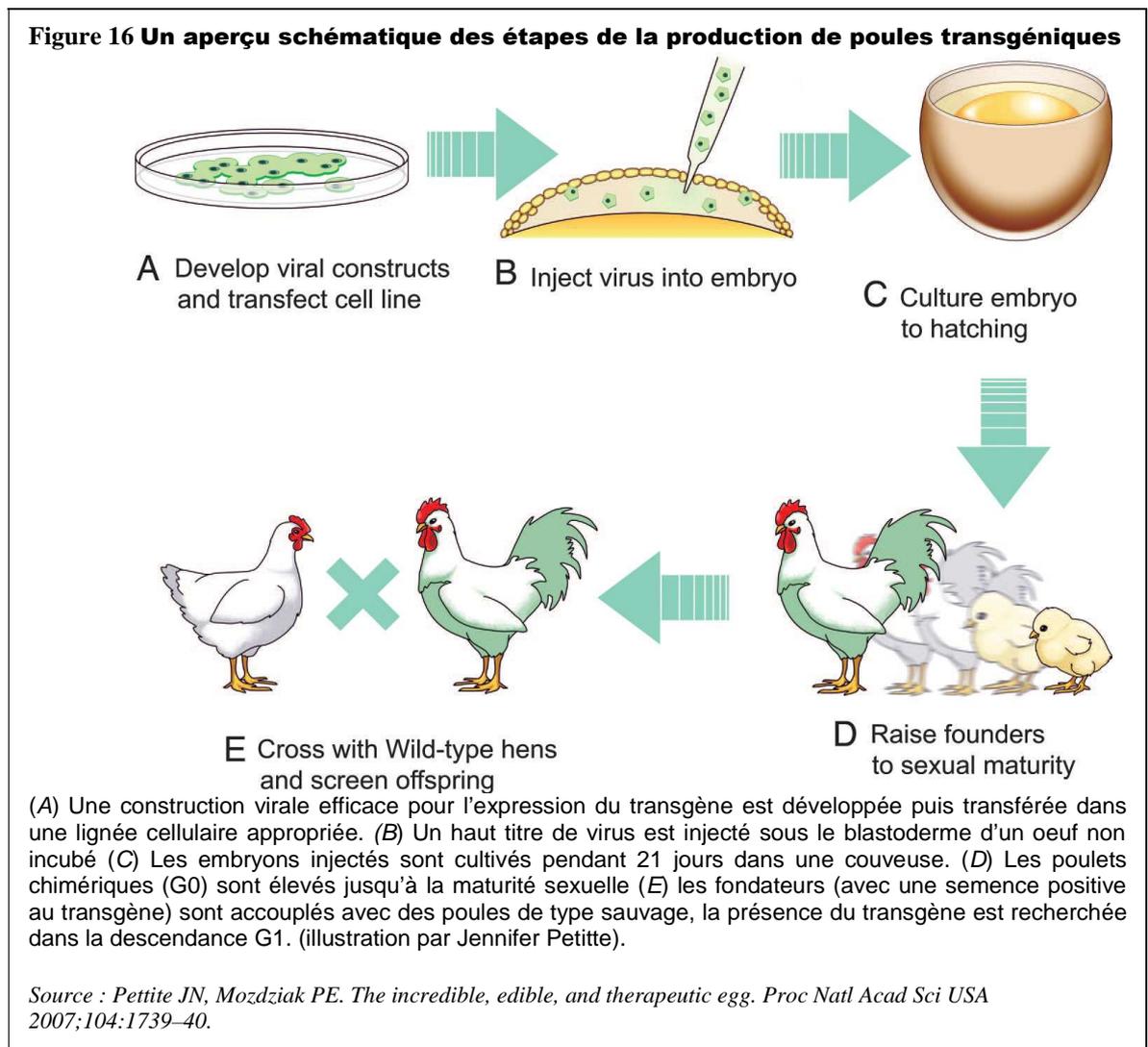
## A.2.7 La production d'oiseaux transgéniques

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).

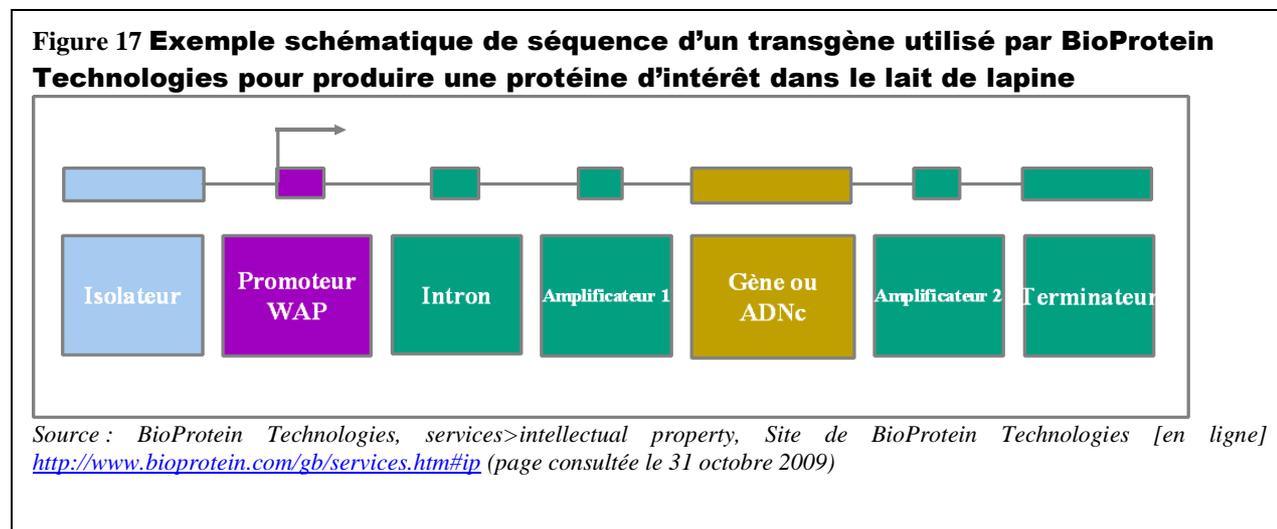


Quelle que soit la technique utilisée, le taux de réussite mesuré en nombre de naissances d'animaux vivants porteurs du transgène est très faible. Il n'en reste pas moins que les chercheurs persistent et que les animaux transgéniques ont de nombreux usages aujourd'hui.

## .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*

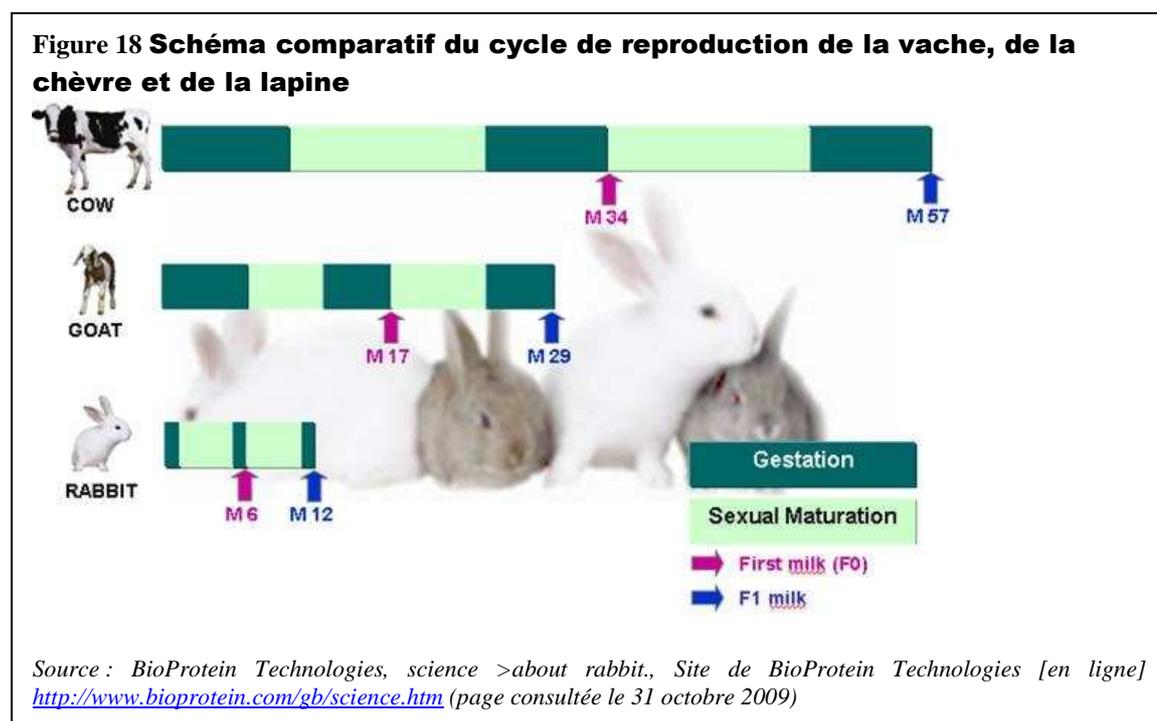
Cette espèce offre de nombreux avantages. Le lapin est phylogénétiquement plus proche des primates que ne le sont les rongeurs et les ruminants. La glande mammaire des lapins possède des capacités post-transcriptionnelles plus proches de celles de l'Homme comparées aux capacités des ruminants. La glande mammaire produit des protéines hypo-fucosylées ce qui présente un intérêt pour la production d'anticorps monoclonaux à mécanisme d'action ADCC. Des sialylations 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 <sup>-1</sup> )	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' $\alpha$ 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].

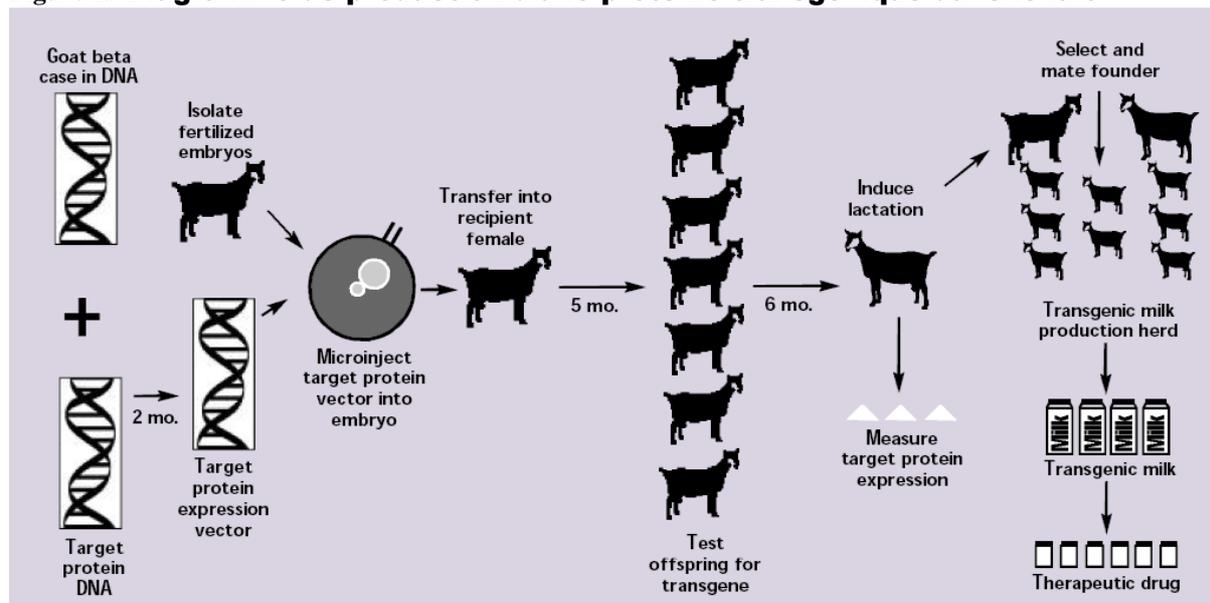
#### **A.3.4 Les différentes étapes de production de protéines pharmaceutiques recombinantes à travers l'exemple du lait**

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 ( $\beta$ -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 règlementaires, 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<sup>MC</sup> 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-

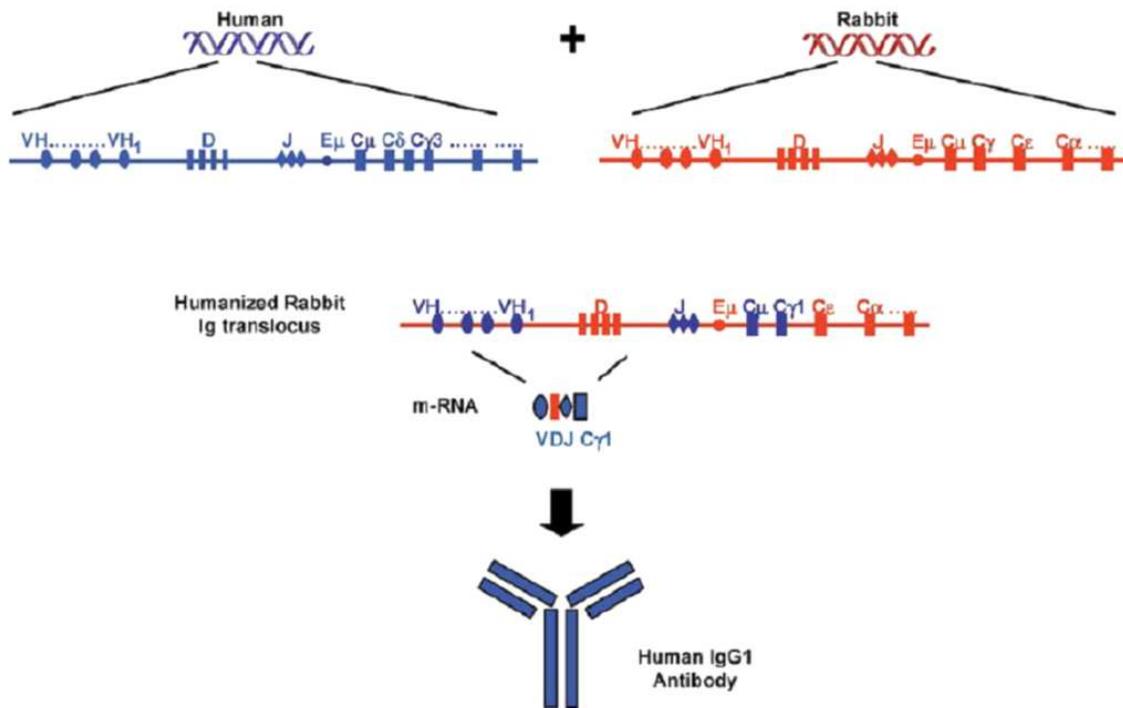
immun (PTI) et le **diabète de type 1**. Le CD20 est un antigène situé sur la surface des lymphocytes B matures et des cellules cancéreuses dérivées des lymphocytes B. L'anticorps monoclonal anti-CD20 recrute les défenses naturelles de l'organisme pour atteindre les lymphocytes B identifiés. Les cellules 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	<a href="http://www.transgenics.com">www.transgenics.com</a>	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	<a href="http://www.pharmathene.com">www.pharmathene.com</a>	Butyrylcholinesterase	Research
Cattle	Hematech, United States	<a href="http://www.hematech.com">www.hematech.com</a>	Polyclonal antibodies	Research
	GTC Biotherapeutics, United States	<a href="http://www.transgenics.com">www.transgenics.com</a>	Human serum albumin	Research
Pigs	Revivacor, United States	<a href="http://www.revivacor.com">www.revivacor.com</a>	Xenotransplantation (cartilage implants) Polyclonal antibodies	Research
	Progenetics	<a href="http://www.progtx.com/">http://www.progtx.com/</a>	Factor-IX	Research
	Foulum Research Center, Denmark	<a href="http://www.agrsci.org/ny_navigation/forskning/centre/forskningscenter_foulum">http://www.agrsci.org/ny_navigation/forskning/centre/forskningscenter_foulum</a>	Alzheimer's model	Research
	North Carolina State University (R.M. Petters), United States	<a href="http://www.ncsu.edu">http://www.ncsu.edu</a>	Retinal pigmentosa model	Research
	University of Missouri (R. Prather), United States	<a href="http://www.missouri.edu">http://www.missouri.edu</a>	Xenotransplantation	Research
Rabbits	Pharming, The Netherlands	<a href="http://www.pharming.com">www.pharming.com</a>	C1-inhibitor	Phase II clinical trials
	BioProtein Technologies, France	<a href="http://www.bioprotein.com">www.bioprotein.com</a>	Recombinant proteins	Research
	Therapeutic Human Proteins, United States	<a href="http://www.polyclonals.com">www.polyclonals.com</a>	Humanized polyclonal antibodies	Research
Chickens	Avigenics, United States	<a href="http://www.avigenics.com/">http://www.avigenics.com/</a>	Interferon	Clinical trials
	Origen Therapeutics, United States	<a href="http://www.origentherapeutics.com">www.origentherapeutics.com</a>	Recombinant proteins	Research
	Viragen, United States	<a href="http://www.viragen.com">www.viragen.com</a>	Interferon alpha and single chain antibody	Research
	Vivalis, France	<a href="http://www.vivalis.com">www.vivalis.com</a>	Recombinant proteins using cell-based system	Research

<sup>a</sup>Company 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<sup>®</sup>, est un signal fort pour les différents acteurs et en particulier pour les investisseurs. L'ATryn<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>. 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 transgénèse. 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.

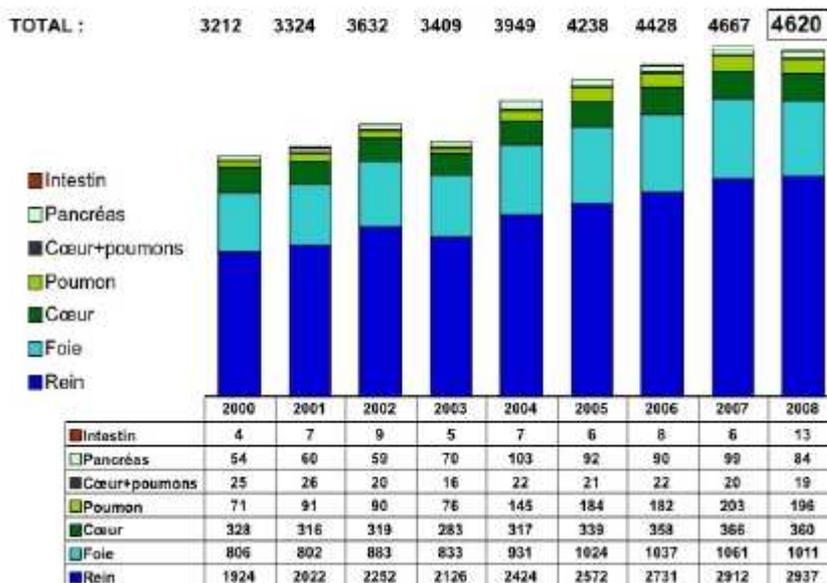
## B Les animaux donneurs d'organes

Les animaux modifiés génétiquement en vue de soigner l'homme ne comptent pas seulement les animaux bioréacteurs mais aussi les animaux donneurs d'organe. Cette partie tente de donner un aperçu des applications et implications des animaux transgéniques comme support de **xénogreffes**. Après un bref historique de l'usage des animaux en tant que donneurs d'organes, nous verrons pourquoi le porc a été choisi comme animal donneur. Ensuite, seront mis en parallèle, les barrières immunitaires à franchir pour la transplantation d'un organe animal chez l'Homme et les solutions proposées par animaux transgéniques. L'usage des xénogreffes est-il imminent ou est-ce une fiction ? Pour y répondre, les utilisations actuelles et potentielles des organes et des tissus animaux chez l'Homme sera passée en revue, sans oublier les questions d'acceptation ou non de cette pratique par les autorités et l'opinion publique.

### .B.1. Introduction : pourquoi la xénogreffe ?

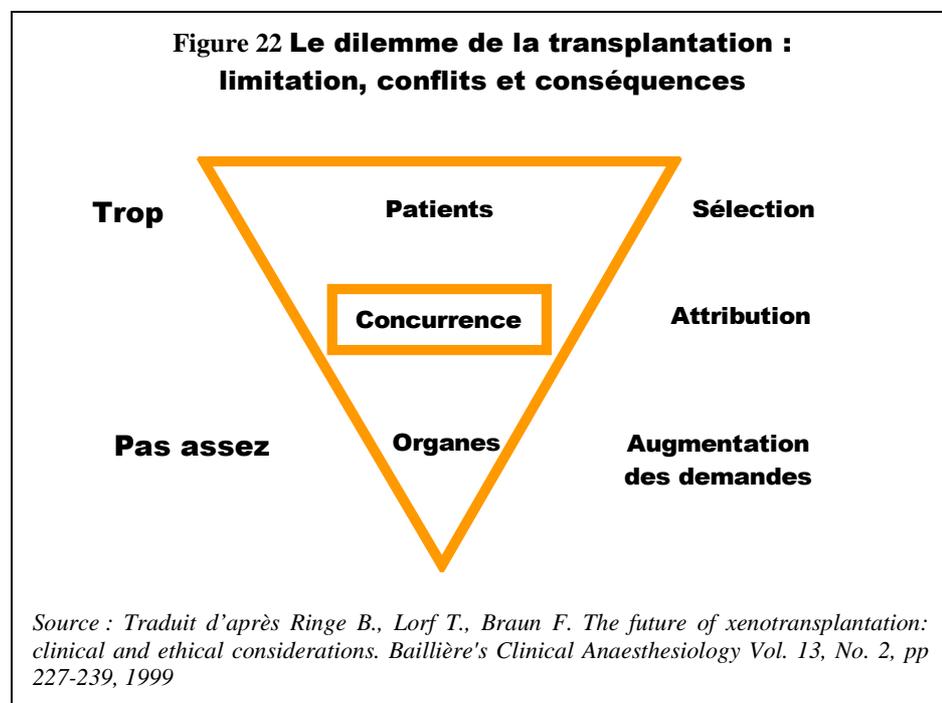
La transplantation de cellules, tissus, organes d'une espèce à une autre, connaît un regain d'intérêt depuis une vingtaine d'années. Appelée xénogreffe, cette transplantation fait l'objet de nombreuses recherches depuis les progrès encourageant des années 1990 sur les greffes d'organes humains (**allogreffe** : transplantation d'un individu différent à l'autre au sein d'une même espèce). Même si la greffe est envisagée lorsqu'aucun traitement ne marche pour se substituer à l'organe déficient, le nombre de personnes sur liste d'attente aux États-Unis est passé de 21 914 à 72 110 entre 1990 et 1999 pour seulement 6000 greffes réalisées dans cet intervalle. Le nombre croissant d'opérations (exemple sur la période 2000-2008 en France : Fig.21) a donc conduit à une pénurie de greffes disponibles et une augmentation du nombre de personnes sur liste d'attente d'organe transplantable. En 2008, en France, pour 13 698 personnes ayant besoin d'une greffe, 4 620 greffes ont été réalisées, 218 malades sont morts faute de greffe [3].

Figure 21 Greffe d'organe en France, évolution 2000-2008



Source : Agence de la biomédecine, Accueil > La greffe : hier, aujourd'hui et demain > Les chiffres clés Site Tout savoir sur le don d'organes et de tissus [en ligne]  
<http://www.dondoreanes.fr/Les-chiffres-cles.html> (page consultée le 12 novembre 2009)

De trop nombreux patients sont en concurrence pour un stock d'organes trop limité. (Fig.22). Pour pallier à cette pénurie d'organes, des campagnes de sensibilisation auprès du public tentent d'informer sur le don d'organe. Actuellement en France, 30% des prélèvements possibles sont refusés, dans près de 4 cas sur 10, le défunt a déclaré son opposition, pour les 6 autres cas, l'opposition vient de la famille souvent par manque d'informations sur le désir du défunt [3]. Ces campagnes n'ont pas permis d'augmenter significativement le nombre d'organes disponibles.



La xénotransplantation serait une solution offrant une réserve virtuellement illimitée de tissus à transplanter. Elle pourrait également être utilisée pour subvenir à de nouveaux besoins médicaux concernant le diabète, la maladie de **Parkinson** et d'**Alzheimer**.

## **.B.2. Historique**

Après les essais du 17<sup>ème</sup> siècle de transfusion de sang animal à l'Homme, le 19<sup>ème</sup> siècle engagea les premiers essais de transplantation de tissus animaux à l'Homme : En 1894, un adolescent de 15 ans reçu des fragments de pancréas ovin, sont citées également les greffes de peau de grenouille particulièrement populaires. Le 20<sup>ème</sup> siècle est le début des premières transplantations d'organes vascularisés. Les essais et erreurs basiques du début du siècle étaient dus à l'ignorance de l'immunologie du **rejet** de greffe. De 1920 à 1930, Serge Voronoff, chirurgien émigré russe travaillant à Paris, procéda à une centaine de transplantations de testicules de chimpanzés chez des hommes âgés ayant perdu leur libido [43,172]. La **xénotransplantation** est étudiée de manière rationnelle dès 1950 et retrouve un peu de succès avec la découverte des **immunosuppresseurs**. Quelques cas cliniques de xénotransplantation des années 1960 à 1990 sont présentés dans le tableau suivant (Tabl.12).

**Tableau 12 Histoire clinique de la xénotransplantation**

Year	Reziipients (Surgeon)	Xenotransplant	Survival
1910	1 (Unger)	monkey kidney	< 2 days
1913	1 (Schons tadt)		
1963/64	13 patients (Reemtsma)	chimpanzee (12), monkey (1) kidneys	1 case 9 months
1964	3 (Traeger)	chimpanzee kidney	< 49 days
1964	1 (Hume)	chimpanzee kidney	1 day
1964	6 (Starzl)	baboon kidney	< 60 days
1964	1 (Hitchcock)	baboon kidney	5 days
1964	1 (Hardy)	chimpanzee heart	2 hours
1965	2 (Goldsmith)	chimpanzee kidney	4 months
1966	1 (Starzl)	chimpanzee liver	< 1 day
1966	1 (Cortesini)	chimpanzee kidney	31 days
1969	2 (Starzl)	chimpanzee liver	< 9 days, < 2 days
1969	1 (Bertoye)	baboon liver	< 1 day
1969	1 (Marion)	chimpanzee heart	4 hrs
1970	1 (Leger)	baboon liver	3 days
1970	1 (Marion)	baboon liver	< 1 day
1971	1 (Poyet)	baboon liver	< 1 day
1971	1 Motin	baboon liver	3 days
1974	1 (Starzl)	chimpanzee liver	14 days
1977	1 (Barnard)	baboon heart	5 hrs
1977	1 (Barnard)	chimpanzee heart	4 days
1984	"baby Fae", born premature with malformed heart (Bailey)	baboon heart	20 days
1992	1 (Starzl)	baboon liver	70 days
1993	1 (Starzl)	baboon liver	26 days
1995	HIV-infected patient	baboon immune cells	cells died

Source : Conseil de l'Europe. Report on the state of the art in the field of xenotransplantation. CDBI/CDSP-XENO (2003) 1. D'après Office International des Epizooties (1998) Zoonoses transmissible from non-human primates. International Animal Health Code, 65-71 et d'après Taniguchi, S., Cooper, D. K. C. (1997) Clinical xenotransplantation - a brief review of the world experience. Xenotransplantation, Springer, 776-784

Dans la plupart des cas ce sont les chimpanzés et babouins qui sont utilisés comme animaux-source car des tentatives de xéno greffes d'autres mammifères (chèvre, mouton, porc) ont été l'objet de violents rejets. Les xénotransplantations échouent généralement dans les premières semaines. Un cas exceptionnel, rapporté par Reemtsma [228], présente une jeune femme qui a vécu neuf mois après transplantation d'un rein de chimpanzé ; elle décéda d'une maladie intercurrente non-identifiée, avec une fonction rénale normale. Une autre performance connue est la transplantation en 1984 d'un cœur de babouin qui est resté fonctionnel 20 jours chez un nouveau-né. Les attentes de la transplantation soulevèrent de nombreuses discussions éthiques et scientifiques. Dès les années 1990, la xénotransplantation pris un nouvel essor : des essais concernant les xénotransplantations de cellules (îlots pancréatiques porcines, neurones porcins) sont réalisés, des

perfusions extracorporelles pour pallier à une défaillance organique fulminante sont également étudiées (foie artificiel avec des hépatocytes porcins).

### **.B.3. Le porc, donneur d'organe**

#### **B.3.1 Pourquoi le porc a-t-il été choisi ?**

Compte tenu de leur proximité phylogénétique avec l'Homme, les primates non humains (chimpanzés) devraient être théoriquement les plus à même de faire office de donneur d'organe. La proximité d'espèce entre l'homme et le chimpanzé est de 99% d'homologie génomique. Cependant les grands singes appartiennent aux espèces en voie de disparition (annexe 1 de la convention de Washington) et les rares individus disponibles sont pour la recherche sur le SIDA ou l'**hépatite**. D'autres espèces de singes comme les babouins ou les macaques sont utilisées par défaut.

D'autres raisons font que les singes ne sont pas utilisés comme donneurs de xénogreffes. Les singes sont petits en comparaison avec un humain adulte, donc ne fournissent pas d'organes de taille valable pour l'Homme. Toutes les espèces se reproduisent très mal en captivité, ont de longues périodes de gestation avec peu de jeunes par portée. Du fait de leur proximité génétique avec l'Homme, les singes représentent un risque infectieux (annexe 2) trop important pour le malade, son entourage, voire même la société. De nombreuses bactéries pathogènes, virus (notamment les rétrovirus comme le SIDA), parasites et champignons décrits chez ces singes peuvent être transmissibles à l'Homme et parfois induire une maladie (annexe 3). De plus, l'utilisation de singes soulève de nombreuses objections d'un point de vue éthique. Son intérêt est donc limité au modèle préclinique s'il n'y a pas d'autre modèle alternatif.

Des investigations ont montré que le porc était une source d'organe plus adaptée. Son élevage est relativement aisé. Avec une croissance rapide, une gestation courte, des portées de grande taille, un coût peu élevé, le porc est un candidat intéressant. Sa taille et son anatomie sont proches de celles de l'homme, ses organes sont donc compatibles et adaptables à l'homme. Une lignée de porcs miniatures a été sélectionnée (120 à 140kg versus 450kg pour le porc domestique) pour obtenir des organes de taille appropriée [173]. Des animaux sans pathogène spécifique (environnement contrôlé, air filtré, nourriture stérilisée...) et des animaux transgéniques peuvent être produits. Le débat éthique concernant son utilisation a réuni le plus grand consensus.

*Note : On parle de zoonose lorsqu'une maladie animale est transmise par l'intermédiaire de la greffe et d'une zoonose pour une transmission d'un pathogène animal dans des circonstances naturelles.*

#### **B.3.2 Risque infectieux lié au porc**

Par rapport au singe, le porc représente un risque bien moins important, mais le risque infectieux spécifique à l'usage du porc ne doit pas être négligé. Là encore, le porc peut être porteur de bactéries, virus, parasites (**trichinellose**, **toxoplasmose**), potentiellement transmissibles à l'Homme lors d'une xénotransplantation (annexe 3). La production de porcs sans pathogène spécifique est possible et une attention particulière est requise concernant certains virus.

En effet, des rétrovirus endogènes porcins (Porcine Endogenous Retrovirus : PERV), ne peuvent pas être éliminés des tissus et il est difficile de créer des porcs indemnes de ce virus intégré dans le génome [99]. Les rétrovirus endogènes porcins ne sont pas pathogènes pour leur hôte, mais il n'est pas exclu qu'ils ne le soient pas pour l'Homme, d'autant plus que l'infection de cellules

humaines a été démontrée *in vitro* [211,177]. Le PERV a été recherché dans 160 échantillons de sang de personnes ayant été exposées à des tissus vivants de porc, tous les prélèvements étaient négatifs [210]. Aucune transmission de PERV ou de recombinaison de PERV avec un rétrovirus endogène humain n'a été mise en évidence par les études rétrospectives [64,210,292,323] ou les premières expérimentations cliniques, malgré une mise en évidence expérimentale *in vitro* [250]. Des études ont montré que l'inhibition de l'expression des PERV serait possible [65] et une lignée de mini-porcs indemne de certains PERV [204,223] existe déjà (lignée David Sachs' dd, obtenue par sélection). De la même façon que pour les E.S.T., on pourrait également créer une lignée où les séquences de PERV seraient délétées mais la tâche est énorme en regard du nombre élevé de copies intégrées dans la plupart des génomes de porc.

Deux autres virus, le **cytomégalovirus porcin** et le **parvovirus porcin**, théoriquement non transmissible à l'Homme, font l'objet de surveillance particulière et des lignées indemnes sont créées [43,172].

Le risque de transmission de l'agent des EST par xénotransplantation est limité car les porcs sont considérés comme résistants à l'infection [43]. De plus, les techniques de gestion des risques concernant l'élevage des porc destinés aux xéno greffes, prennent le maximum de précautions pour réduire tout risque potentiel.

Les risques infectieux potentiels des xénotransplantations comprennent :

- ✦ la transmission d'organismes pathogènes pour l'homme mais non pathogènes pour l'animal donneur.
- ✦ la transmission d'organismes non-pathogènes chez l'homme, mais qui le deviendraient chez un patient immunosupprimé ou immunodéprimé.
- ✦ La recombinaison ou réarrangement d'agents infectieux menant à de nouvelles souches infectieuses

Les risques de zoonoses peuvent être minimisés par un règlement strict d'élevage des animaux, des contrôles de procédures chirurgicales, un dépistage des animaux et des receveurs pour les infections connues.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), consciente des risques de zoonoses, a adopté en 2004 la résolution WHA57.18. Elle propose aux États membres de n'autoriser les xéno greffes que s'il existe un système de contrôle efficace par des autorités nationales de santé [291].

Le porc, en comparaison au singe (Tabl.13), paraît être l'animal « idéal » comme donneur d'organe. Cependant, ces nombreux avantages sont contrebalancés par quelques obstacles. Des incompatibilités physiologiques existent entre l'Homme et le Porc, nous en parlerons dans le paragraphe concernant la greffe d'organes (§ B.5.1). Une deuxième barrière se dresse : la barrière immunologique, les différents écueils et solutions seront abordés dans le paragraphe « les animaux transgéniques contre les barrières immunologiques de la xénotransplantation » (§ B.4.). Enfin l'attitude du malade et de la société vis-à-vis de cette technique n'est pas un obstacle à négliger, nous en discuterons en toute fin de partie.

**Tableau 13 Avantages et inconvénients des différents animaux source pour la xénotransplantation chez les humains**

	Porcs	Primates non-humains	
		Chimpanzés	Singes de l'ancien monde (Catarhiniens)
<b>Physiologie</b>	Similaire	Presque identique	Similaire
<b>Rejet de la transplantation</b>	Très fort	Pas très fort	Fort
<b>Gal <math>\alpha</math> 1,3 gal</b>	oui	non	non
<b>Protection animale</b>	oui	Oui très forte	oui
<b>Taille des organes</b>	similaire	similaire	Trop petite
<b>Posture</b>	Horizontales	Debout	Debout
<b>Temps de gestation</b>	100 jours	251-289 jours	170-193 jours
<b>Progéniture (nombre)</b>	10-18	1, rarement 2	1, rarement 2
<b>Disponibilité</b>	illimitée	aucune	Limitée
<b>Coûts</b>	Bas	Très élevés	Elevés
<b>Sans Pathogène Spécifique</b>	Possible	Possible dans le futur à des coûts très élevés	Possible dans le futur à des coûts élevés
<b>Clonage</b>	Possible	Si jamais c'est possible... dans un futur lointain	Possible dans un futur lointain

Source :Traduit d'après Conseil de l'Europe. Report on the state of the art in the field of xenotransplantation. CDBI/CDSP-XENO (2003) 1

## .B.4. Les animaux transgéniques contre les barrières immunologiques de la xénotransplantation

Les mécanismes immunitaires en jeu lors de xénotransplantation sont différents selon la proximité entre les espèces. Cette différence mène à un classement des xénotransplantation.

➡ Lors de transplantation du singe à l'homme ou du hamster au rat, la greffe sera rejetée de manière aiguë en plusieurs jours étant donné la faible présence dans le sérum du receveur d'anticorps naturels (préformés) contre les antigènes du donneur : on parle de xénotransplantation concordante.

➡ Lorsque des anticorps naturels contre les antigènes du donneur sont présents dans le sérum du receveur, on parle de xénotransplantation discordante. C'est le cas de transplantation du porc à l'homme ou du porc au singe, le rejet survient généralement dans les minutes suivant la revascularisation de la greffe (**rejet suraigu**).

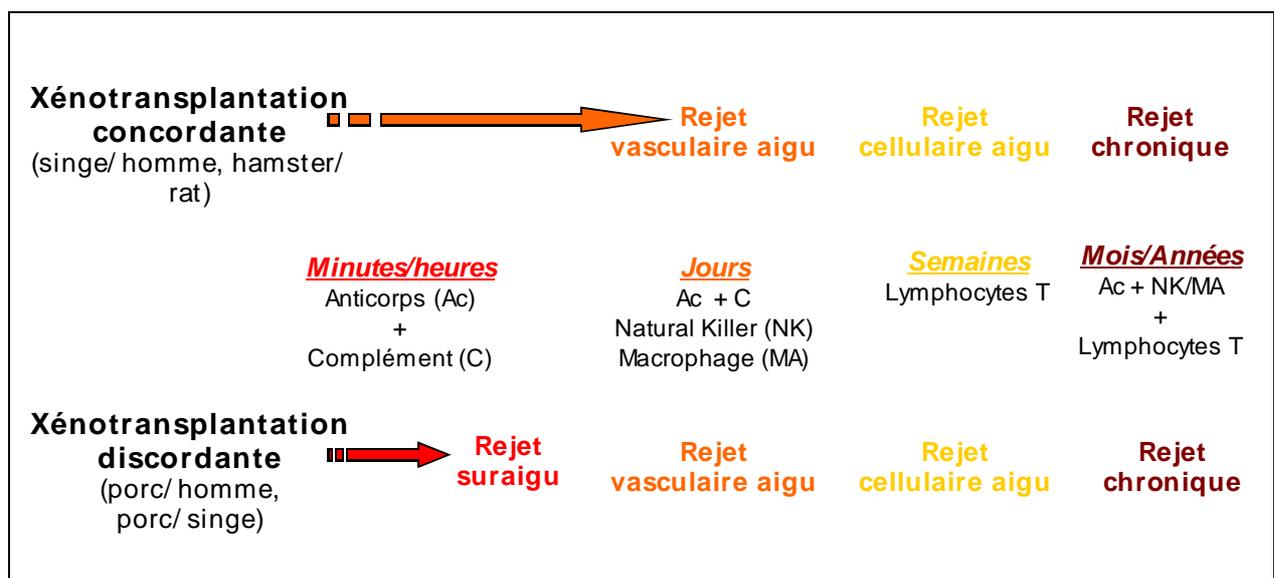
Il y a deux types de réponses immunitaires mises en jeu dans ces réactions de rejet :

-une réponse humorale innée, des anticorps préformés existent sans que l'individu aie été en contact avec l'antigène auparavant.

-une réponse humorale acquise, résultant d'une exposition préalable à l'antigène (lors de greffe concordante).

La xénotransplantation discordante doit faire face aux deux réponses humorales : acquise et innée. Ces réponses immunitaires engendrent des réactions de rejet (Fig.23) qui sont autant d'étapes à franchir pour la réussite de la xénotransplantation. La phase initiale, nommée **rejet suraigu**, a lieu dans les minutes ou heures suivant la transplantation. Si cette réaction est évitée, un **rejet vasculaire aigu** est observé dans les jours suivants. Viennent ensuite le **rejet cellulaire aigu** dû à une composante immunitaire cellulaire, puis le **rejet chronique** plus tardivement. La résolution des problèmes engendrés par ces barrières immunologiques est une priorité pour pouvoir mettre en place une xéno greffe.

Figure 23 **Obstacles immunologiques de la xénotransplantation**



## B.4.1 Le rejet suraigu

### Obstacles

Le rejet suraigu a lieu dans les minutes et heures suivant la transplantation, trois acteurs sont impliqués [43,172,173,234] : les anticorps naturels, l'**endothélium** porcin (paroi des vaisseaux sanguins), le complément.

Les anticorps impliqués sont essentiellement des immunoglobulines de type M (IgM), les IgM se lient à des substances étrangères (par exemple une bactérie) et aident à leur destruction. Ces anticorps préformés se sont développés dans les premières semaines de vie d'un individu. En réponse à la colonisation bactérienne du tractus digestif, l'enfant et le jeune singe, développent des anticorps naturels contre l'épitope galactosyl galactose  $\alpha$  (1-3) galactose (Gal) présents sur des nombreux virus, parasites et bactéries. 1% des anticorps circulants humains [212] sont dirigés contre les épitopes Gal. Malheureusement, ces anticorps naturels anti-Gal réagissent avec les épitopes Gal présents sur les cellules de l'endothélium porcin. En effet, l'épitope Gal est exprimé à la surface des cellules de tous les mammifères à l'exception des humains, primates et singes de l'ancien monde (Tabl.14). Cet épitope, synthétisé par l' $\alpha$ 1,3-galactosyl transférase ( $\alpha$ 1,3GT) est donc reconnu comme étranger par le receveur humain et est ainsi responsable de la fixation de près de 90% de tous les anticorps anti-porcins.

**Tableau 14 Distribution de l'épitope galactosyl dans le règne animal**

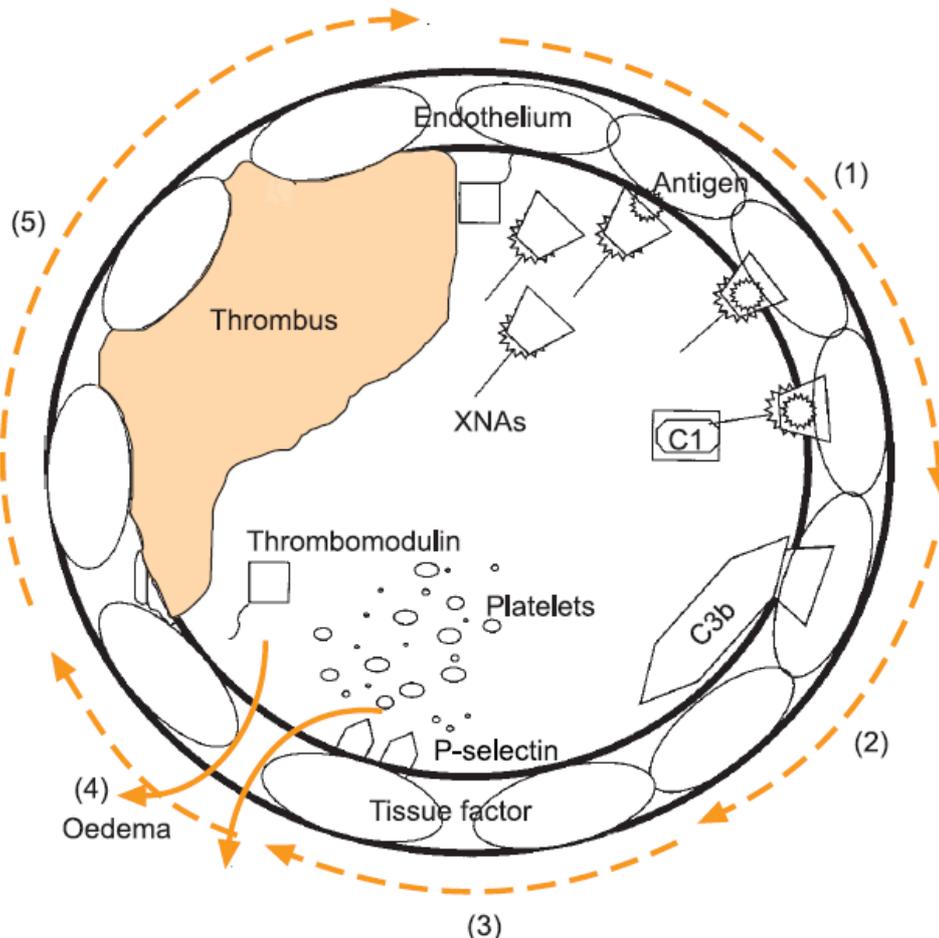
<b>Primates</b>	<b>Homme</b>	<b>Absence d'épitopes Gal</b> <b>Présence d'anticorps anti-Gal</b>	
	<b>Grands singes</b> Chimpanzé et Bonobo 5 MA Gorille 7 MA Orang-outan 19 MA Gibbon 20 MA		
	<b>Singes du Vieux Continent</b> (Catarhiniens) 20-30 MA Macaque, Babouin		<b>Inactivation de l'<math>\alpha</math> (1-3) GT</b>
	<b>Singes du Nouveau Monde</b> (Platyrhiniens) 30-40 MA <b>Prosimiens</b> (Lémuriens) 60-70 MA		
<b>Mammifères</b>	Porcs Rongeurs	<b>Présence d'épitopes Gal</b> <b>Pas d'anticorps anti-Gal</b>	
<b>Vertébrés non mammifères</b>	Crocodiles Serpents	<b>Présence d'<math>\alpha</math> (1-3) GT</b>	
	Batraciens		
	Oiseaux		

MA: millions d'années Il y a environ 35 millions d'années, après la séparation des continents, un facteur évolutif (vraisemblablement un agent infectieux) endémique à l'Afrique et à l'Asie a permis la sélection de primates capables de produire de hauts titres d'anticorps anti-Gal (Galili et al., 1987).

Source : Dehoux J.-P., Gianello P. *Xénotransplantation. Ann. Méd. Vét.*, 2003, 147, 147-157

La fixation anticorps/antigène (anti Gal/Gal) active la voie classique du complément. Un complexe d'attaque membranaire (CAM) se forme, les cellules endothéliales porcines se rétractent entraînant l'adhésion et l'activation des plaquettes (Fig.24). Ce rejet suraigu se concrétise macroscopiquement par des thromboses vasculaires, de la congestion, des ruptures de l'endothélium vasculaire, des hémorragies interstitielles et de l'œdème (Photos 17 et 18). La fuite de sang et de liquide est suivie par la nécrose des cellules endothéliales.

**Figure 24 Physiopathologie du rejet suraigu**



- (1) Activation des anticorps naturels xénoréactifs du receveur (XNAs) et liaison aux antigènes du donneur (c.à.d. gal $\alpha$ (1-3)gal) ;
- (2) Activation directe du complément par l'endothélium ;
- (3) Perte de l'intégrité endothéliale, exposition aux facteurs tissulaires, expression de la P-sélectine, attraction des plaquettes ;
- (4) Œdème interstitiel et perte des inhibiteurs de coagulation ;
- (5) Formation de thrombus et occlusion vasculaire.

Source : Ringe B., Lorf T., Braun F. *The future of xenotransplantation: clinical and ethical considerations. Baillière's Clinical Anaesthesiology* Vol. 13, No. 2, pp 227-239, 1999

## Prévention

Aucun médicament immunosuppresseur, seul ou combiné, utilisé avec efficacité lors des allotransplantation humaines, ne peut prévenir l'apparition du rejet suraigu. Des solutions ont été mises en place et peuvent se classer en deux groupes distincts :

### Modifications chez le receveur :

- ✦ -Élimination des anticorps préformés anti-porcins par plasmaphérèse [324], par colonne d'immunoabsorption, par utilisation d'anticorps monoclonaux ou par mise en contact avec des résidus saccharidiques.
- ✦ -Inhibition de l'activité du complément par injection d'inhibiteurs solubles comme le facteur du venin du cobra [164], le récepteur soluble du complément (CR1) [261] ou le sulfate de dextran.

### Modifications chez le donneur grâce aux techniques de transgénèse :

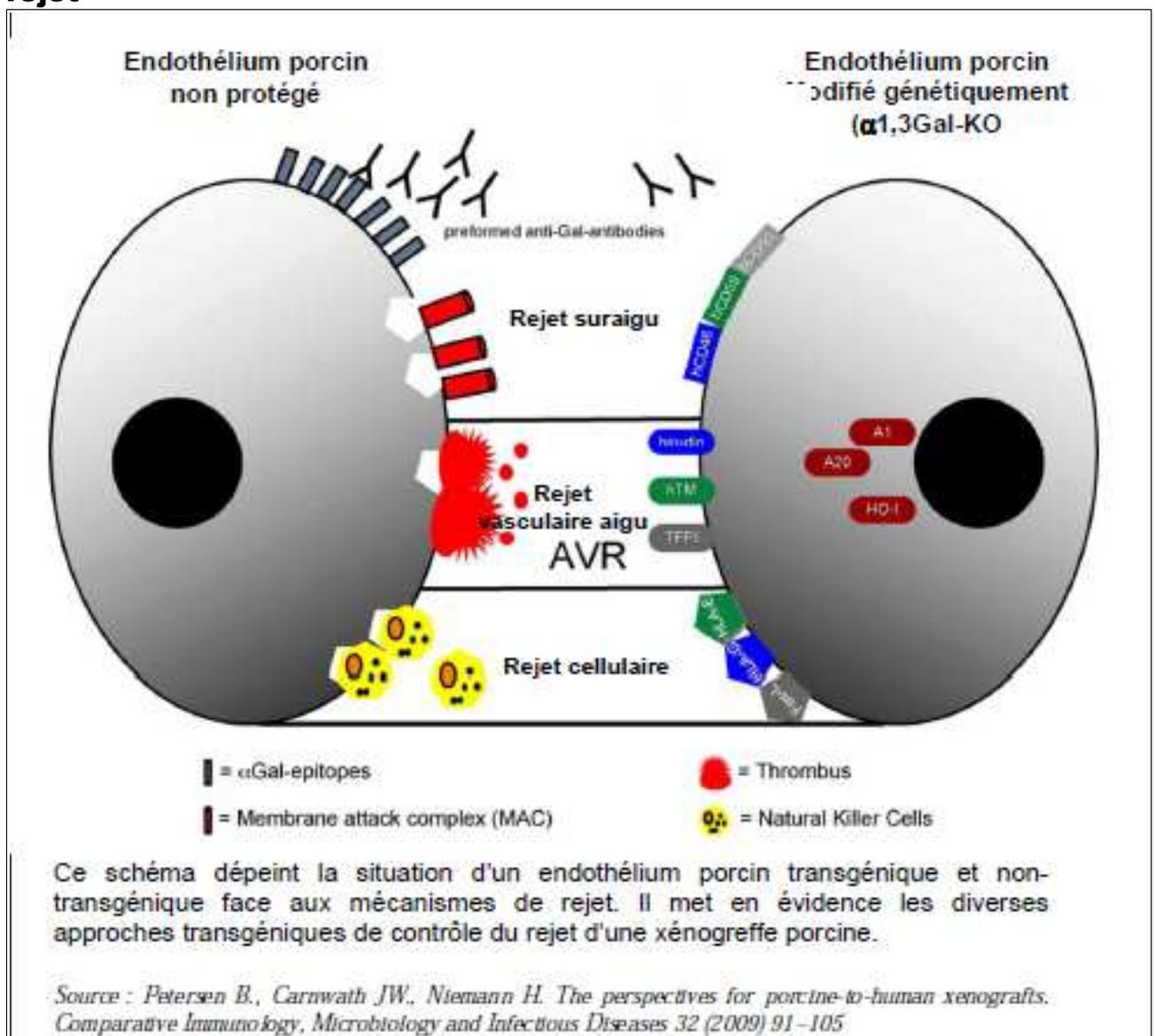
- ✦ -Porc transgénique exprimant des protéines régulatrices du complément ❶
- ✦ -Porc transgénique exprimant le transgène de l' $\alpha$ -1,3fucosyl transférase humaines (H-transférase)
- ✦ -Porc transgénique avec invalidation de l'expression du gène de l' $\alpha$ 1,3GT ❷

❶ La possibilité de modifier génétiquement les animaux donneurs d'organe grâce à la transgénèse a tout d'abord permis d'obtenir des porcs transgéniques dont les organes expriment des protéines régulatrices du complément humain. A la surface de la plupart des cellules de l'organisme, des protéines comme le CD35 (CR1), CD46 (MCP pour membrane cofactor protein), CD55 (DAF pour decay accelerating factor), CD59 (protectin), HFR (homologous restriction factor) inhibent de façon spécifique d'espèce le complément **autologue** [56,212]. Des porcs transgéniques exprimant les protéines humaines (Fig.25) CD55 (hDAF) [32], hCD46 [1] ou hCD59 [30,202] ont été créés et testés. L'expression des hCD55 et hCD46 avec ou sans hCD59, abroge complètement le rejet suraigu des organes vascularisés dans le modèle porc-primate malgré la présence de titres élevés en anticorps anti-Gal. Cet effet thérapeutique est effectif lorsque le porc exprime ces inhibiteurs à des concentrations supra physiologiques. Il reste à déterminer quelle combinaison d'inhibiteurs est plus efficace, à quels niveaux d'expression. Cependant des inconvénients de cette technique sont à envisager. Les porcs transgéniques ainsi créés possèdent les récepteurs à certains virus humains dont la rougeole [26,261]; les porcs pourraient donc théoriquement être susceptibles à ces agents. On pourrait alors préférer utiliser la surexpression des CD55 et CD46 de porc qui se sont avérés également actifs contre le complément humain [191].

❷ Une autre approche pour éviter le rejet suraigu, est ciblée sur l'épitope Gal.

Des porcs transgéniques surexpriment la H-transférase, enzyme qui entre en compétition avec la  $\alpha$ 1,3GT pour un même substrat. Ainsi, les niveaux d'expression des épitopes Gal décroissent significativement. Malheureusement, les niveaux résiduels d'épitopes Gal restent suffisants pour déclencher une réponse immunitaire [212]. Une autre solution a alors été imaginée : cibler directement le gène de l' $\alpha$ 1,3GT. Des porcs transgéniques (par clonage somatique) où l' $\alpha$ 1,3GT est inactivée (porcs Gal-KO, Fig.25), présentent tout de même un pourcentage résiduel d'épitopes Gal de 1 à 2% [263]. La présence d'antigènes Gal chez les porcs Gal-KO a démontré qu'une autre enzyme était impliquée dans la production de cet épitope : l'isoglobotrihexosylcéramide synthéase (iGb3S) ou  $\alpha$ 1,3 galactosyltransférase 2 (A3galt2) a été découverte chez la souris mais il n'est pas certain qu'elle soit active chez le porc [212]. L'élimination complète de l'antigène Gal n'est donc pas simple.

**Figure 25 Schéma de l'endothélium porcine lors de la réponse primaire de rejet**



En dépit du taux résiduel d'expression de l'antigène Gal, la xénotransplantation chez le babouin, de reins et cœurs provenant de porcs Gal-KO donne des résultats encourageants avec une augmentation de la survie de l'organe transplanté, sans signe de rejet suraigu (jusqu'à 179 jours pour le cœur et 83 jours pour le rein [155,325]). L'exploration des barrières immunologiques de la xénotransplantation peut désormais aller au-delà de rejet suraigu. Des cœurs de porcs Gal-KO transplantés à des babouins ont pu ainsi fonctionner 2 à 6 mois pour finalement succomber à une **microangiopathie thrombotique** [155,299].

Une microangiopathie thrombotique a également été observée sur des cœurs transplantés issus de porcs transgéniques pour le hCD55 [212] en combinaison avec un régime immunosuppresseur et une perfusion intraveineuse continue de Gal conjugué pour absorber les anticorps anti-Gal. Cette réaction évoque l'induction d'anticorps dirigés contre d'autres antigènes que Gal et met en jeu les réactions de rejet vasculaire aigu.

**Photo 17 Photographie d'un cœur de porc transplanté au niveau du cou d'un babouin non traité juste avant que les anastomoses artérielles et veineuses soit ouvertes.**



© Source : Joren C. Madsen and Readier Hoerbelt. Xenotransplantation. Book Chapter; Contemporary Cardiology, Surgical Management of Congestive Heart Failure

**Photo 18 Photographie du même cœur de porc, prise 10 min après le rétablissement de la circulation sanguine, montrant l'apparence œdémateuse et cyanosée typique du rejet suraigu.**



© Source : Joren C. Madsen and Readier Hoerbelt. Xenotransplantation. Book Chapter; Contemporary Cardiology, Surgical Management of Congestive Heart Failure

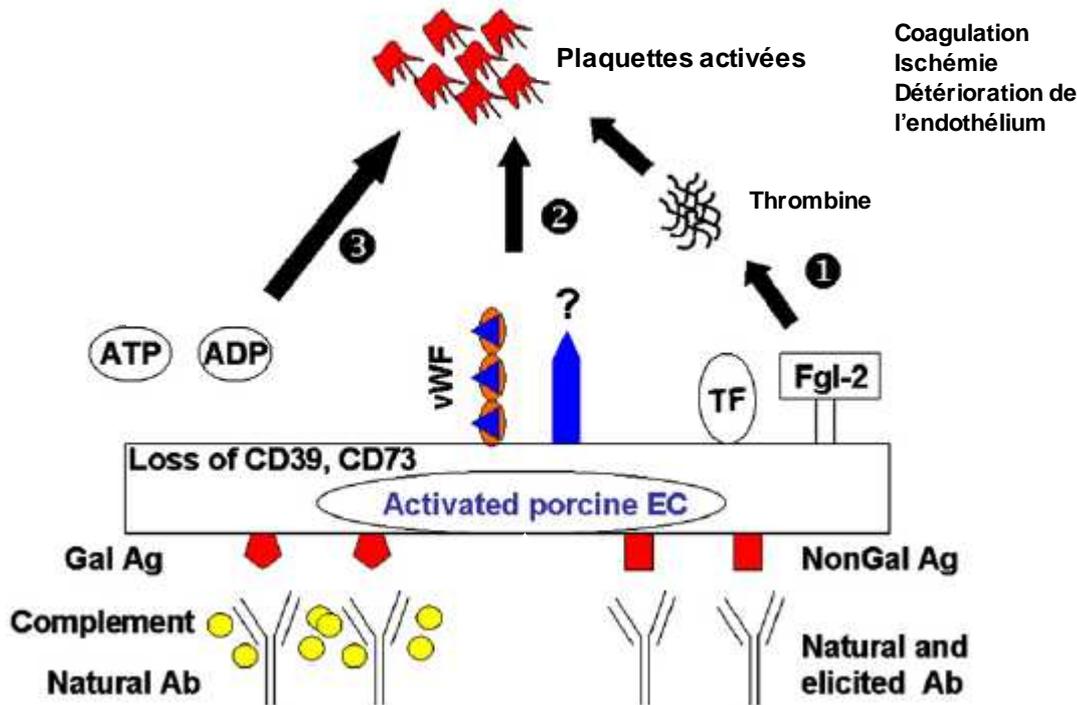
### B.4.2 Rejet vasculaire aigu

Si le rejet suraigu est évité, la greffe subit un rejet retardé : le rejet vasculaire aigu, au bout de quelques jours à quelques semaines. On parle de rejet vasculaire parce que les premiers anticorps formés par le receveur sont dirigés contre les cellules endothéliales (Fig.26). Les mécanismes immunitaires concernés dans ce type de rejet ne sont pas entièrement élucidés (action des Natural Killers, des macrophages, neutrophiles, lymphocytes). Des antigènes xénogéniques nouvellement formés au contact du xéno greffon (Immunoglobulines de type G IgG) reconnaissent les antigènes porcins, notamment l'antigène Gal. On observe une forte augmentation d'IgG [60] xénoréactives. La fixation de ces anticorps acquis sur l'endothélium porcine, entraîne des phénomènes de cytotoxicité cellulaire médiée par ces anticorps (ADCC). Le complément et les Natural Killers (NK) sont activés, menant à une destruction de l'endothélium [248]. La fixation des anticorps active également les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales vont alors synthétiser des cytokines pro-inflammatoires (interleukines 1 et 8), des molécules d'adhérence comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), la sélectine E, qui attirent les cellules immunitaires. Enfin, la perte de thrombomoduline crée un environnement procoagulant. En effet, durant la transplantation, l'inévitable ischémie de reperfusion génère des molécules qui endommagent l'environnement vasculaire. Ces dommages s'installent une fois le rejet suraigu évité, entraînant de nombreux changements dans le système de coagulation [212]. Le rejet vasculaire aigu mène à des thromboses vasculaires avec extravasation sanguine, œdème interstitiel et nécrose.

Actuellement, ce processus représente le principal obstacle à la xénotransplantation clinique d'un organe vascularisé de porc. Même lorsque des porcs Gal-KO sont utilisés, les xéno greffes se soldent par une microangiopathie thrombotique sans qu'il n'y ait nécessairement d'autres signes de rejet vasculaire aigu [299]. La médiation de la thrombose par les anticorps est évidente mais des incompatibilités moléculaires spécifiques peuvent permettre l'amplification du processus et son extension au-delà du site de la xéno greffe. Voici deux exemples de ces incompatibilités :

- le facteur de von Willerbrand (vWF) porcine, qui contrairement à son équivalent humain, se lie aux plaquettes humaines et les active en absence de stress déclencheur [180,255]
- la capacité réduite du complexe thrombomoduline porcine-thrombine humaine à activer la protéine C humaine (anticoagulante par inactivation des facteurs Va et VIIIa) [236].

**Figure 26 Diagramme des changements de procoagulation des cellules endothéliales (EC) porcines et l'activation des plaquettes lors de la xénotransplantation d'un organe de porc à un primate**



① Les cellules endothéliales porcines sont activées par les anticorps xénoréactifs (avec ou sans implication du complément) pour exprimer le Facteur Tissulaire et déclencher la formation de thrombine qui est un puissant activateur des plaquettes. Fgl-2 clive la prothrombine pour parvenir à la formation de thrombine.

② Des ligands (vWF et d'autres désignés par ?) ses cellules endothéliales porcines activent les récepteurs des plaquettes probablement indépendamment de la réponse immunitaire humorale.

③ Les cellules endothéliales activées n'expriment plus CD39 et CD73 et sont incapables de catalyser l'ADP en adénosine ce qui active donc les plaquettes.

Ag: antigène, Ab: anticorps

Source : Lin C.C., Cooper D.K.C., Dorling A. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transplant Immunology* 21 (2000) 75-80

De nombreux anticoagulants ont été testés sur les modèles porc-primate (antithrombine humaine recombinante, héparine, aspirine, warfarine) sans réussir à obtenir des niveaux d'anticoagulants nécessaires à la surface de l'endothélium [212]. Le risque d'hémorragie associé à un traitement systémique d'anticoagulants étant non-négligeable, l'appel à la transgénèse est une fois de plus envisagé. L'expression supraphysiologique des régulateurs de la thrombose chez le donneur paraît théoriquement plus sûre. Les facteurs humains exprimés jusqu'à présent par transgénèse sont [56] :

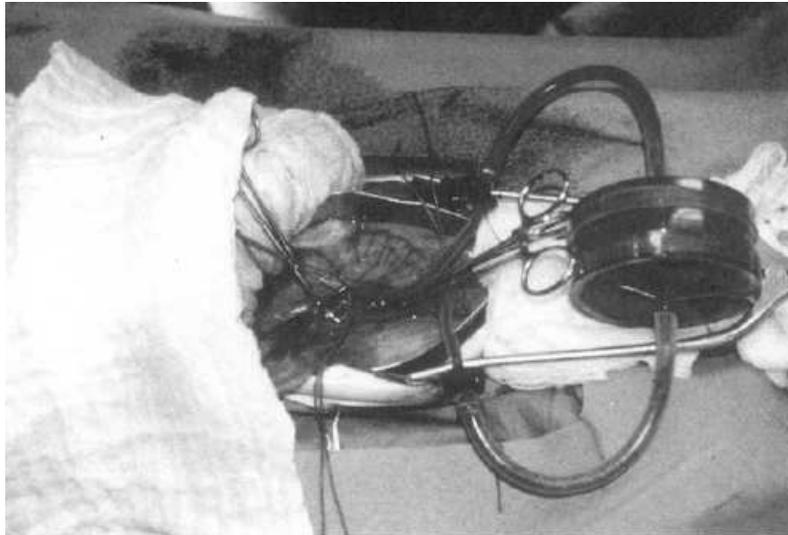
- CD39 (ecto-ADPase) : cible les plaquettes et possède une activité anti-inflammatoire
- la thrombomoduline : exprimée sur les cellules endothéliales, nécessaire à la génération de la protéine C qui est anticoagulante.
- le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) : nécessaire à la génération de la protéine C qui est anticoagulante.

- L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) : cible le facteur tissulaire qui est initiateur de la voie de coagulation extrinsèque.
- L'hirudine (antithrombine originaire de la sangsue) : inhibiteur direct de la thrombine qui est une molécule procoagulante.

Les tests sur les rongeurs n'ont pas encore donné toutes les réponses pour pouvoir passer à la transgénèse de ces facteurs chez le porc.

Les aspects variés du rejet vasculaire aigu peuvent être retardés par une application continue et agressive de déplétion des anticorps xénoréactifs (par plasmaphérèse ou injection de polymères Gal, Photo 19) en association avec plusieurs immunosuppresseurs (ciclosporine A, corticostéroïdes, cyclophosphamide, mycophénolate, mofétil). A ce jour, les différents traitements visant à surmonter le rejet vasculaire aigu lors de xénotransplantation, ont eu un effet limité. En 2005, la durée de vie n'était pas supérieure à 3 mois, les animaux subissaient le rejet ou mouraient de complications infectieuses dues à l'immunosuppression [259].

**Photo 19 Photographie de la méthode d'adsorption des anticorps naturels par colonne immunoaffine chez les primates.**



Le sang entre dans la colonne via une cannules connectée à l'aorte. La colonne d'oglisaccharides Gal, fixe les anticorps anti-Gal circulants. Le sang retourne à l'animal par la cannule connectée à la veine cave inférieure.

© Source : Joren C. Madsen and Readier Hoerbelt. *Xenotransplantation. Book Chapter; Contemporary Cardiology, Surgical Management of Congestive Heart Failure*

### **B.4.3 Le rejet cellulaire**

Alors que la composante cellulaire du rejet vasculaire aigu concernait plutôt la réponse cellulaire innée, le rejet cellulaire implique une réponse acquise dont les principaux acteurs sont les lymphocytes T. Le rejet cellulaire est le type de rejet observé le plus fréquemment dans les modèles expérimentaux d'allotransplantation. Les lymphocytes T reconnaissent directement ou indirectement les antigènes. La reconnaissance directe se fait par l'apprêtement des antigènes étrangers par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) du donneur aux lymphocytes T du receveur. La reconnaissance indirecte se fait quant à elle par l'apprêtement et la présentation de l'antigène par les CPA du receveur. Il existe une compatibilité moléculaire suffisante entre les CPA porcines et les lymphocytes T humains pour créer une synapse immunologique efficace permettant au rejet de survenir par la voie directe[259]. De nombreuses études ont mis en évidence que la

réponse cellulaire lymphocytaire xénogénique semble être plus importante que la réponse allogénique [61]. Plusieurs raisons y concourent : le nombre d'antigènes présentés pourrait être plus important en xénotransplantation, la présentation indirecte semble favorisée, les mécanismes régulateurs via les cytokines pourraient être moins efficaces.

Macrophages, NK et neutrophiles jouent aussi un rôle actif dans le rejet cellulaire xénogénique [43,173,212,259].

La question est de savoir si la prévention du rejet xénogénique cellulaire exigera des stratégies thérapeutiques autres que celles utilisées avec succès en allotransplantation (agents immunosuppresseurs non spécifiques). La combinaison de la cyclosporine A à d'autres molécules immunosuppressives a récemment conduit à la prolongation de la survie de reins de porcs après transplantation à des primates [46]. Des groupes de chercheurs travaillent sur des porcs transgéniques exprimant des gènes modulateurs des lymphocytes T comme le HLA-E (human leukocyte antigen E) et le PDL1-L (Programmed Death Ligand ou CD274 ou B7-H1) dans l'objectif de diminuer les doses d'immunosuppresseurs. Une autre solution serait apportée par l'expression du TRAIL humain (human tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand) par des porcs transgéniques pour induire l'apoptose des lymphocytes T [148].

Beaucoup de scientifiques et médecins pensent que le succès des xénotransplantations dépendra du développement des moyens d'induction de tolérance au greffon. Nous verrons plus loin trois approches expérimentales pour induire une tolérance des lymphocytes T envers la xéno greffe.

#### **B.4.4 Rejet chronique**

Le rejet chronique de la greffe est très mal connu en allotransplantation et les données sont quasi non-existantes en xénotransplantation vu les durées de survie des xéno greffes [43,173]. Le rejet chronique survient dans les mois voire années suivant la greffe. Les réactions inflammatoires persistantes et les proliférations concentriques de l'intima des vaisseaux artériels, conduisent finalement à l'**athérosclérose** de la greffe.

#### **B.4.5 Induction de la tolérance au greffon**

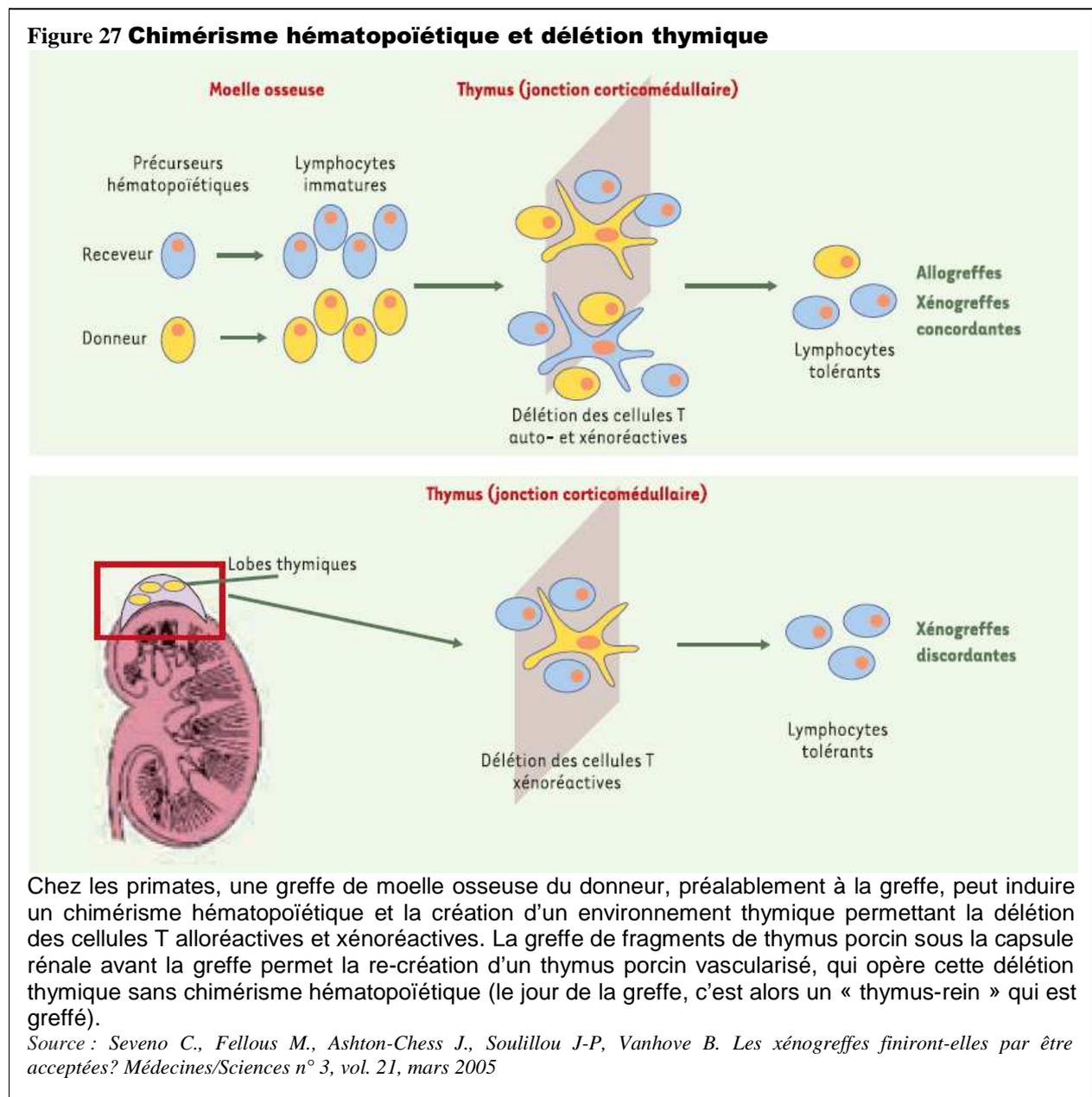
En allotransplantation, des protocoles d'induction de tolérance sont mis au point pour réduire les risques infectieux et l'incidence des cancers dus à l'immunosuppression réalisée. Pour les xénotransplantations, les traitements immunitaires requis actuellement sont incompatibles avec la clinique humaine. Cette approche a donc un grand intérêt. Deux approches ont eu une certaine réussite chez les modèles grands animaux en induisant une tolérance.

#### ***Création d'un chimérisme [47,173,242] Fig.27***

Une greffe de moelle osseuse (après irradiation ou immunosuppression par médicaments chez le greffé) crée un chimérisme hématopoïétique. Les cellules de la moelle du donneur se mélangent à la moelle du receveur et les deux populations peuvent arriver à un état d'équilibre, aboutissant à un état de tolérance réciproque. Cette technique a été appliquée avec succès pour des greffes allogéniques de rein [143]. Concernant les xéno greffes, le problème est plus complexe. La création d'un chimérisme permet la survie prolongée de greffes concordantes (babouin sur macaque) [16] mais pas des greffes discordantes (porc sur babouin) [150].

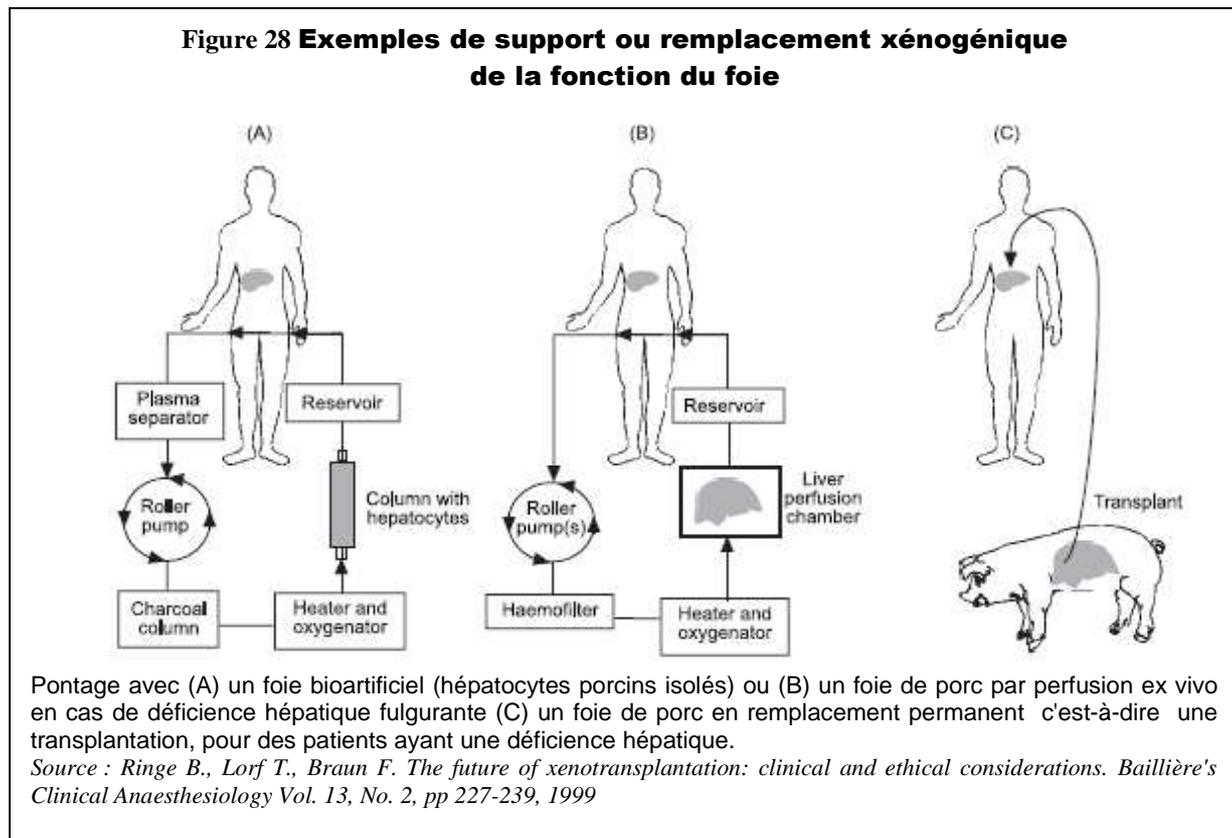
## Greffe de fragments thymiques du donneur[47,173,242] (Fig.27)

La délétion de lymphocytes T xénoréactifs peut être obtenue en greffant des cellules thymiques du donneur. Les essais ont été réalisés pour des greffes de rein. Plusieurs semaines avant le prélèvement de rein, le donneur subit une autogreffe des ses cellules thymiques sous la capsule d'un de ses reins. Un « thymus-rein » est ainsi obtenu pour être transplanté et ainsi induire lui-même sa tolérance chez le receveur. Cette opération est associée à un taux de survie plus important des xéngreffes discordantes porc-primare [325]. Les prémices de l'induction de tolérance ne présagent pas encore de leur possible utilisation en vue de transplanter un xéngreffon chez l'Homme.



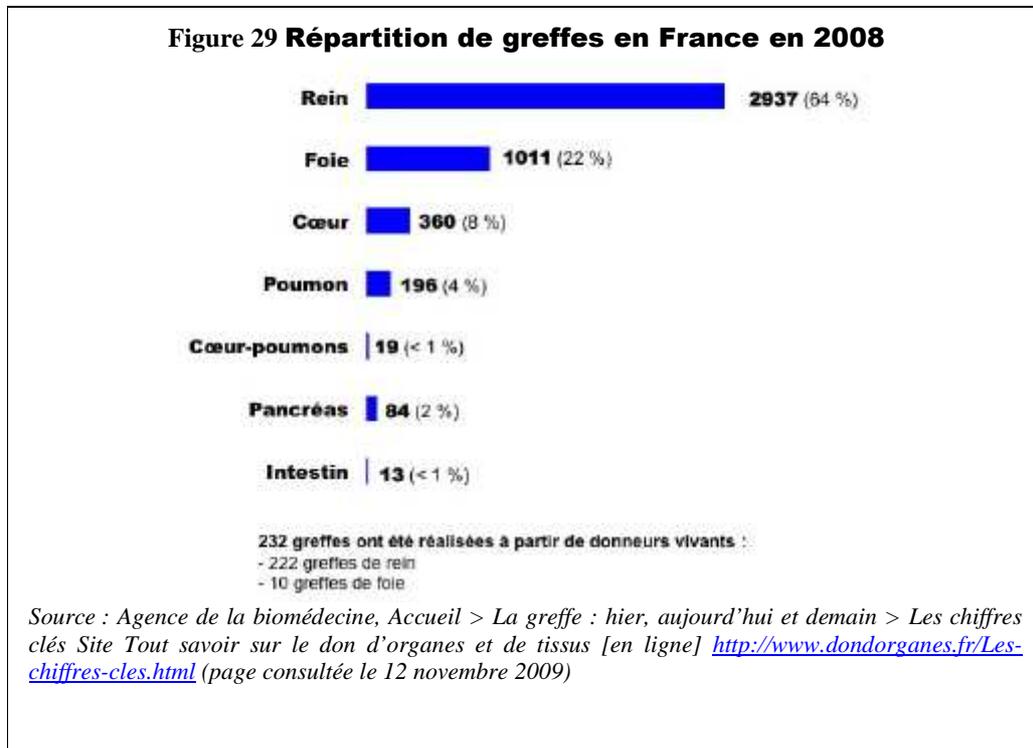
## **.B.5. Techniques de xénotransplantation**

Les transplantations d'organes sont nécessaires lorsque la défaillance d'un organe met en jeu la survie de la personne. La première idée pour pallier à la pénurie d'organes humains disponibles est la xéno greffe d'organe. Cependant la xénotransplantation d'un organe entier a de nombreuses limites. A défaut de pouvoir être implanté le dans le corps humain, le xéno greffon pourrait être utilisé extra-corporellement, temporairement pour remplir les fonctions de l'organe défaillant. On peut parler ici de greffe hétérotopique, c'est-à-dire que l'organe greffé n'est pas à sa place anatomique, par opposition à la greffe orthotopique. Cette idée a mené les chercheurs à se passer de l'organe entier et d'envisager l'utilisation de simples cellules xénogéniques. Un état des lieux sur ces différentes possibilités (Fig.28) est proposé.



### B.5.1 Xénotransplantation d'organes

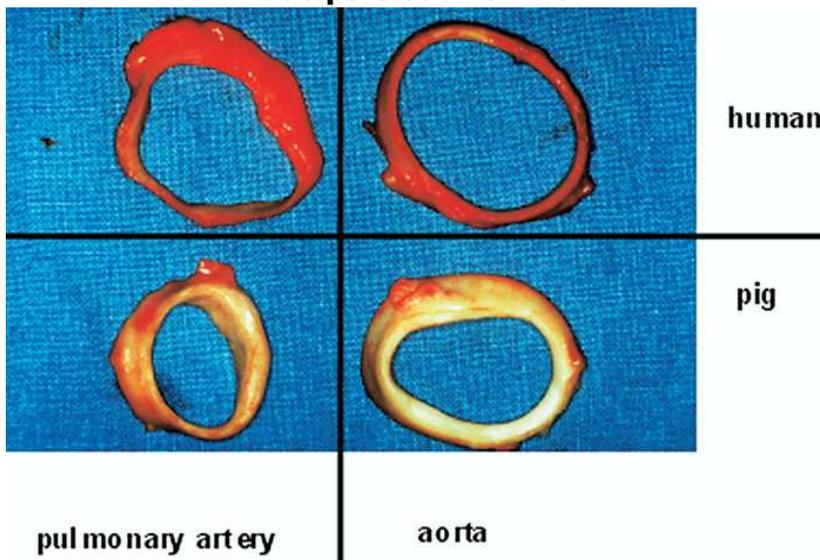
Comme le montre le graphique ci-dessous (Fig.29), les allogreffes humaines les plus pratiquées concernent le rein, le foie et le cœur. Les limites immunologiques des xéno-greffes ayant été abordées, voici donc une revue des possibilités physiologiques et anatomiques de xénotransplantation de ces trois organes.



#### *Xénotransplantation de cœur*

Le porc a un système circulatoire proche de celui de l'Homme mais avec quelques différences anatomiques. De part leur position horizontale, les porcs n'ont pas un cœur orienté de la même façon que l'Homme dans la cavité thoracique. De même, les diamètres respectifs des vaisseaux porcins et humains à anastomoser, ne doivent pas trop différer pour des raisons techniques (Photo 20). Des mesures échographiques sur des lignées de mini-porcs ont exploré ces questions et montré une compatibilité anatomique et fonctionnelle possible avec les impératifs hémodynamique humains [173]. Un cœur d'un porc pourrait pomper le volume nécessaire à l'homme pour une station debout. Ainsi, des techniques chirurgicales sont développées pour pouvoir raccorder un cœur de porc à une anatomie humaine [275].

**Photo 20 Segments d'aorte et d'artère pulmonaire de porc et d'homme**



Épaisseur plus importante de la paroi aortique porcine, diamètre plus faible de l'artère pulmonaire porcine.

© Source : Siepe M., Martin J., Sarai K., Ihling C., Sommer P., M.D., Beyersdorf F. *Anatomical Study on the Surgical Technique Used for Xenotransplantation: Porcine Hearts Into Humans. Journal of Surgical Research* 143, 211–215 (2007)

Des études dans lesquelles des cœurs de porc ont été greffés à des primates, suggèrent qu'ils fonctionnent suffisamment pour soutenir la fonction cardiaque humaine [252].

En 1990, un cœur de porc a été greffé à un patient dans l'attente qu'un allotransplant soit disponible [54]. Le sang du patient a été passé extra-corporellement à travers un cœur de porc pour réduire les concentrations d'anticorps anti-porc. Le patient est mort 24h après la transplantation suite au rejet du xéno greffon.

Les récents résultats de xénotransplantation hétérotopique de cœurs de porcs à des babouins ont rencontré plus de succès que ceux concernant le rein.

### ***Xénotransplantation de foie***

En 1992 et 1993, deux patients considérés comme inaptes à l'allotransplantation de foie (atteints de l'hépatite B et du SIDA en plus pour le second) se sont vu proposer une xénotransplantation de foie de babouin (qui est résistant à l'hépatite B) [278,279]. Le premier transplanté était mobile 5 jours après et le xéno greffon était fonctionnel. Après une semaine de fonctionnement, le foie transplanté a engendré des modifications de certains paramètres biochimiques. Le profil biochimique exprimé était caractéristique de celui d'un babouin avec une absence d'urate. Les facteurs de coagulations étaient également modifiés et le taux d'albumine bas (inexpliqué puisque les babouins ont un taux similaire au notre). Le foie de babouin était de petite taille par rapport à celui du patient et a montré des signes de régénération similaires à ceux observés lors d'allotransplantation. Malheureusement, les complications du traitement immunosuppresseur à haute dose ont mené à une infection et insuffisance rénale. Un rejet de la xénotransplantation a été suspecté. Le patient est mort 70 jours après la transplantation, d'une hémorragie cérébrale causée

par une infection par *Aspergillus*. Le second transplanté ne s'est pas bien remis de la xénotransplantation et est mort 3 semaines après d'insuffisance hépatique.

La même année, un foie de porc a également été utilisé pour l'Homme [174]. Cette fois, le foie a été utilisé comme solution transitoire en attente d'un foie humain disponible. Avant transplantation, la jeune patiente atteinte de déficience hépatique terminale, a subi une plasmaphérèse et une perfusion extracorporelle sur rein de porc, pour réduire les concentrations d'anticorps anti-porcins. Au départ, la greffe semblait fonctionner avec une production de bile et une amélioration des paramètres biochimiques. Cependant, après la transplantation, les concentrations en anticorps ont augmentées rapidement et le xéno greffon a été rejeté lorsque la patiente est morte 34h après l'opération. Ces trois cas sont les seuls cas de xénotransplantation effectués depuis les années 1990.

Des xénotransplantations de foies de porcs transgéniques sont réalisées chez des babouins avec une durée de survie de 4 à 8 jours [43,75,225]. Le rejet suraigu étant évité, des paramètres biochimiques ont pu être mesurés. L'hémostase paraît être contrôlée par le foie, mais on observe toujours une concentration basse d'albumine.

L'utilisation de cellules hépatiques xénogéniques paraît être une solution plus réalisable actuellement. Cette solution est proposée en attente d'une greffe allogénique compatible ou pour soutenir la fonction du foie lors d'insuffisance hépatique soudaine, le temps que le tissu hépatique se régénère. Un dispositif de foie artificiel a été créé à partir d'hépatocytes porcins. En 2004, le Dr Demetriou et ses collègues ont décrit une étude clinique prospective randomisée multicentrique du traitement de l'insuffisance hépatique par ce dispositif (Hepat-assist®). Un total de 171 patients (85 patients contrôles et 86 patients traités) souffrant soit d'une hépatite fulminante soit d'une non fonction primaire de greffon ont été inclus dans l'étude. Une amélioration de la survie n'a pas été démontrée dans cette étude sauf dans le sous-groupe des patients souffrant d'une hépatite fulminante. Toutefois, une amélioration neurologique et une diminution de 18% de la concentration d'**ammonium** et de **bilirubine** totale ont pu être obtenues grâce au traitement [62]

### ***Xénotransplantation de rein***

Le rein de porc n'a pas d'incompatibilité anatomique majeure avec l'Homme. Concernant la physiologie, un rein de porc pourra-t-il assurer une fonction rénale suffisante pour l'organisme ?

Les hormones régulatrices de la fonction rénale seront-elles effectives sur le greffon ?

Plusieurs hormones extrinsèques entrent en jeu :

-l'hormone antidiurétique (ADH) : régule l'homéostasie hydrique et entraîne un diabète insipide si elle n'est inefficace.

-l'aldostérone : ajuste les concentrations de sodium et de potassium ; mène à une hypotension, hyperkaliémie, hyponatrémie, en cas de dysfonctionnement.

-parathormone (PTH) : contrôle le métabolisme du calcium et du phosphore et entraîne une hypocalcémie et hyperphosphatémie si elle ne fonctionne pas correctement

Les hormones intrinsèques principales produites par le rein sont :

-la rénine : participe au contrôle de la pression sanguine

-l'érythropoïétine (EPO) : est responsable de la synthèse des globules rouges, son absence conduit à l'anémie.

Les essais de xénotransplantation porc-primate sont nombreux concernant le rein (Tabl.15). Les reins de porc, transplantés à des primates, réussissent à maintenir une pression sanguine, une concentration de sodium, potassium et calcium normale, après une baisse momentanée juste après la

transplantation. Les seuls changements physiologiques que les scientifiques ont eu le temps d'observer sont une hypophosphatémie et une anémie. Le facteur spécifique responsable de cette anémie n'est pas clairement identifiable, l'EPO porcine pourrait être détruite par les anticorps du receveur ou non reconnue par les récepteurs spécifiques. Un traitement avec de l'EPO humaine, permet de supprimer cette anémie.

Ces changements après une greffe de rein de porc à un primate peuvent être considérés comme mineurs mais soulèvent des questions sur la faisabilité d'une xénotransplantation d'organe avec une fonction métabolique plus complexe comme le foie.

Des progrès majeurs concernant la compréhension de l'immunologie de la xénotransplantation et la survie des xéno greffons a été prolongée de quelques minutes à quelques mois. Le tableau 14 fait un état des lieux des différentes études de transplantation d'organe porc-primate réalisées récemment. Des tests de perfusion extracorporelle de xéno-organes chez les humains sont réalisés pour le foie avec plus ou moins de succès et pour le rein [43].

De nombreuses questions restent en suspend et restreignent l'opportunité que pourrait représenter les xéno greffes d'organes (efficacité fonctionnelle à long terme et incompatibilités physiologiques).

**Tableau 15 Résultats d'études de transplantation d'organes entiers de porcs à des primates-non-humains**

	Type	Pigs	Recipient	Number	Survivals (days)	Median survival (days)	Immunosuppression
<i>Kidney</i>							
Cozzi E (2000) [28]		hDAF	Cynomolgus monkey	9	5,6,9,18,39,50,56,56,78	39	CsA, CyP, St
Ghanekar A (2001) [32]		hDAF	Baboon	16	Groups 1-4, not available	19 <sup>a,b</sup>	GAS914,CyP,ATG, CsA, Rapa, St
Ghanekar A (2001) [35]		hDAF	Baboon	9	Groups 1-3, not available	28 <sup>a,b</sup>	GAS914,CyP,ATG, CsA, Rapa, St
Vangerow B (2001) [30]		hDAF	Cynomolgus monkey	10	3,4,9,11,11,15,18,21,28,68	13	CyP, C1-Inh, St
Lam TT (2002) [31]		hDAF	Cynomolgus monkey	10	3-27	20.3 <sup>a</sup>	GAS914, CyP, CsA, MMF, St
Richards AC (2002) [98]		hDAF	Cynomolgus monkey	20	Groups 1-2 (4-60)	30.5 <sup>a</sup>	CyP, CsA, RAD, MPS, TP10, St
Barth RN (2003) [99]		hDAF	Baboon	5	24,27,27,32,229	27	Thymokidneys, GAS914, ATG, murine antiCD3, CyP, CVF, MMF
Cozzi E (2004) [38]		hDAF	Cynomolgus monkey	5	2,5,12,27,37	12	GAS914, CyP, CsA, MMF, St
Yamada K (2005) [10]		GT-KO	Baboon	6	Group 1 (4,13,31,33,56,68)	32	Vascularized thymic lobe, TCD-1 or TCD-2
				5	Group 2 (16,18,26,81,83)	26	Thymokidney, TCD-1 or TCD-2
				3	Group 3 (20,33,34)	33	Kidney alone, TCD-2 or PTCD
Shimizu A (2005) [36]		hDAF	Baboon	16	Groups 1-2 (9-30)	11.5 and 15.5	Thymokidneys, GAS914, ATG, anti-monkeyCD3, CyP, CVF, MMF, anti-CD40
Chen G (2005) [39]		GT-KO	Baboon	6	8,9,10,11,13,16	10.5	ATG, FK506, CVF, MMF, St
Chen G (2006) [37]		hDAF	Baboon	7	Group 1 (7,8,13,16,75) Group 2 (8,14)	11 and 13	GAS914, ATG, FK506, MMF, LF15-0195, Rituxan, CVF, St
<i>Liver</i>							
Ramirez P (2000) [45]	Orthotopic	hDAF	Baboon	2	96-192 h	144 h	CyP, CsA, St
Ramirez P (2005) [47]	Orthotopic	hDAF/CD59/H-Tranferase	Baboon	5	13,18,20,21,24 h	20 h	CyP, CsA, MMF, Rituximab, Daclizumab, St
<i>Heart</i>							
Schmoekel M (1998) [100]	Orthotopic	hDAF	Baboon	10	<1-9 days	3.3 <sup>a</sup>	CyP, CsA, St
Waterworth PD (1998) [101]	Orthotopic	hDAF	Baboon	5	0,0,5,5,9	3.8 <sup>a</sup>	CyP, CsA, St
	Heterotopic	hDAF	Baboon	3	2,13,21	13	CyP, CsA, St
Bhatti FNK (1999) [56]	Heterotopic	hDAF	Baboon	9	10,12,15,15,26,32,37,44,99	26	CyP, CsA, MMF, St
Vial CM (2000) [60]	Orthotopic	hDAF	Baboon	1	39	39	CyP, CsA, MMF, St
Lam TT (2002) [31]	Heterotopic	hDAF	Cynomolgus monkey	3	not available	27 <sup>a</sup>	GAS914, CyP, CsA, MMF, St
Houser SL (2004) [59]	Heterotopic	hDAF	Baboon	10	4-139	27	GAS914, ATG, LoCD2b, Thymic irradiation, MMF, CVF, human antiCD154, St
Kuwaki K (2005) [8]	Heterotopic	GT-KO	Baboon	8	16,23,56,59,67,78,110,179	78	ATG, Thymic irradiation, LoCD2b, CVF, human antiCD154, MMF, St
McGregor CGA (2005) [57]	Heterotopic	MCP	Baboon	7	15,38,54,64,96,99,137	96	Rituximab, ATG, TPC, FK506, Rapa, St
Brandl U (2005) [102]	Orthotopic	hDAF	Baboon	4	1,2,9,25	9.3 <sup>a</sup>	GAS914, CyP, ATG, FK506, Rapa, St
Byrne GW (2006) [103]	Heterotopic	MCP	Baboon	63	0-139	96 <sup>b</sup>	TPC, ATG, Rituximab, CyP, FK506, Rapa, St
Wu G (2007) [67]	Heterotopic	hDAF	Baboon	23	0-36	6.8 <sup>a</sup>	GAS914, NEX1285, CsA, CyP, MMF, anti-CD154
	Heterotopic	MCP	Baboon	5	2 h, 3 h, 1	<1 <sup>a</sup>	GAS914, NEX1285, CsA, CyP, MMF, anti-CD154
McGregor CGA (2008) [61]	Orthotopic	MCP	Baboon	3	34,40,57	40	alphaGal-polymer, ATG, FK506, Rapa
<i>Lung</i>							
Gaca JG (2002) [73]	Orthotopic	MCP	Baboon	1	9 h	9 h	Antibody depletion (column), antiC5a, CyP, CsA, Aza, St
Gonzalez-Stawinski (2002) [79]	Orthotopic	MCP	Baboon	4	1-4 h	4.4 <sup>a</sup> h	Antibody depletion Gal-Peg, Rituximab, CyP, CsA, St
Lau CL (2003) [78]	Orthotopic	MCP	Baboon	4	9-12 h	12.2 <sup>a</sup> h	CyP, Rituximab, CsA, St
	Orthotopic	vWF-deficient	Baboon	2	<3 h	<3 h	Imuran, CsA, St
Cantu E (2004) [71s]	Orthotopic	MCP	Baboon	5	Not available	22.6 h	Ab depletion (Gal-peg), Clodronate
	Orthotopic	vWF-deficient	Baboon	3	Not available	67 h	Ab depletion (Gal-peg), Clodronate

Legend: CsA: cyclosporine, CyP: cyclophosphamide, GAS914: a soluble Gal [α1-3] Gal polymer, ATG: anti-thymocyte globulin, St: steroids, Rapa: rapamycin, C1-inh: C1-inhibitor, MMF: mycophenolate mofetil, MPS: mycophenolate sodium, RAD: everolimus, CVF: cobra venom factor, IVIG: intravenous immunoglobulin, LoCD2b: rat anti-primate CD2b monoclonal antibody, AZA: azathiopurine, TPC: anti-Gal antibody therapeutic, TCD-1: T-cell depletion regimen-1 (3 doses of antithymocyte globulin (ATG) plus 3-4 doses of rat antibody specific for human CD2; anti-CD154 monoclonal antibody, MMF and St, TCD-2: T cell depletion regimen-2 (100 cGy whole body irradiation on day -6, 2 doses of LoCD2, 2 doses of ATG; anti-CD154 monoclonal antibody, MMF and St, PTCD: partial T-cell depletion regimen (3 doses of ATG and 3 doses of LoCD2) anti-CD154 monoclonal antibody, MMF and St.

<sup>a</sup> Mean survival.

<sup>b</sup> Longest survival among the groups.

Source : Ekser B., Rigotti P., Gridelli B., Cooper D.K.C. *Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. Transplant Immunology* 21 (2009) 87-92

## B.5.2 Xénotransplantation de tissus et cellules

Depuis 40 ans, la xénotransplantation de tissus est courante pour la peau, les vaisseaux sanguins, les valves cardiaques (à partir de péricarde de veau ou de valves de porc montées sur une armature rigide). D'autres greffes de tissus ont été lancées.

## ***Transplantation de cellules médullaires surrénales***

Les cellules de la médullosurrénale produisent de l'adrénaline, de la noradrénaline, des substances opioïdes-like, la métenképhaline. Ces substances sont également produites par le système nerveux central et ont des effets analgésiques inhibant les signaux de douleur venant de la périphérie.

Des cellules de la médullosurrénale peuvent être obtenues de veaux nouveau-nés (elles sont trop difficiles à isoler chez le porc). La structure des substances sécrétées est similaire des bovins à l'Homme.

Comme il a été rapporté que la transplantation allogénique de cellules de la médullosurrénale pouvaient améliorer l'état des patients souffrant de douleur chronique sévère, la greffe de cellules chromaffines bovines encapsulées a été testée. Ces cellules ont été transplantées dans le canal central médullaire (site immunitaire protégé) de patients atteints de cancer terminal avec une douleur résistante à la morphine [27]. Aucune immunosuppression n'a été réalisée. Un essai de phase II a été réalisé en 1999 impliquant 89 patients ayant un cancer ou des douleurs neurologiques, a montré que le traitement n'était pas suffisamment puissant. Malgré tout, les meilleurs effets ressentis concernaient les patients avec des douleurs lombaires ou sacrées coïncidant avec le site d'implantation [43,158].

L'application future de cette xénotransplantation est incertaine en raison des problèmes techniques rencontrés avec l'implant. Les implants étaient retirés après 6 mois mais certains n'ont pas pu être enlevés et les patients seront suivis à vie. La compagnie américaine Cytotherapeutics Inc. (CTI) a vendu le concept à une compagnie Suisse et AstraZeneca à l'origine du dernier essai clinique n'a pas produit d'autres essais sur l'homme [43], des essais se poursuivent chez le rat [75].

## ***Xénotransplantation de cellules produisant un facteur de croissance neurotrophique***

Des cellules fœtales transgéniques de hamster produisant un facteur de croissance neurotrophique ont été placées dans le canal central médullaire de six patients ayant une sclérose latérale amyotrophique (SLA, maladie de Charcot : maladie neurologique qui mène à la paralysie) [2]. Des concentrations élevées de facteur de croissance sont rapportées mais il n'est pas fait mention de l'amélioration clinique des patients.

## ***Xénotransplantation de neurones de porcs***

Les neurones dopaminergiques de porc sont les cellules nerveuses les plus étudiées en xénotransplantation. La structure de la dopamine est similaire chez l'Homme et le porc, mais la dopamine est produite à des concentrations plus hautes chez le porc. Le système de recyclage de la dopamine se compose de deux voies métaboliques différentes chez l'Homme alors que le porc n'en possède qu'une.

Les médicaments anti-Parkinsoniens semblent avoir les mêmes effets thérapeutiques que les neurones de porc. La transplantation de cellules dopaminergiques fœtales de porcs dans le cerveau, améliore les symptômes de rats ou singes ayant une maladie de Parkinson chimiquement induite. Bien que les neurones soient placés dans le système nerveux central, site immunologique privilégié, un traitement immunosupresseur est nécessaire. L'évaluation histologique a montré que les cellules se différencient en neurones matures dopaminergiques et établissent des contacts avec d'autres neurones. Un essai de phase I réalisé par Diacrine en 1995 [59], sur 12 patients a rapporté une

amélioration clinique dont l'effet placebo ne peut être exclu. Un second essai de phase II en double aveugle réalisé par Genzyme, incluant 18 patients, n'a pas montré une amélioration significative de l'effet placebo [247].

Des neurones porcins fœtaux GABA (neurones ayant un effet inhibiteur sur la transmission entre les cellules nerveuses) ont également été transplantés à 12 patients (essai de phase I) atteints de **chorée de Huntington**. Bien que la structure du GABA soit similaire entre l'Homme et le porc, aucune amélioration clinique n'a été observée. Un essai de phase II est en discussion [43]. Des essais sur un faible nombre de patients ont été mis en place pour traiter des épilepsies focales [43, 244,158].

### *Xénotransplantation d'îlots pancréatiques*

Les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (dans le pancréas), produisent de l'insuline, hormone indispensable à la régulation de la glycémie. La différence structurale entre l'insuline porcine et l'insuline humaine est seulement d'un seul acide aminé. L'insuline porcine a déjà été utilisée pour traiter les patients diabétiques avant qu'une insuline humaine recombinante soit disponible dans les années 1980. La production d'anticorps anti-insuline porcine était basse chez les humains n'ayant pas de traitement immunosuppresseur. Porcs et humains ont la même fourchette de glycémie et leurs mécanismes régulateurs de l'insuline sont identiques. L'insuline est d'abord sécrétée sous forme de pro-insuline, elle prend la forme d'insuline lorsqu'une chaîne polypeptidique appelée « peptide C » lui est enlevée. Le manque de peptide chez les diabétiques contribue à des complications secondaires. Des différences structurales significatives séparent le peptide C humain du peptide C porcine dont on ne sait pas s'il pourrait être actif chez l'homme.

Les îlots pancréatiques sécrètent également du glucagon. Cette molécule augmente la glycémie avec l'hormone de croissance et la noradrénaline, balançant ainsi les effets de l'insuline.

La transplantation d'îlots pancréatiques est envisagée pour réguler la glycémie chez les personnes diabétiques.

Les premières expériences de transplantation de d'îlots pancréatiques porcins adultes ou fœtaux, ont effectivement montré que cette technique pouvait guérir le diabète chez les rongeurs [43,185]. Des essais de xénotransplantation chez les primates non-humains ont suivi. En 2008, cette thérapie a été rapportée sur 181 primates non humains (72 non diabétiques, 109 diabétiques), par 15 institutions [118]. Après la transplantation de cellules d'îlots porcine, une production d'insuline restaurée pendant plus de 3 mois (avec une survie fonctionnelle du greffon jusqu'à 6 mois), a été rapportée par cinq groupes différents [118]. Les glycémies étaient normales. Ces réussites ont été obtenues avec diverses stratégies de xénotransplantation :

- infusion intraportale d'îlots de porcs adultes ou nouveau-nés chez des singes rhésus ou cynomologus immunodéprimés avec un diabète obtenu chirurgicalement ou chimiquement.
- infusion intraportale d'îlots de porcs adultes Gal-KO, transgéniques pour le cofacteur de membrane humaine CD46, chez des singes cynomologus immunodéprimés, avec un diabète chimiquement induit.
- implantation de tissu embryonnaire précurseur pancréatique, chez des singes cynomologus immunodéprimés, avec un diabète chimiquement induit.
- transplantation intrapéritonéale d'îlots adultes microencapsulés chez des singes non immunodéprimés, avec un diabète spontané.
- implant sous-cutané comprenant une monocouche d'îlots adultes encapsulés sur une matrice de collagène, chez des singes cynomologus non-immunodéprimés.

Quelques essais chez l'homme sont rapportés :

- îlots pancréatiques de lapins transplantés chez des diabétiques par le professeur Shumakov (Moscou) : pas d'information disponible [43].

- îlots fœtaux porcins non-encapsulés implantés à 10 patients diabétiques à Stockholm entre 1990 et 1993 par le groupe de Carl Groth et Claes Hellerström [103]. La xéno greffe a survécu chez quatre patients (présence de peptide C porcine dans l'urine jusqu'à 450 jours après la transplantation), cependant aucun patient n'a pu être exonéré des injections d'insuline.

- îlots porcins encapsulés transplantés à 6 patients diabétiques en Nouvelle Zélande par le Dr Elliott en collaboration avec une compagnie américaine Vivorex. Les résultats n'ont pas été publiés, ils ont été évoqués dans un résumé parlant de la surveillance du rétrovirus porcine endogène : une diminution des besoins en insuline ainsi qu'un meilleur contrôle de l'hémoglobine glyquée ont pu être observés, dans deux cas, l'insuline a été diminuée au maximum 2 ans [78,79].

- tissus pancréatiques fœtaux de porc et de veau transplantés à des patients chinois : aucun résultat publié [43]. Dr Wang a présenté en 2005 les résultats de ces travaux concernant la transplantation d'îlots porcins dans l'artère hépatique de vingt patients diabétiques. Différents régimes immunosuppresseurs ont été administrés aux receveurs. Tous les patients, ayant reçu des stéroïdes, ont montré une diminution de leur besoin en insuline pour une période d'un an et la présence de C-peptide porcine [313].

- transplantation d'îlots porcins avec des cellules de Sertoli, placés dans une prothèse en téflon et greffés en sous-cutané à douze adolescents non-immunosupprimés par le Dr Valdes-Gonzales et ses collègues. Onze ont reçu une deuxième greffe après six/neuf mois et quatre ont été transplantés à nouveau trois ans après. Chez six patients, une réduction significative des besoins en insuline a été documentée sur quatre ans dont deux sont devenus insulino-indépendants temporairement [302].

La xénotransplantation de cellules requiert une technique d'intervention assez simple. De plus, la méthode de micro encapsulation permettant d'isoler les cellules xénogéniques du système immunitaire du receveur, exonère la greffe de traitement immunosuppresseur. Cette simplicité explique que quelques essais cliniques aient été initiés sans expérience significative préalable sur le modèle primate. Les données actuelles indiquent que certains xénotransplants comme les îlots pancréatique, les neurones dopaminergiques et les cellules médullosurrénales, peuvent avoir un effet thérapeutique chez les humains. Plus d'études sur les aspects physiologiques de ces xénotransplantations sont désormais attendues.

La xénotransplantation clinique doit faire face à de nombreux obstacles : rejet immunologique, incompatibilité moléculaire, incompatibilité métabolique, risque de transmission de maladies infectieuses.

Les résultats actuels représentent une avancée spectaculaire mais indiquent que nous sommes encore loin de transplanter des organes porcins aux patients. Les durées moyennes de survie d'organes porcins transplantés sont passées de minutes à semaines et le développement des biotechnologies laissent entrevoir des solutions possibles pour prévenir les rejets immunologiques. La xénotransplantation clinique est pour le moment plus envisageable pour les greffes de tissus.

Les pays n'ont pas tous les mêmes instances de régulation, aussi l'OMS demande aux Etats membres de dresser un inventaire des essais cliniques de xénotransplantation qui ont lieu sur leur territoire. Une collaboration entre l'OMS, les Hôpitaux Universitaires de Genève et l'Association internationale de xénotransplantation, a permis de mettre sur pied un site Internet : <http://www.humanxenotransplant.org/> avec pour but de collecter des informations concernant toute pratique de xénotransplantation chez l'homme et d'identifier les pays dans lesquels de telles pratiques ont lieu. Cet encadrement tente de rendre les futurs essais cliniques de xénotransplantation

plus sûr. L'OMS encourage l'établissement de normes et de réglementations sur l'élevage et l'utilisation d'animaux exempts d'organismes pathogènes. Ces mêmes exigences doivent être établies quant à l'autorisation des interventions, l'approbation des essais cliniques du point de vue de l'éthique, des modalités de consentement, de l'information aux patients.

### B.5.3 Acceptation des xénogreffes

#### *Acceptabilité de la xénogreffe*

Comme bien souvent, une des questions éthique récurrente et applicable à toute technologie est : la transplantation d'organes ou de tissus animaux à l'humain est-elle « naturelle » ? Il pourrait être dit que tout ce que fait l'humain est non-naturel, non-naturel parce que les actions humaines interfèrent avec l'ordre naturel non-humain ! Nous ne pouvons pas ne pas interférer avec la nature et l'argument que la xénotransplantation n'est pas naturelle n'est ni recevable ni éthique. Il est en effet difficile de concevoir la délimitation entre ce qui est acceptable ou pas. Les débats éthiques produits par les organisations internationales ont la lourde responsabilité de trancher cette question. Nous allons ici soulever quelques une des nombreuses questions concernant les xénogreffes.

Avant de s'interroger sur des considérations pratiques, de critères et procédures techniques (bien être animal, expérimentation), il paraît essentiel de s'interroger sur le but de la xénotransplantation.

Un des premiers arguments avancé est que la xénogreffe pourrait régler le problème de pénurie d'organes humains. Penchons nous sur quelques chiffres de l'Agence de la biomédecine [4] : en 2008 en France, 2937 greffes de rein et 360 greffes de cœur ont eu lieu avec respectivement 270 et 6509 patients restants sur la liste d'attente. Un patient en attente de greffe coûte plus cher sur le long terme qu'un patient greffé.

*Une étude comparative d'une équipe de l'Agence de biomédecine dirigée par Emilie Savoye et portant sur plus de 3.000 patients souffrant d'IRT (insuffisance rénale terminale) a montré que les patients restant sous dialyse avaient un risque relatif de décès 2,54 fois supérieur à celui des patients greffés. Or, si le coût moyen annuel d'une dialyse se chiffre à 70.000 euros, la greffe de rein ne revient qu'à 43.000 euros la première année puis 13.000 euros en moyenne par an les années suivantes, indique le Dr Christian Jacquelinet, de l'Agence de biomédecine.*

*Cécile Almendros. (07/05/2009) Accueil > Actualités > La pénurie d'organes coûte cher Site de Espaceinfirmier.com [en ligne] <http://www.espaceinfirmier.com/actualites/detail/11627/la-penurie-d-organes-coute-cher.html> (page consultée le 17 novembre 2009)*

Même si un jour des organes de porcs transplantables seront disponibles en nombre illimité, les ressources humaines et financières demeureront quant à elle toujours limitées, de quel côté la balance penchera-t-elle ? Les xénogreffes n'empêcheront pas les gens de mourir, le circuit de santé du pays auquel ils appartiennent limite l'idée séduisante de la possibilité de sauver des vies humaines.

En effet, l'impératif ultime qui oriente le progrès médical est de sauver des vies humaines. Mais la vie est une maladie constamment mortelle. Jusqu'où pouvons-nous aller pour prolonger la vie ?

*« la xénotransplantation devra être évaluée dans le contexte d'un débat plus large sur la médecine moderne et nos tentatives de prolonger l'espérance de vie »*

*Document confidentiel d'un groupe d'expert sur la xénotransplantation. D'après Nathalie SAVARD, «L'acceptabilité de la xénotransplantation du point de vue de notre contexte idéologique», Lex Electronica, vol. 10, no 2 (numéro spécial), Automne 2005.*

Du moment que la xénotransplantation est considérée comme envisageable, d'autres questions d'ordre moral se posent : est-il moral de tuer des animaux au bénéfice de receveur humains ? Dans plusieurs sociétés le sacrifice animal pour différents usages, est admis, mais peut-on considérer la xénotransplantation de la même manière ? Est-il préférable de devoir un organe neuf à un homme décédé ou à un animal sacrifié dans cet objectif, transgressant ainsi les frontières entre êtres humains et animaux. Le droit des animaux intervient également. La balance entre la douleur infligée et le bénéfice pour le patient pose un problème de conscience. Le problème de l'usage des animaux dans un but thérapeutique a suscité deux approches, l'une privilégie le côté utilitaire l'autre le rapport risque-bénéfice de l'usage de l'animal.

Pour que la recherche se poursuive, les critères d'acceptabilité éthique devront être intégrés aux critères médicaux [262], dont voici un aperçu proposé au congrès vétérinaire de Tunis en 2002 [111]

### **1- Critères d'acceptabilité pour l'homme**

- réduire au maximum les risques infectieux ;
- maîtriser le rejet ;
- évaluer la survie de la greffe qui doit offrir au minimum une amélioration durable de la qualité de la vie.

### **2- Critères d'acceptabilité concernant l'animal source d'organes :**

- élevage exempts d'organismes pathogènes ;
- préserver le bien-être animal, éviter les souffrances ;
- choisir animal dont l'activité fonctionnelle est proche de celle de l'homme et que l'on peut transformer génétiquement par l'intégration dans le génome animal d'un ou plusieurs gènes : Le porc semble être le modèle qui offre un certain nombre de garanties.

### **3- Critères d'acceptabilité concernant la société :**

- bénéfice pour l'homme et usage à son profit d'animaux génétiquement modifiés ou clonés comme source d'organes de tissus ou de cellules ;
- mesures de biosécurité par un encadrement législatif ;
- aspects économiques ;
- interférences religieuses relatives à la pureté ou l'impureté de l'animal [108].

### **4- Critères de sélection des patients :**

- xénotransplantation seulement si c'est la seule possibilité thérapeutique pour améliorer la qualité de la vie ;
- consentement éclairé du patient après information précise sur les risques de la xéno greffe ;
- surveillance, vigilance et évaluation.

Des guides de bonne conduite et de recommandations ont été édités par l'Europe [262] et les États-Unis concernant la xénotransplantation. Ils apportent ainsi une aide structurelle pour inciter les États à corriger leurs lois et réglementation souvent incomplètes [43].

## ***Attitude du public***

En 2004, Joakim Hagelin [108] a produit la première étude transversale faisant un bilan de toutes les enquêtes d'opinion publiées sur les xénogreffes. Chaque sondage produit est à interpréter en prenant en compte la culture du pays sondé et l'identité de l'organisme réalisant le sondage. La formulation des questions et la formulation des explications associées (ou aucune explication) peuvent biaiser le sondage en incitant la personne interrogée à répondre dans un certain sens. Voici quelques réponses et pourcentages pour plusieurs pays [43], donnant une idée de la diversité des sondages et de la difficulté à en tirer des généralités :

### **Australie**

Sur 133 patients dont 89 sous dialyse et 24 greffés : 61,1% accepteraient un organe d'une personne vivante apparentée, 41,6% accepteraient un organe de singe, le même pourcentage est obtenu pour un organe d'espèce éloignée de l'Homme (porc, mouton), 47,8% pensent qu'il est approprié d'élever des animaux pour fournir des organes à la transplantation.

### **Canada**

Sur 2526 canadiens de 15 ans et plus, pour le Health Canada's Therapeutics Products Programme : 54% des personnes interrogées envisageraient une xénotransplantation si un organe humain n'était pas disponible, dont 38% avec un oui irrévocable. Les femmes avaient plus tendance à refuser la xénotransplantation (55%) que les hommes (37%). Plus l'âge et les années d'études augmentaient, plus l'information à propos des xénogreffes était connue.

### **États-Unis**

Sur 1200 individus, par la National Kidney Foundation : 62% acceptaient le concept de xénotransplantation comme option viable avec toutefois certaines réserves.

Sur 100 patients au Centre Médicale St Vincent : 80% acceptaient la xénotransplantation en situation d'urgence, 24 patients pensaient que la xénotransplantation pourrait changer leur apparence, leur personnalité, leurs habitudes alimentaires ou sexuelles.

### **France**

Sur 91 médecins, 128 infirmiers, 85 techniciens, 321 étudiants, après information des risques infectieux : 72,2% des infirmiers, 74,6% des étudiants, 76,6% des techniciens, 85,4% des médecins acceptaient les xénogreffes.

### **Allemagne**

Questionnaire détaillé à 1049 patients greffés ou sur liste d'attente : 77% des patients acceptaient la xénotransplantation, 58% acceptaient toujours si les risques étaient accrus par rapport à une allogreffe.

### **Suède**

Sur un échantillon de 1500 habitants de 18 à 70 ans, par The Department of Public Health and Caring Science/Social Medicine : Les organes de donneurs vivants sont préférés (77%), suivis des organes de donneurs décédés (69%), ensuite les organes artificiels (63%) et en dernier les organes animaux (40%).

## **Royaume-Uni**

Sur 850 patients par la British Kidney Association, après informations : 78% acceptaient de recevoir un rein de porc et 5% ne savaient pas.

Il en ressort que l'éducation, la religion, l'expérience permettant de prendre des décisions sur des questions morales ou éthiques, le sexe, sont autant de paramètres jouant sur l'opinion à propos des xénotransplantations [108], comme à propos des questions rejoignant l'usage des animaux dans la recherche biomédicale ou pour des applications biotechnologiques.

Étant donné les multiples paramètres à prendre en compte, un sondage reflétant l'ensemble de l'opinion publique est difficile.

## **.B.6. Bilan**

La compréhension des mécanismes immunitaires en jeu dans le rejet des xéno greffes, se précise. En interaction avec cette avancée, la transgénèse tente de créer des animaux capables de contourner les obstacles du rejet. Nouveaux concepts, nouvelles techniques vont de paire avec nouveaux obstacles et nouvelles questions! En dehors du débat éthique que soulève la xéno greffe, une question de santé publique se pose. En effet, plus que jamais, dans le contexte de crainte de mutation du virus de la grippe aviaire (qui changerait ainsi de cible, passant de l'oiseau à l'homme), le rôle éventuel du xéno greffon dans le passage de nouveaux pathogènes de l'animal à l'homme est à prendre en compte.

# CONCLUSION

Même si l'usage de l'animal-médicament a décliné à travers l'Histoire pour être remplacé par des solutions plus « modernes », il est encore aujourd'hui très diversifié. Certaines thérapies ont déjà fait leurs preuves, la sangsue thérapie et l'asticot thérapie ont prouvé leur efficacité. Pour d'autres comme l'ichthyothérapie, des études comparatives à grande échelle sont nécessaires pour déterminer leur puissance thérapeutique. Même si l'apithérapie par piqûres d'abeilles se targue d'un usage ancestral, des essais objectifs et complets doivent être produits pour convaincre de son efficacité et de sa sécurité. De nouvelles pistes sont explorées, comme l'usage des helminthes immunomodulateurs dans l'espoir de traiter des maladies inflammatoires chroniques et de trouver une solution à la gestion de maladies auto-immunes.

Les biotechnologies ont propulsé l'animal-médicament au devant de la scène par l'annonce de la commercialisation de protéines pharmaceutiques produites par des animaux modifiés génétiquement. Ces premiers succès annoncent un tournant dans l'industrie pharmaceutique. De la même manière, les animaux génétiquement modifiés pourraient peut-être contribuer à la réussite de xénogreffes, dans un futur proche selon certains auteurs. Mais de nombreuses interrogations sont soulevées quand à la balance avantages/inconvénients de cet usage.

Les ressources de l'animal-médicament sont grandes. Il faut cependant garder raison, de nombreuses utilisations de l'animal-médicament n'ont aucun appui scientifique et se basent sur des croyances et traditions. En désespoir de cause, certains malades peuvent faire appel à un chamane qui sacrifiera un rat sensé « absorber » la maladie. La recherche d'insolite peut aussi amener à pousser la porte d'un spa qui propose des massages avec des serpents<sup>3</sup> !

Le sujet se limitait à l'utilisation de l'animal « entier », mais l'animal peut réserver encore de nombreuses surprises quant à ses propriétés moléculaires. Nous avons vu par exemple que la salive de la sangsue contenait des molécules aux propriétés intéressantes. L'industrie pharmaceutique s'est affranchie de la sangsue pour produire aujourd'hui une hirudine de synthèse : Angiomax®. La recherche de nouvelles substances actives dans le règne animal promet d'être riche en informations. Les venins notamment sont à l'honneur : ils sont l'objet depuis de nombreuses années, de recherches sur les propriétés. De nouvelles molécules sont isolées du venin de nombreux animaux (araignée, serpents, scorpions). L'animal entre dans la construction des médicaments du futur.

---

3 Buck W. Snake massage; *Site de about.com : weird news* [en ligne] [http://weirdnews.about.com/od/weirdphotos/ss/snake\\_massage.htm](http://weirdnews.about.com/od/weirdphotos/ss/snake_massage.htm) (page consultée le 22 novembre 2009)



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

**a-AT** : alpha-antitrypsine  
**ADCC** : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity, cytotoxicité cellulaire médiée par ces anticorps  
**ADN** : 'acide désoxyribonucléique  
**AFSSaPS** : l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé  
**AMM** : autorisation de mise sur la marché  
**APD** : adénosine diphosphate  
**AR** : Arthrite Rhumatoïde  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ATIII** : antithrombine III  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**ATryn** : human antithrombin III  
**ATU** : Autorisation temporaire d'utilisation  
**BAC** : Bacterial Artificial Chromosome  
**BBC** : British Broadcasting Corporation  
**BChE** : butyrylcholinestérase humain  
**BVA** : Bee Venom Acupuncture  
**BVT** : Bee venom Therapy  
**CAM** : complexe d'attaque membranaire  
**CD** : cluster of differentiation  
**CDAI** : Crohn disease activity index (index d'activité de la maladie de Crohn)  
**CHO** : chinese hamster ovar  
**COX** : cyclo-oxygénase  
**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène  
**EMEA** : Agence européenne des médicaments  
**EPO** : érythropoïétine  
**EST** : Encéphalopathie Spongiforme transmissible  
**FDA** : Food and Drug Administration  
 **$\alpha$ 1,3GT** :  $\alpha$ 1,3-galactosyl transférase  
**Gal** : galactosyl galactose  $\alpha$  (1-3) galactose  
**GABA** : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
**HAC** : Human Artificial Chromosome  
**HLA** : Human Leucocyte Antigens  
**HT** : Hors taxe  
**Ig** : immunoglobuline  
**INF $\gamma$**  : Interféron gamma  
**IRM** : imagerie par résonance magnétique  
**KO** : knock out  
**LED** : Lupus érythémateux disséminé  
**MAC** : Mammal Artificial Chromosome  
**MC** : Maladie de Crohn  
**MICI** : Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales  
**NANA** : N-Acetyl Neuraminic Acid  
**NGNA** : N-Glucosyl Neuraminic Acid  
**NK** : Natural Killer  
**O.G.M.** : Organisme génétiquement modifié

**OMS** : Organisation Mondiale de la santé  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PERV** : Porcine endogenous retrovirus  
**RCH** : Rectocolite Hémorragique  
**RT-PCR** : reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction  
**SARL** : Société à responsabilité limitée  
**SEP** : Sclérose En Plaque  
**SIDA** : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis  
**SPF** : Specific Pathogen Free  
**Th** : référence au lymphocyte T helper  
**THP** : Therapeutic Human Polyclonals  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**Treg** : référence au lymphocyte T régulateur  
**UVA** : rayon ultraviolet A  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine induisant le SIDA  
**vWF** : facteur de von Willerbrand  
**YAC** : Yeast Artificial Chromosome)

# GLOSSAIRE

**Avulsion** : Arrachement, l'extraction d'une structure de l'organisme ou une partie de celui-ci, de son point de fixation, c'est-à-dire de l'endroit où cette structure est fixée dans le corps.

**Albumine** : Principale protéine du sang, soluble dans l'eau et fabriquée par le foie.

**Allergène** : Substance (antigène) de nature protéique appartenant à l'environnement et à l'origine d'une réaction allergique.

**Allergie** : Réaction inadaptée et excessive du système immunitaire de l'organisme, consécutive à un contact avec une substance étrangère (le plus souvent) à l'organisme (l'allergène), qu'on dit antigène. L'allergène est habituellement bien toléré par la plupart de la population. Toutefois, au contact de cet antigène, il arrive que le système immunitaire d'un organisme déclenche une réaction inadaptée, excessive et pathologique : c'est l'allergie, appelée également hypersensibilité.

**Allogreffe** : Remplacement d'un organe, d'un tissu par l'organe ou le tissu identique d'un donneur de la même espèce.

**Allotransplantation** : Greffe pratiquée entre deux individus appartenant à la même espèce animale, mais génétiquement différente.

**Alopécie** : Chute totale ou partielle des cheveux ou des poils.

**Alzheimer (maladie d')** : Atteinte chronique, d'évolution progressive, d'une partie du cerveau, caractérisée par une altération intellectuelle irréversible aboutissant à un état démentiel. La dégénérescence nerveuse est inéluctable, elle est due à la diminution du nombre de neurones avec atrophie du cerveau et présence de "plaques séniles", caractéristiques biologiques de cette maladie.

**Ammonium** : L'ammonium entre dans la circulation de la veine porte. Il est ensuite rapidement transformé en urée à condition que la fonction hépatique soit normale.

**Amputation** : Ablation d'une extrémité du corps suite à un traumatisme ou un acte chirurgical. Dans le cadre de la chirurgie, elle sert à limiter l'expansion incurable d'affections graves comme par exemple la gangrène.

**Analgésique** : Une variété de médicament qui permet d'atténuer, voire de supprimer la douleur.

**Anémie** : Désigne la diminution d'un ou de plusieurs éléments composant le sang. Le plus souvent ce terme s'applique pour une diminution du nombre des globules rouges. Mais une anémie se caractérise plus exactement par la diminution de la quantité d'hémoglobine contenue dans une unité de volume de sang.

**Anévrisme** : Agrandissement des parois d'une artère dans lequel s'engouffre le sang et où il peut y avoir formation de caillots. L'anévrisme artériel est le plus souvent dû à une atteinte de la paroi des vaisseaux par l'athérome (dépôts graisseux responsables de l'athérosclérose).

**Angiogenèse** : Processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants.

**Angiooedème** : Œdème sous-cutané ou sous-muqueux, le gonflement est plus profond que dans une urticaire qui touche le derme et l'épiderme. Il n'y a théoriquement pas de prurit ni de rougeur, mais généralement lors d'une crise, les deux peuvent être associés.

**Angiopathie** : Désigne toutes les maladies, les pathologies des vaisseaux sanguins (artères et veines) ou des vaisseaux lymphatiques.

**Anthrax** : Dénomination anglaise de la maladie du charbon. Cette maladie infectieuse due à une bactérie aérobie (c'est-à-dire nécessitant de l'oxygène pour vivre) appelée *Bacillus anthracis*, s'observe le plus souvent chez les animaux herbivores. L'homme peut être infecté par inhalation ou ingestion à la suite d'un contact avec des animaux infectés ou des produits d'origine animale contaminés, ou après une piqûre d'insecte. La découverte de plusieurs cas récemment aux États-Unis fait redouter le conflit utilisant des armes bactériologiques dont l'anthrax est un candidat de choix.

**Antibioprophylaxie** : Utilisation d'un antibiotique dans un but thérapeutique afin de prévenir l'éventuel survenue d'une infection susceptible d'être dangereuse.

**Antibiotique** : Substance d'origine naturelle ou synthétique, ayant la capacité d'arrêter la multiplication des bactéries, mais également d'autres agents infectieux.

**Anticorps** : Un **anticorps** est également **immunoglobuline**. Protéine du sang synthétisée par les cellules du système immunitaire en réponse à la pénétration d'un corps étranger (antigène) dans l'organisme.

**Antigène** : Substance étrangère à un organisme (c'est-à-dire que l'organisme ne possède pas habituellement) et provoquant chez celui-ci la constitution d'un anticorps. L'antigène peut se combiner avec cet anticorps spécifique grâce à la présence de sites antigéniques.

**Antiseptique** : Substance qui tue ou prévient la croissance de bactéries et des virus sur les surfaces externes du corps.

**Apipuncture** : Combinaison du traitement au venin d'abeille et de l'acupuncture.

**Apithérapie** : Thérapie grâce aux substances fabriquées par les abeilles (miel, gelée royale, propolis, pollen, venin).

**Apoplexie** : Perte de la connaissance et de la mobilité volontaire, survenant brusquement, due le plus souvent à une hémorragie cérébrale.

**Apoptose** : Mort cellulaire programmée.

**Arthrite dégénérative** : Voir arthrose.

**Arthrite rhumatoïde** : Rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent, dont l'origine n'est pas connue avec précision, maladies auto-immune. Entraîne une inflammation de la synovie, une

destruction progressive de l'os et du cartilage, qui survient précocement au cours des premières années.

**Arthrite** : Nom donné aux affections inflammatoires aiguës ou chroniques qui touchent les articulations.

**Arthroscopie** : Exploration visuelle de l'intérieur d'une cavité articulaire (articulation) à l'aide d'un arthroscope. Cet examen autorise également le traitement *in situ*.

**Arthrose** : Maladie dégénérative articulaire se caractérisant par l'altération d'une articulation que l'on qualifie soit d'idiopathique, c'est-à-dire dont on ne trouve pas la cause (on parle également d'arthrose primitive) soit d'arthrose secondaire, c'est-à-dire dont on peut identifier la cause. L'arthrose s'accompagne d'une lésion des articulations sans inflammation, se traduisant anatomiquement par la destruction du cartilage et la production de tissu osseux supplémentaire sous forme d'ostéophytes ou de chondrostomes.

**Asepsie** : Désigne l'absence de germes microbiens susceptibles d'entraîner l'apparition d'une infection.

**Asthme** : Forme particulière de dyspnée correspondant à une difficulté à respirer, et plus particulièrement à expirer (rejeter l'air contenu dans les poumons).

**Athanasie** (ou Tanaisie commune) : Plante herbacée vivace de la famille des *Asteraceae*, très commune en Europe. De taille assez élevée (jusqu'à 1m50), capitules à fleurs en tube d'un beau jaune d'or. Connue surtout pour ses propriétés vermifuges.

**Athérosclérose** : Désigne la perte d'élasticité des artères due à la sclérose provoquée par l'accumulation de corps gras (lipides, essentiellement cholestérol LDL) au niveau d'une des trois tuniques constituant la paroi des artères (l'intima) et intéressant avant tous les grosses et les moyennes artères.

**Atopie** : Prédisposition génétique aux allergies. Atopie s'emploie notamment pour qualifier certaines maladies qui touchent plusieurs organes. réponse allergique du système immunitaire à des allergènes communs de l'environnement, se traduisant par une production spontanée d'immunoglobulines de type E (IgE) Ils sont similaires aux symptômes de l'allergie, et leur manifestation est souvent précoce (en général avant l'âge de deux ans, il est possible que cela commence même dès l'âge d'un mois), en commençant par une dermatite (la dermatite atopique), évoluant parfois avec l'âge pour entraîner de l'asthme puis des rhino-conjonctivites, ponctués occasionnellement par des épisodes aigus : aggravation de l'asthme, urticaire, œdème, choc anaphylactique.

**Autologue** : Issu du grec *autos* : soi-même. Terme utilisé en immunologie, caractérisant des tissus appartenant au sujet lui-même (des cellules, sérum...).

**Avulsion** : Arrachement d'une structure de l'organisme ou une partie de celui-ci, de son point de fixation.

**Bactéricide** : Possédant la capacité de tuer des bactéries.

**Bézoard** : (du persan *pādzahr*, « qui préserve du poison ») Corps étranger que l'on trouve le plus souvent dans l'estomac des humains ou des animaux ruminants. On lui a autrefois attribué des propriétés médicinales et magiques curatives.

**Bile** : Liquide jaune légèrement verdâtre, fabriqué et sécrété par le foie puis emmagasiné dans la vésicule biliaire d'où il est éliminé vers le duodénum par le canal cholédoque.

**Bilirubine** : Pigment biliaire, de coloration jaune tirant sur le rouge ou le brun, issu de la biliverdine, elle-même issue de l'hémoglobine. Principal colorant de la bile, dont l'accumulation anormale dans le sang et les tissus détermine un ictère (jaunisse).

**Botulisme** : Maladie paralytique rare mais grave due à une neurotoxine bactérienne, la toxine botulique (anciennement appelée toxine *botulinique*) ou *botuline*, produite par différentes espèces de bactéries anaérobies du genre *Clostridium*, la plus connue étant *Clostridium botulinum*. Le botulisme humain est essentiellement associé aux toxines de type A, B et E. Leur mécanisme d'action est une inhibition de la libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires, ce qui bloque la transmission entre nerf et muscle et conduit à la paralysie respiratoire et locomotrice.

**Cachexie** : Dégradation profonde de l'état général, accompagnée d'une maigreur importante

**Cantharide** : *Lytta vesicatoria* L ordre des Coléoptères, famille des Meloïdes. Cantharide officinale, *mouche cantharide* ou *mouche espagnole* ou encore *mouche de Milan*, coléoptère de 12 à 21 mm de longueur, au corps allongé, et d'une couleur vert brillant. Dégage à distance une odeur forte assez désagréable, rappelant une odeur de souris. Sécrète la cantharidine, substance toxique et vésicatoire, propriétés aphrodisiaque prétendues qui en réalité inflame les voies urinaire et en irritant l'urètre, peut en effet provoquer une forte érection.

**Carcinome** : Cancer développé à partir d'un tissu épithélial (peau, muqueuse).

**Castoréum** : Sécrétion grasse très odorante produite par des glandes sexuelles du castor situées en-dessous de la queue, à proximité de l'anus. Permet au castor de délimiter son territoire et d'imperméabiliser son pelage. A connu divers usages en médecine et en parfumerie.

**Catarrhe** : Inflammation aiguë ou chronique des muqueuses, s'accompagne d'une sécrétion importante des glandes de la région enflammée (nez, pharynx), ne contient pas de pus.

**CD20** : Antigène situé sur la surface des lymphocytes B matures et des cellules cancéreuses dérivées des lymphocytes B.

**Cellules chromaffines** : Doivent leur nom au fait qu'elles prennent une coloration brune en présence de sels de chrome par suite de la polymérisation des catécholamines qu'elles contiennent. Petites cellules présentes dans les glandes médullosurrénales et dans les ganglions du système nerveux sympathique.

**Cellules dendritiques** : Cellules phagocytaires du système immunitaire, exprimant un large éventail de protéines permettant de détecter la présence de pathogènes et font partie des cellules présentatrices d'antigène.

**Cellules germinales** : Issues des cellules souches, d'un animal ou d'un végétal sont les cellules qui sont susceptibles de former les gamètes.

**Cellules présentatrices d'antigènes** : Cellules qui présentent des parties d'éléments intrus, sont de type monocyte, macrophage, lymphocyte B, cellule dendritique.

**Cellules somatiques** : Toutes les cellules qui ne seront pas à l'origine des gamètes.

**Cellules souches embryonnaires** : Cellules embryonnaires pouvant se répliquer indéfiniment, se transformer en d'autres types cellulaires, servent de source continue de nouvelles cellules.

**Chimère** : Organisme possédant deux ou plusieurs génotypes distincts

**Chlorose** : Terme ancien désignant une affection de nature discutée et considérée comme une anémie primitive. Caractérisée par une décoloration de l'épiderme ou des muqueuses, qui virent au blanc-verdâtre.

**Choléra** : Toxi-infection entérique épidémique contagieuse due à la bactérie *Vibrio cholerae*, ou bacille virgule, découverte par Pacini en 1854 et redécouvert par Koch en 1883. Elle est caractérisée par des diarrhées brutales et très abondantes. La forme majeure classique est fatale dans plus de la moitié des cas, en l'absence de traitement (de quelques heures à trois jours). La contamination est orale, d'origine fécale, par l'eau de boisson ou des aliments souillés.

**Chorée de Huntington** : Affection héréditaire due à une dégénérescence entraînant une atrophie du cortex cérébral et des ganglions de la base (masses de substance grise situées à l'intérieur de la substance blanche du cerveau). Elle se caractérise par le développement progressif, chez l'adulte, de mouvements de type choréique et d'une détérioration des fonctions cognitives (apprentissage, intellect en général).

**Clonage** : Multiplication naturelle ou artificielle à l'identique d'un être vivant ou de cellules c'est-à-dire avec conservation exacte du même génome pour tous les descendants (les clones).

**Collagène** : Glycoprotéine fibreuse dont le rôle peut être comparé à une armature, sécrétée par les cellules des tissus conjonctifs.

**Creutzfeldt-Jakob (maladie de)** : Affection touchant le système nerveux central, due à un prion, dont l'évolution est progressive et qui se caractérise par une démence associée à des myoclonies.

**Crohn (maladie de)** : Maladie inflammatoire chronique touchant la partie terminale de l'iléon, suspectée d'être de nature auto-immune.

**Cytokine** : Substance soluble de communication synthétisée par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.

**Cytomégalovirus porcin** : Cause la rhinite chez les porcelets tandis que chez les porcs plus âgés, l'infection est infraclinique. Transmission par contact ou in-utéro. Symptômes de jetage, larmolements, éternuements, morbidité élevée, infection généralement inapparente mais parfois consécutive dans les élevages à haut statut sanitaire. Parce que le CMV porcin est capable d'infecter

les macrophages pulmonaires, on craint qu'il modifie les mécanismes de défense de l'hôte et qu'il se révèle pathogène pour l'homme en cas de xénogreffe.

**Débridement** : Synonyme de parage, retrait des adhérences fibreuses, des tissus nécrotiques, du pus.

**Derme** : Une des trois couches de la peau, situé sous l'épiderme (couche superficielle).

**Desquamation** : Exfoliation de l'épiderme sous forme de squames, qui sont des petits lambeaux de peau plus ou moins importants, ressemblant à des pellicules.

**Diabète de type I** : Diabète insulino-dépendant, nécessitant des injections d'insuline pour être traité.

**Diphthérie** : Maladie infectieuse contagieuse due à *Corynebacterium diphtheriae* ou bacille de Löffler-Klebs. Angine qui se caractérise par la formation de fausses membranes à l'entrée des voies respiratoires. Leur localisation sur le larynx provoque l'asphyxie par l'obstruction du conduit aérien : c'est le croup. Le bacille a la propriété de produire des toxines qui ont une affinité pour le myocarde (cœur), ce qui peut être responsable du décès de l'individu par atteinte cardiaque ou trouble du rythme cardiaque si il y a retard de diagnostic.

**Diurétique** : Terme caractérisant de façon générale ce qui augmente la sécrétion urinaire. Le plus souvent le terme diurétique est utilisé pour désigner des médicaments dont le rôle est d'accroître la sécrétion rénale de l'eau et des électrolytes.

**Donneur** : Le donneur est la personne ou l'animal sur lesquels le prélèvement d'organes et/ou de tissus a été effectué. Un donneur humain permet de greffer 4 personnes en moyenne.

**Dysurie** : Difficulté à uriner.

**Ecchymose** : Traumatisme, généralement causé par un impact, dans lequel les capillaires sont endommagés, permettant au sang de se diffuser dans les tissus avoisinants. Couramment appelé « bleu ».

**Éléphantiasis** : Augmentation très importante du volume d'un membre ou d'une autre partie du corps, due à un œdème (infiltration des tissus par de la lymphe) de consistance dure, donnant l'apparence d'un membre d'éléphant.

**Emphysème pulmonaire** : Augmentation de volume (dilatation) des alvéoles pulmonaires avec destruction de leur paroi élastique, ce qui entraîne l'impossibilité pour elles de se vider complètement, à l'expiration, de l'air qu'elles contiennent.

**Encéphalopathie Spongiforme Transmissible** : Ce terme se regroupent différentes maladies, dont la "maladie de la vache folle" et la "tremblante du mouton", ainsi que, chez l'homme, la « maladie de Creutzfeldt-Jakob ». Ces maladies se caractérisent par un temps d'incubation relativement long (entre plusieurs années et plusieurs dizaines d'années), par des lésions particulières de la moelle épinière et du cerveau, ainsi que par une évolution entraînant la mort.

**Endogène** : Désignant ce qui se produit dans un organisme ou qui émane de celui-ci.

**Endothélium** : Tissu constitué de cellules pavimenteuses aplaties attachées les unes aux autres et recouvrant l'intérieur du cœur et des vaisseaux

**Enhancer** : Plusieurs éléments de séquence très proches sur lesquels se fixent des facteurs de transcription.

**Enucléation** : Retrait du noyau d'un ovocyte.

**Eosinophile** : Leucocytes polynucléaires, s'attaque aux parasites de l'organisme, sans les phagocyter, joue un rôle dans l'allergie et l'inflammation.

**Epiderme** : Couche superficielle de la peau.

**Epilepsie** : Affection neurologique qui est le symptôme d'une hyperactivité cérébrale paroxystique pouvant se manifester par des convulsions ou une perte de conscience, voire par des hallucinations complexes.

**Epitope** : Déterminant antigénique, est une molécule qui peut être reconnue par un paratope (partie variable d'un anticorps).

**Erysipèle** : Infection de la peau d'origine bactérienne (streptocoque b-hémolytique), pouvant toucher également les tissus situés au-dessous de l'épiderme (derme et hypoderme).

**Erythème** : Rougeur congestive de la peau, diffuse ou localisée, s'effaçant à la vitropression.

**Escarre** : Destruction locale plus ou moins importante d'un tissu, due à une diminution de l'irrigation sanguine suite à un processus ischémique.

**Exogène** : Qualifie ce qui provient de l'extérieur de l'organisme.

**Facteur de Willebrand** : Stocké dans les granules des plaquettes, synthétisé aussi par les cellules endothéliales. Un des éléments nécessaire à l'hémostase primaire, active les plaquettes, assurant ainsi l'interaction entre les plaquettes et la paroi du vaisseau Transporte le facteur VIII. Un déficit qualitatif et/ou quantitatif est responsable de la maladie de von Willebrand.

**Facteur VIII** : Facteur anti-hémophilique A, joue un rôle central dans la coagulation.

**Fibrine** : Protéine filamenteuse issue du fibrinogène sous l'action de la thrombine lors de la coagulation sanguine.

**Fibrinogène** : Protéine du plasma sanguin qui se transforme en fibrine lors de la coagulation sanguine.

**Fibroblaste** : Cellule du tissu conjonctif. Le rôle le plus important des fibroblastes est de réparer les lésions dues à un traumatisme.

**Fibrose** : Transformation fibreuse de certains tissus à l'origine d'une augmentation du tissu conjonctif. Survient à la suite d'une destruction substantielle des tissus ou lorsqu'une inflammation a lieu à un endroit où les tissus ne se régèrent pas

**Fiel** : Bile.

**Gastro-entérite** : Infection inflammatoire caractérisée par une diarrhée, parfois associée à des vomissements et poussées de fièvre.

**Glycémie** : Taux de glucose dans le sang.

**Gonorrhée** : infection sexuellement transmissible. C'est une infection des organes génito-urinaires, due au gonocoque (*Neisseria gonorrhoeae*).

**Goutte** : Maladie due à un excès d'acide urique dans le sang. Souvent d'origine familiale, la goutte se manifeste par des douleurs articulaires dues à la précipitation de cristaux sous la peau autour de l'articulation, ainsi que par une atteinte des reins.

**Granulation** : Apparition d'un tissu de renouvellement vascularisé, caractérisé par une couleur rouge vif.

**Grefe** : Transfert de cellules, de tissus ou d'un organe prélevés soit sur le malade lui-même (autogrefe) ou sur un donneur (allogrefe ou xélogrefe) s'applique plus aux transpositions de tissus ou cellules (moelle osseuse).

**Grefe allogénique** : Grefe entre 2 individus différents au sein d'une même espèce.

**Grefe hétérotopique** : L'organe déficient est enlevé et remplacé par la greffe.

**Grefe orthotopique** : L'organe déficient n'est pas enlevé et l'organe greffé est placé en dehors de la position anatomique habituelle.

**Hématome** : collection de sang qui s'est enkystée, apparaissant généralement suite à une hémorragie à la suite d'un choc

**Hématophage** : Se dit d'un animal qui se nourrit de sang.

**Hémodynamique** : Concernant les propriétés du flux sanguin.

**Hémoglobine glyquée** : hémoglobine sur laquelle s'est fixée une molécule de glucose, sa concentration est dépendante de la glycémie (taux de glucose dans le sang). Son dosage permet de surveiller efficacement un traitement au long cours chez un diabétique.

**Hémophilie** : Maladie héréditaire liée au chromosome X et se caractérisant par un trouble de la coagulation du sang entraînant l'apparition de saignement le plus souvent de façon prolongé.

**Hémoptysie** : Émission par la bouche d'une certaine quantité de sang en provenance des voies respiratoires ou d'un organe voisin.

**Hémorroïde** : Groupement de vaisseaux sanguins ayant la forme d'une tumeur variqueuse due à la dilatation anormale d'une veine de l'anus et du rectum. Les hémorroïdes sont situées sous la muqueuse et sous la peau de cette région.

**Hémostase** : Désignant l'arrêt d'une hémorragie, survenant spontanément ou grâce à l'utilisation d'un procédé hémostatique thérapeutique.

**Hépatite** : Inflammation du tissu hépatique. Les formes les plus connues étant les formes virales (notées de A à G) et alcoolique.

**Hernie-discale** : Saillie du disque intervertébral, qui avance en dehors de ses limites habituelles.

**Hirudine** : Anticoagulant produit dans la salive de la sangsue.

**Histamine** : Médiateur chimique synthétisé par les granulocytes basophiles, libéré lors de réactions d'hypersensibilité.

**HIV** : Voir SIDA.

**HLA** : Appelé également histocompatibilité, le système HLA ou L-A système (de l'anglais Human Leucocyte Antigens) est le principal système faisant intervenir des antigènes (éléments non reconnus par l'organisme, donc considérés comme étrangers) dont dépend le succès d'une greffe

**Homozygote** : Se dit d'un gène qui, chez un individu, sera représenté par deux allèles (des variantes de ce gène) identiques.

**Hydrocolloïde (pansements)** : Sont constitués d'un polymère hydrophobe intégrant des particules hydrophiles (gélatine, pectine ou carboxyméthylcellulose). Au contact du liquide de la plaie, ces particules forment un gel absorbant l'exsudat et peut-être aussi des bactéries. Les pansements hydrocolloïdes ont un pouvoir d'absorption moyen et sont couverts sur la face externe par un film en polyuréthane perméable à l'air mais étanche aux liquides et aux germes. Ils peuvent rester appliqués pendant plusieurs jours.

**Hydropisie** : Anciennement employé en français pour désigner tout épanchement de sérosité dans une cavité naturelle du corps, ou entre les éléments du tissu conjonctif. Il pouvait donc être synonyme d' « œdème ». la plupart du temps le terme d'*hydropisie* en tant que maladie servait à désigner la cause principale d'œdèmes généralisés à savoir l'insuffisance cardiaque congestive.

**Hyperimmunisation** : Inoculation répétée d'une préparation antigénique à un animal en vue de la production d'un sérum très riche en anticorps.

**Hypersensibilité** : Réponse immunitaire disproportionnée par rapport à la dangerosité de l'intrus qui peut être une bactérie, un virus, une toxine, un allergène.

**Iatrogène** : Se dit d'un trouble, d'une maladie provoqués par un acte médical ou par les médicaments.

**Ichthyothérapie** : Thérapie faisant appel aux poissons.

**Iléocolite** : Inflammation de l'iléum et du colon.

**Immunoglobuline** : Glycoprotéine impliquée dans les phénomènes de reconnaissance, de liaison et d'adhésion des cellules.

**Immunosuppression** : Suppression ou réduction des réactions immunologiques spécifiques de l'organisme contre un antigène.

**Inerme** : Non armé, sans dent.

**Intima** : Tunique revêtant l'intérieur d'un vaisseau sanguin.

**Ischémie** : Diminution de l'apport sanguin artériel à un organe. Cette diminution entraîne essentiellement une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organe en dessous de ses besoins (**hypoxie**), et la perturbation, voire l'arrêt de sa fonction.

**Jaunisse** : Nom commun de l'ictère : coloration jaune de la peau, des muqueuses et du blanc de l'œil. L'ictère est dû à l'excès de bilirubine dans le sang.

**Kératinocyte** : Cellules constituant 90 % de l'épiderme et des phanères (ongles, cheveux, poils, plumes, écailles). Ils synthétisent la kératine (kératinisation), une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau, qui assure à la peau sa propriété d'imperméabilité et de protection extérieure.

**KO (knock out)** : Inactivation d'un gène par recombinaison homologue. Cela consiste à remplacer une version fonctionnelle d'un gène par une version altérée et non fonctionnelle. Le but est de comprendre le rôle de ce gène.

**Lancette** : Petit instrument comportant une lame plate et pointue, utilisé autrefois pour les saignées, les vaccinations ou l'incision d'abcès

**Lupus érythémateux disséminé** : Maladie systémique du tissu conjonctif, auto-immune, qui se manifeste différemment selon les individus.

**Lupus érythémateux systémique** : Lupus érythémateux disséminé.

**Lymphocyte** : Leucocytes qui ont un rôle majeur dans le système immunitaire. En termes de structure et de fonction, on distingue deux lignées lymphocytaires différentes : les lymphocytes B et T.

**Lymphome** : Tumeur se développant dans les organes lymphoïdes, mais ayant la particularité de pouvoir également apparaître dans d'autres organes.

**Lymphomes non-hodgkiniens, ou NHL** : Constituent un groupe de cancers dont l'origine est le système lymphatique et qui est caractérisé par une transformation maligne des lymphocytes.

**Lysosome** : Organites cellulaires de 0,2 à 0,5 microns présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes animales, à l'exception des hématies.

**Macrophage** : Cellules infiltrant les tissus, provient de la différenciation de leucocytes sanguins, les monocytes. Rôle de phagocyte et de cellule présentatrice d'antigène.

**Maladie inflammatoire chronique intestinale** : Comprennent deux maladie auto-immunes aux symptômes identiques (douleurs abdominales, diarrhée, vomissement, rectorragie, perte ou gain de poids). La maladie de Crohn pouvant concerner tout le tube digestif.

La rectocolite hémorragique (RCH) (ou colite ulcéreuse) limitée aux régions du rectum et parfois du côlon

**Mastocyte** : Cellule granuleuse présente essentiellement dans les tissus conjonctifs, qui se caractérise par la présence dans son cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs chimiques comme la sérotonine, l'histamine, la tryptase ou l'héparine. Lorsqu'il est en contact avec un allergène et qu'il présente à sa surface les IgE spécifiques de celui-ci, il dégranule et libère ces médiateurs de façon très rapide, par un mécanisme d'exocytose. Il déclenche ainsi des réactions allergiques immédiates, parfois graves, comme un choc anaphylactique.

**Méningite** : Caractérisant toutes les inflammations aiguës ou chroniques des méninges cérébrales et médullaires et du liquide céphalo-rachidien, indépendamment de la cause.

**Microangiopathie thrombotique** : Présence de thrombus multiples localisés sur les petits (*micro*) vaisseaux (*angio-*).

**Monoclonal** : Se dit d'un type d'anticorps reconnaissant un seul même épitope car ils sont issus d'une seule lignée de plasmocytes, provenant d'une seule cellule. Ils sont le produit d'une fusion entre un lymphocyte B et une cellule cancéreuse (myélome).

**Monocyte** : Cellule sanguine de la famille des leucocytes, évolue en macrophage.

**Mosaïque** : Voir chimère

**Mucoviscidose** : Pour « maladie des mucus visqueux » en français ou *cystic fibrosis* (pour « fibrose kystique », sous-entendue du pancréas, en anglais). Maladie génétique létale à transmission autosomique récessive, affectant les épithéliums glandulaires de nombreux organes. Due à une mutation du gène codant pour un canal ionique perméable au chlore dont la fonction est de réguler le transport du chlore à travers les membranes cellulaires. Le dysfonctionnement provoque une augmentation de la viscosité du mucus et son accumulation dans les voies respiratoires et digestives.

**Mumie** : Médicament fait à partir de momies réduites en poudre.

**Myase** : ensemble des troubles provoqués par la présence dans un corps humain ou animal de larves de diptères parasites des familles *Calliphoridae*, *Sarcophagidae*, *Cuterebridae*, *Muscidae*.

**Nécrose** : Arrêt pathologique du fonctionnement d'une cellule, aboutissant à la mort de la cellule.

**Névrite** : Lésion nerveuse d'origine inflammatoire ou dégénérative.

**Nociception** : Phénomènes permettant l'intégration au niveau du système nerveux central d'un stimulus douloureux.

**Œdème** : Rétention anormale de liquide dans les tissus de l'organisme.

**Ophthalmie** : Inflammation de l'œil.

**Opothérapie** : Utilisation thérapeutique d'organes ou d'extraits d'organes d'origine animale.

**Ostéomyélite** : Inflammation de la moelle osseuse et du tissu osseux adjacent causée par une infection.

**Ostéoarthrite** : Forme d'arthrite = arthrite dégénérative = arthrose

**Papule** : Lésion élémentaire sèche de la peau se caractérisant par un léger relief cutané, de forme et dimension variable (5 mm de diamètre au plus). La coloration de la papule varie du rosé au brun (plus rarement) en passant par le rouge le plus souvent.  
Par extension, on parlera d'individu homozygote pour ce gène.

**Parage** : Voir débridement.

**Paraplégie** : Paralysie plus ou moins complète des deux membres inférieurs et de la partie basse du tronc, portant sur tout le territoire situé plus bas que la lésion de la moelle épinière qui la provoque.

**Parkinson (maladie de)** : Maladie neurologique due à la dégénérescence des cellules nerveuses d'une zone située à l'intérieur du cerveau : le locus niger et se caractérisant, entre autres, par un tremblement, une lenteur des mouvements et une raideur.

**Parvovirus porcin** : A l'origine de mortalité foetale et de foetus momifiés chez la truie.

**Peptide C** : Peptide de connexion, fait partie de la proinsuline, sont excision donne alors l'insuline. Le peptide C est dégradé dans le rein.

**Phagocyte** : Cellules pouvant ingérer et détruire des particules de taille variable, comprend les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (granulocytes, monocytes).

**Pharyngite** : Inflammation du pharynx.

**Phlébite** : Inflammation d'une veine.

**Phlébotomie** : Terme ancien désignant un prélèvement sanguin pratiqué sur un malade afin d'améliorer son état.

**Phlegmon** : Infection sans collection, à l'inverse de l'abcès qui est collecté.

**Phthisie** : Désigne une des formes de la tuberculose.

**Placebo** : Substance sans principe actif mais qui, en raison de son aspect, peut agir par un mécanisme psychologique sur un sujet croyant prendre une substance thérapeutique.

**Plaquettes (ou thrombocyte)** : Élément figuré du sang, formé dans la moelle osseuse, mais qui se fragmente immédiatement en petits éléments. Indispensables à l'hémostase primaire.

**Plasma** : Partie liquidienne du sang participant à la composition de certains tissus, obtenu après centrifugation sur tube avec anticoagulant.

**Pleurésie** : Inflammation de la plèvre survenant de façon aiguë ou chronique. Présence ou non de liquide (épanchement).

**Pneumonie** : Inflammation des poumons causée le plus souvent par une infection ou, rarement, par un agent irritant chimique ou physique.

**Polyclonal** : Caractérise un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné

**Polycythémie** : Augmentation remarquable de la masse totale d'érythrocytes circulant dans le corps.

**Précolostrum** : Colostrum avant la mise bas

**Prion** : Type d'agent pathogène de nature protéique (constitué d'une protéine ayant adopté une conformation ou un repliement anormal) qui au contraire des agents infectieux conventionnels est exempt d'acide nucléique (ADN et ARN) comme support de l'information infectieuse. Les prions de mammifères sont les agents causals responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles.

**Promoteur** : Correspond à une séquence promotrice située à proximité d'un gène et indispensable à la transcription, sur laquelle se fixe l'ARN polymérase.

**Protéine C** : Anticoagulante par inactivation des facteurs Va et VIIIa.

**Psoriasis** : Maladie de peau auto-immune, caractérisée par des plaques rouges délimitées, contenant des papules, et des squames. Celles-ci sont épaisses, de couleur grisâtre ou argentée, et adhèrent à la peau. Au grattage, les squames se détachent facilement sous forme de petites lamelles, ressemblant à une dermite après un coup de soleil. La persistance du grattage entraîne une zone hémorragique.

**Purpura thrombocytopénique auto-immun** : Destruction plaquettaire périphérique de nature auto-immune par des anticorps antiplaquettes. Le purpura est extravasation d'hématies dans le derme, rougeur ne s'effaçant pas à la vitropression, les tâches supérieures à 3mm, devenant brunâtres à jaunâtres.

**Pustule** : Lésion cutanée se caractérisant par un soulèvement bien délimité de l'épiderme et contenant du pus.

**Recombinaison homologue** : Échange de fragment d'ADN au sein d'une paire de chromosomes ou entre un morceau d'ADN qui peut se combiner avec un site d'ADN spécifique.

**Recombinant** : Se dit d'un ADN composée de séquences nucléotidiques provenant de plusieurs sources et d'un organisme ou protéine produit à partir d'un ADN recombinant.

**Rejet cellulaire** : Dans les semaines suivant la greffe, rejet dû aux lymphocytes T.

**Rejet suraigu** : Se manifeste dans les heures qui suivent le rétablissement de la continuité vasculaire par un infarctus du transplant, parfois associé à une coagulopathie de consommation.

**Rejet vasculaire** : Dans les jours suivant la greffe, caractérisé par un infiltrat cellulaire composé en majorité de monocyte, de cellules *Natural killer*, associé à l'activation des cellules endothéliales du greffon

**Rejet**: Ensemble du processus de défense d'un organisme contre tout corps étranger vivant.

**Rhinite** : Irritation et l'inflammation des muqueuses de la cavité nasale.

**Saxifrage** : Plante herbacée vivace de la famille des Saxifragacées appartenant au genre *Saxifraga*.

**Scarlatine** : Infection assez rare de l'enfant, contagieuse (inhalation de gouttelettes de salive), due au streptocoque B. hémolytique du groupe A. L'infection se développe à partir d'une zone contenant du pus au niveau du pharynx et des amygdales (angine). Le streptocoque responsable de la scarlatine sécrète une toxine de l'éruption appelée toxine érythrogyène.

**Schizophrénie** : Regroupe de manière générique un ensemble d'affections psychiatriques présentant un noyau commun, mais dites différentes quant à leur présentation et leur évolution. Altérations de la perception de la réalité (délire), des troubles cognitifs, et des dysfonctionnements sociaux et comportementaux plus ou moins importants.

**Sclérose en plaque** : Maladie démyélinisante du système nerveux central et très rarement du système nerveux périphérique. Se traduit par une sclérose de la substance blanche sous forme de plaques. Ces plaques empêchent les fibres nerveuses atteintes de conduire l'influx nerveux, entraînant des troubles d'intensité et de localisation très variables, en fonction de la zone où elles apparaissent.

**Sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot)** : Affection neurologique touchant le système nerveux central de l'adulte et entraînant une lésion des cellules nerveuses (neurones) qui provoque une paralysie progressive.

**Sérum** : Partie liquidienne du sang contenant les éléments figurés, obtenu après coagulation du sang, ne contient donc pas de fibrinogène contrairement au plasma.

**SIDA** : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis, ensemble de symptômes consécutifs à la destruction de plusieurs cellules du système immunitaire par un rétrovirus (le VIH pour l'Homme).

**Spasticité** : Augmentation exagérée et permanente du tonus musculaire d'un muscle au repos. Cette affection est secondaire à une maladie neurologique (tumeur, problème vasculaire, transformation progressive du tissu nerveux en un tissu inerte).

**Squame** : Lamelle se détachant de la peau.

**Symbiote** : Organisme qui transforme une substance de l'hôte non assimilable en une substance que l'hôte peut assimiler.

**Synovie** : Liquide incolore, transparent et filant sécrété par la synoviale qui est la membrane qui tapisse la face interne de la capsule des articulations mobiles (appelée également diarthrose). Permet de lubrifier les surfaces articulaires et de faciliter leur glissement pendant que les mouvements.

**Syphilis** : Maladie infectieuse sexuellement transmissible, très contagieuse et inoculable, due à une bactérie : *Treponema pallidum*.

**Térébenthine** : Oléorésine jaune ou brunâtre selon l'origine de l'arbre (résineux) dont elle est extraite.

**Tétanos** : Maladie infectieuse aiguë, grave et potentiellement mortelle, due à *Clostridium tetani*, un bacille sporulant anaérobie strict et ubiquitaire dont les spores sont souvent retrouvées dans la terre. Le tétanos est causé par la contamination d'une plaie par des spores de *Clostridium tetani*, qui vont ensuite germer et se transformer en bacille sécrétant une neurotoxine qui migre le long des axones des nerfs moteurs jusqu'à la moelle épinière et le tronc cérébral, entraînant des contractures musculaires caractéristiques, des spasmes et des convulsions et éventuellement la mort.

**Thalassémie** : Défaut de synthèse de l'hémoglobine, se rencontre essentiellement dans les populations du bassin méditerranéen, transmise le plus souvent selon un mode autosomique récessif. Se traduit par une anémie assez importante. On observe également une hypertrophie de la rate et des déformations du crâne et des os longs dans cette maladie.

**Thériaque** : Pâte de consistance un peu plus solide que le miel, célèbre contrepoison, préparé par les apothicaires, la composition de la thériaque a beaucoup varié.

**Thrombine** : Enzyme possédant la capacité de transformer le fibrinogène en fibrine.

**Thrombopénie** : Diminution du nombre de plaquettes sanguines en dessous du seuil de 150 000 plaquettes / mm<sup>3</sup>.

**Thrombose** : Formation d'un caillot (thrombus) dans un vaisseau sanguin ou dans une des cavités du cœur chez un être vivant.

**Toxoplasmose** : Infection parasitaire dont l'agent est le protozoaire *Toxoplasma gondii*. Le parasite infecte le plus souvent des animaux à sang chaud, y compris l'être humain, mais son hôte définitif est un félin. Sans gravité dans l'immense majorité des cas pour les sujets immunocompétents, elle ne présente de risque sérieux que pour les femmes enceintes séronégatives et les sujets ayant un système de défense immunitaire affaibli.

**Transchromosomique** : Caractérise un organisme dans lequel un chromosome artificiel a été introduit.

**Transcription** : Processus biologique ubiquitaire qui, au niveau de la cellule, copie des régions codantes de l'ADN en molécules d'ARN (support de la traduction en protéine)

**Transfection** : Introduction d'ADN étranger dans une cellule hôte.

**Transfert nucléaire** : Méthode remplaçant l'ADN d'un ovocyte par l'ADN provenant d'une cellule somatique (donneur). L'ovocyte est capable de reprogrammer l'ADN de la cellule somatique et ainsi poursuivre un développement embryonnaire normal.

**Transgène** : Séquence isolée d'un gène, transférée d'un organisme à un autre, lors de la mise en œuvre de la transgénèse.

**Transgénèse** : Fait d'introduire un ou plusieurs gènes dans un organisme vivant.

**Transgénique** : Qualifie un organisme vivant dont le patrimoine génétique a été modifié par génie génétique.

**Transplantation** : Transfert d'un organe entier d'un donneur, impliquant le rétablissement de la continuité vasculaire afférente et efférente de cet organe avec l'appareil circulatoire du receveur. Cette définition distingue la transplantation de la greffe, qui consiste en un transfert de tissu ou de partie d'organe. Cependant dans un sens plus élargi le terme "greffe" est aujourd'hui employé pour parler de transplantation.

**Trichinellose** : Myosite (inflammation des muscles) fébrile provoquée par l'ingestion de viande crue ou peu cuite contenant des larves microscopiques du ver nématode *Trichinella*.

**Tripier** : Commerçant vendant des produits alimentaires qui comportent tous les viscères comestibles (et non comestibles par le passé) d'animaux (abats).

**Ulcère de la jambe** : Perte localisée de peau sur la jambe, survient généralement chez des personnes présentant une insuffisance veineuse, mais également après la survenue d'une phlébite.

**Ulcère** : Plaie ouverte de la peau, des yeux ou d'une membrane muqueuse, souvent provoquée, mais non exclusivement, par une abrasion initiale et entretenue généralement par une inflammation, une infection, et/ou des conditions de santé qui entravent la guérison.

**Varice** : Dilatations permanentes des veines, le plus souvent sur le membre inférieur. La varice des membres inférieurs est une veine sous cutanée dont le diamètre est supérieur à 3 mm. Les varices sont habituellement sinueuses. Elles sont le siège d'un reflux sanguin.

**Vésicatoire** : Qui provoque des ampoules sur la peau.

**Virus respiratoire syncytial** : Cause la plus fréquente, dans le monde, d'infections respiratoires des jeunes enfants.

**Xénotransplantation**: Transplantation d'organes ou de tissus entre espèces différentes (le mot grec « *xeno* » signifie ce qui est étranger).

**Xénozoonose** : Maladie animale est transmise par l'intermédiaire de la greffe.

**Zoonose** : Infection ou infestation naturellement transmissible de l'animal à l'homme et vice versa.

**Zymogène** : Composé protidique inactif, précurseur d'une enzyme.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Adams DH, Kadner A, Chen RH, Farivar RS. Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation*. 2001;8(1):36-40.
2. Aebischer P, Schlupe M, Déglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat. Med.* 1996;2(6):696-699.
3. Agence de la biomédecine. Accueil > La greffe : hier, aujourd'hui et demain > Les chiffres clés. *Tout savoir sur le don d'organe et de tissus*. Available at: <http://www.dondorganes.fr/Les-chiffres-cles.html> [Accédé Octobre 11, 2009].
4. Agence de la biomédecine. Accueil > La greffe > la pénurie d'organes. *Tout savoir sur le don d'organe et de tissus*. Available at: <http://www.dondorganes.fr/-La-greffe-.html> [Accédé Novembre 12, 2009].
5. Allan JS, Rose GA, Choo JK, Arn JS, Vesga L, Mawulawde K, Slisz JK, Allison K, Madsen JC. Morphometric analysis of miniature swine hearts as potential human xenografts. *Xenotransplantation*. 2001;8(2):90-93.
6. Ameil Claudette. Témoignages. *Sclérose en plaque et apithérapie*. Available at: <http://abeillealternative.free.fr/html/temoignages.html> [Accédé Octobre 10, 2009].
7. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002;13(2):117-123.
8. Apitherapy.com. Bee Venom A-Z Page. *Apitherapy.com, return to natural wisdom*. Available at: [http://www.apitherapy.com/products\\_venom.php](http://www.apitherapy.com/products_venom.php) [Accédé Octobre 8, 2009].
9. Augereau L. Contribution à l'étude de l'utilisation des sous-produits de l'abattoir. De la récolte et de la conservation des organes destinés à l'opothérapie. Thèse vétérinaire ENVV 1932:97.
10. Bachiller D, Schellander K, Peli J, Rüther U. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 1991;30(3):194-200.
11. Baer WS. The treatment of chronic osteomyelitis with maggot (larva of blow fly). *J Bone Joint Surg Am.* 1931;13(3):438-475.
12. Bager P, Arnved J, Rønborg S, Wohlfahrt J, Poulsen LK, Westergaard T, Petersen HW, Kristensen B, Thamsborg S, Roepstorff A, Kapel C, Melbye M. Trichuris suis ova therapy for allergic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800680> [Accédé Décembre 17, 2009].
13. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA,

- Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 1999;17(5):456-461.
14. Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas CN. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology.* 2002;57(1):275-284.
15. Bapat RD, Acharya BS, Juvekar S, Dahanukar SA. Leech therapy for complicated varicose veins. *Indian J. Med. Res.* 1998;107:281-284.
16. Bartholomew AM, Powelson J, Sachs DH, Bailin M, Boskovic S, Colvin R, Hong HZ, Johnson M, Kimikawa M, LeGuern A, Meehan S, Sablinski T, Wee SL, Cosimi AB. Tolerance in a concordant nonhuman primate model. *Transplantation.* 1999;68(11):1708-1716.
17. Bauters TGM, Buyle FMA, Verschraegen G, Vermis K, Vogelaers D, Claeys G, Robays H. Infection risk related to the use of medicinal leeches. *Pharm World Sci.* 2007;29(3):122-125.
18. BBC. 'Fish pedicure' a feet treat. Washington DC; 2008. Available at: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/americas/7532248.stm> [Accédé Novembre 20, 2009].
19. Biopharm Leeches one line. Biopharm 2005 Colour Brochure. 2005. Available at: <http://www.biopharm-leeches.com> [Accédé Juillet 27, 2009].
20. Biopharm Leeches one line. Leech information. *Biopharm Leeches - Suppliers of Medicinal Leeches Since 1812.* Available at: <http://www.biopharm-leeches.com/> [Accédé Juillet 28, 2009].
21. Brem G, Besenfelder U, Aigner B, Müller M, Liebl I, Schütz G, Montoliu L. YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.* 1996;44(1):56-62.
22. Brink MF, Bishop MD, Pieper FR. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology.* 2000;53(1):139-148.
23. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(24):11303-11307.
24. Brody GA, Maloney WJ, Hentz VR. Digit replantation applying the leech *Hirudo medicinalis*. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1989;(245):133-137.
25. Bruneau E. Allergies danger... *ActuAPI.* 2005;(30). Available at: <http://www.cari.be/medias/actuapi/actuapi30.pdf> [Accédé Octobre 8, 2009].
26. Buchholz CJ, Koller D, Devaux P, Mumenthaler C, Schneider-Schaulies J, Braun W, Gerlier D, Cattaneo R. Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J. Biol. Chem.* 1997;272(35):22072-22079.
27. Buchser E, Goddard M, Heyd B, Joseph JM, Favre J, de Tribolet N, Lysaght M, Aebischer P. Immunoisolated xenogenic chromaffin cell therapy for chronic pain. Initial clinical experience. *Anesthesiology.* 1996;85(5):1005-1012; discussion 29A-30A.

28. Buelow R, van Schooten W. The future of antibody therapy. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006;(4):83-106.
29. Butland BK, Strachan DP, Lewis S, Bynner J, Butler N, Britton J. Investigation into the increase in hay fever and eczema at age 16 observed between the 1958 and 1970 British birth cohorts. *BMJ.* 1997;315:717-21.
30. Byrne GW, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SM, Platt JL, Logan JS. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation.* 1997;63(1):149-155.
31. Candinas D, Lesnikoski BA, Robson SC, Miyatake T, Scesney SM, Marsh HC, Ryan US, Dalmaso AP, Hancock WW, Bach FH. Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation.* 1996;62(3):336-342.
32. Carrington CA, Richards AC, Cozzi E, Langford G, Yannoutsos N, White DJ. Expression of human DAF and MCP on pig endothelial cells protects from human complement. *Transplant. Proc.* 1995;27(1):321-323.
33. Cartier E, Combemale P. Utilisation des larves de *Lucilia sericata* pour la détersion des plaies chroniques. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie.* 2008;135(10):685-688.
34. Castro HJ, Mendez-Lnocencio JI, Omidvar B, Omidvar J, Santilli J, Nielsen HS, Pavot AP, Richert JR, Bellanti JA. A phase I study of the safety of honeybee venom extract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Allergy Asthma Proc.* 2005;26(6):470-476.
35. Chamagne. Le problème de l'opothérapie. *Revue de pathologie comparée.* 1926/05/20
36. Chang K, Qian J, Jiang M, Liu Y, Wu M, Chen C, Lai C, Lo H, Hsiao C, Brown L, Bolen J, Huang H, Ho P, Shih PY, Yao C, Lin W, Chen C, Wu F, Lin Y, Xu J, Wang K. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol.* 2002;2:5.
37. Chepeha DB, Nussenbaum B, Bradford CR, Teknos TN. Leech therapy for patients with surgically unsalvageable venous obstruction after revascularized free tissue transfer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2002;128(8):960-965.
38. Cherbulliez T, Domerego R. *Traité d'apithérapie (CD-Rom).* Ed : Amyris/Apiservices 2001.
39. Cho BH, Ahn HB. Microsurgical replantation of a partial ear, with leech therapy. *Ann Plast Surg.* 1999;43(4):427-429.
40. Clark AJ, Ali S, Archibald AL, Bessos H, Brown P, Harris S, McClenaghan M, Prowse C, Simons JP, Whitelaw CB. The molecular manipulation of milk composition. *Genome.* 1989;31(2):950-955.
41. Clark RF, McKinney PE, Chase PB, Walter FG. Immediate and delayed allergic reactions to Crotalidae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom. *Ann Emerg Med.* 2002;39(6):671-676.

42. Clément H. *Le traité Rustica de l'apiculture*. Paris: Rustica; 2006:1 vol. (528 p.).
43. Comité directeur pour la bioéthique, Comité européen de la santé. *Report on the state of the art in the field of xenotransplantation*. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2003. Available at: [http://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/Activities/06\\_Xenotransplantation\\_en/XENO%282003%291\\_SAR.pdf](http://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/Activities/06_Xenotransplantation_en/XENO%282003%291_SAR.pdf).
44. Comité directeur pour la bioéthique, Comité européen de la santé. *Rapport explicatif à la recommandation (2003) 10 du comité des ministres aux états membres sur la xénotransplantation*. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2003:35 p. Available at: [http://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/Activities/06\\_Xenotransplantation\\_en/INF\\_2003\\_12fxenoER.pdf](http://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/Activities/06_Xenotransplantation_en/INF_2003_12fxenoER.pdf).
45. Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, van den Hondel CA. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet. Biol.* 2001;33(3):155-171.
46. Conforti ML, Connor NP, Heisey DM, Vanderby R, Kunz D, Hartig GK. Development of a mechanical device to replace medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) for treatment of venous congestion. *J Rehabil Res Dev.* 2002;39(4):497-504.
47. Cooper DKC, Gollackner B, Knosalla C, Teranishi K. Xenotransplantation--how far have we come? *Transpl. Immunol.* 2002;9(2-4):251-256.
48. Cooper PJ, Chico ME, Vaca MG, Moncayo A, Bland JM, Mafla E, Sanchez F, Rodrigues LC, Strachan DP, Griffin GE. Effect of albendazole treatments on the prevalence of atopy in children living in communities endemic for geohelminth parasites: a cluster-randomised trial. *Lancet.* 2006;367(9522):1598-1603.
49. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2007;61(2):97-108.
50. Couvreur G, Moreau T. La sclérose en plaques. Ed : AFP 2009. Available at: [http://www.sclérose-en-plaques.apf.asso.fr/IMG/pdf/SEP\\_GC\\_Thibaut\\_Moreau\\_178-185.pdf](http://www.sclérose-en-plaques.apf.asso.fr/IMG/pdf/SEP_GC_Thibaut_Moreau_178-185.pdf).
51. Cozzi E, Vial C, Ostlie D, Farah B, Chavez G, Smith KGC, Bradley JR, Thiru S, Davies HFS, Wallwork J, White DJG, Goddard M, Friend PJ. Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts. *Xenotransplantation.* 2003;10(4):300-310.
52. Cregg J, Cereghino J, Shi J, Higgins D. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology.* 2000;16(1):23-52.
53. Croese J, O'neil J, Masson J, Cooke S, Melrose W, Pritchard D, Speare R. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut.* 2006;55(1):136-137.
54. Czaplicki J, Blońska B, Religa Z. The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human. *J. Heart Lung Transplant.* 1992;11(2 Pt 1):393-397.

55. Daeschlein G, Mumcuoglu KY, Assadian O, Hoffmeister B, Kramer A. In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. *Skin Pharmacol Physiol*. 2007;20(2):112-115.
56. d'Apice AJF, Cowan PJ. Xenotransplantation: the next generation of engineered animals. *Transpl. Immunol*. 2009;21(2):111-115.
57. Datar RV, Cartwright T, Rosen CG. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology (N.Y.)*. 1993;11(3):349-357.
58. de Chalain TM. Exploring the use of the medicinal leech: a clinical risk-benefit analysis. *J Reconstr Microsurg*. 1996;12(3):165-172.
59. Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P, Isacson O. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat. Med*. 1997;3(3):350-353.
60. Dehoux J, de la Parra B, Latinne D, Bazin H, Gianello P. Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation*. 2002;9(5):338-349.
61. Dehoux JP, Gianello P. Xenotransplantation. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci*. 2003;68(2 Pt A):21-29.
62. Demetriou AA, Brown RS, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann. Surg*. 2004;239(5):660-667; discussion 667-670.
63. Denman J, Hayes M, O'Day C, Edmunds T, Bartlett C, Hirani S, Ebert KM, Gordon K, McPherson JM. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology (N.Y.)*. 1991;9(9):839-843.
64. Denner J, Specke V, Schwendemann J, Tacke SJ. Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann. Transplant*. 2001;6(3):25-33.
65. Dieckhoff B, Karlas A, Hofmann A, Kues WA, Petersen B, Pfeifer A, Niemann H, Kurth R, Denner J. Inhibition of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in primary porcine cells by RNA interference using lentiviral vectors. *Arch. Virol*. 2007;152(3):629-634.
66. Docteur Abeille. Attraper les abeilles. *Docteur-abeille*. Available at: [http://www.docteur-abeille.com/html/attraper\\_les\\_abeilles.html#Prelevementabeilleshiver](http://www.docteur-abeille.com/html/attraper_les_abeilles.html#Prelevementabeilleshiver) [Accédé Octobre 8, 2009].
67. Docteur poisson. Garra Rufa, le poisson docteur. *Docteur poisson, le bien-être au naturel*. Available at: <http://www.docteurpoisson.fr/> [Accédé Novembre 20, 2009].

68. Dunn DA, Pinkert CA, Kooyman DL. Foundation Review: Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Discov. Today*. 2005;10(11):757-767.
69. Durrant C, Townley WA, Ramkumar S, Khoo CTK. Forgotten digital tourniquet: salvage of an ischaemic finger by application of medicinal leeches. *Ann R Coll Surg Engl*. 2006;88(5):462-464.
70. Dyck MK, Gagné D, Ouellet M, Sénéchal JF, Bélanger E, Lacroix D, Sirard MA, Pothier F. Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat. Biotechnol*. 1999;17(11):1087-1090.
71. Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard M. Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. *Trends Biotechnol*. 2003;21(9):394-399.
72. Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (N.Y.)*. 1991;9(9):835-838.
73. Ebert KM, DiTullio P, Barry CA, Schindler JE, Ayres SL, Smith TE, Pellerin LJ, Meade HM, Denman J, Roberts B. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnology (N.Y.)*. 1994;12(7):699-702.
74. Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson JM, Cole ES. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*. 1998;91(12):4561-4571.
75. Ekser B, Rigotti P, Gridelli B, Cooper DKC. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl. Immunol*. 2009;21(2):87-92.
76. Eldor A, Orevi M, Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Rev*. 1996;10(4):201-209.
77. Elliott DE, Urban JF JR, Argo CK, Weinstock JV. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *FASEB J*. 2000;14(12):1848-1855.
78. Elliott RB, Escobar L, Garkavenko O, Croxson MC, Schroeder BA, McGregor M, Ferguson G, Beckman N, Ferguson S. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant*. 2000;9(6):895-901.
79. Elliott RB, Escobar L, Tan PJJ. Long-term survival of alginate encapsulated piglet islets in a patient with type 1 diabetes. Dans: *Abstract OP-054*. Geneva; 2005.
80. Erb KJ. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends Immunol*. 2009;30(2):75-82.
81. Farr CJ, Bayne RA, Kipling D, Mills W, Critcher R, Cooke HJ. Generation of a human X-derived minichromosome using telomere-associated chromosome fragmentation. *EMBO J*. 1995;14(21):5444-5454.

82. Farrell PJ, Behie LA, Iatrou K. Transformed Lepidopteran insect cells: new sources of recombinant human tissue plasminogen activator. *Biotechnol. Bioeng.* 1999;64(4):426-433.
83. Fleming J, Fabry Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2007;61(2):85-89.
84. Flohr C, Tuyen LN, Lewis S, Quinnell R, Minh TT, Liem HT, Campbell J, Pritchard D, Hien TT, Farrar J, Williams H, Britton J. Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: A cross-sectional study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;118(6):1305-1311.
85. Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 1999;19(3):353-361.
86. Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R, Hirabayashi M, Suzuki T, Ueda M. Position-independent and high-level expression of human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic rats carrying a 210-kb YAC DNA. *Mol. Reprod. Dev.* 1997;47(2):157-163.
87. Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R, Kodaira K, Hirabayashi M, Suzuki T, Ueda M. High-level expressing YAC vector for transgenic animal bioreactors. *Mol. Reprod. Dev.* 1999;52(4):414-420.
88. Gagné MB, Pothier F, Sirard MA. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1991;29(1):6-15.
89. Gavin WG. The future of transgenics. *Regulatory Affairs Focus.* 2001;(6):13-19.
90. Geocities. General information about apitherapy. *Yahoo Geocities.* Available at: <http://www.geocities.com/apitherapy23/#faq3> [Accédé Octobre 8, 2009].
91. Ghabili K, Shoja MM, Parvizi M. Bee venom therapy: a probable etiology of aneurysm formation in aorta. *Med. Hypotheses.* 2009;73(3):459-460.
92. Giersing B, Dubovsky F. Malaria vaccine initiative. *BIOforum Europe.* 2006;34.
93. Gilbert A, Carnot P. *Médicaments animaux. Opothérapie.* Paris: J.-B. Baillière et fils; 1911:602p.
94. Giraldo P, Rival-Gervier S, Houdebine L, Montoliu L. The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Res.* 2003;12(6):751-755.
95. Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(40):14701-14706.
96. Goessl C, Steffen-Wilke K, Miller K. Leech therapy for massive scrotal hematoma following percutaneous transluminal angioplasty. *J. Urol.* 1997;158(2):545.
97. Goldman M. Processing challenges for transgenic milk products. *BioProcess. Int.* 2003;1(9):60-63.

98. Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, Faye L. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* 2005;23(11):559-565.
99. Gosling P. *Report of the workshop on porcine endogenous retroviruses..* London, UK: Xenotransplantation Interim Regulatory Authority; 1998:49p.
100. Gottlieb S, Wheeler MB. Genetically engineered animals and public health: Compelling Benefits for Health Care, Nutrition, the Environment, and Animal Welfare. 2008. Available at: [http://www.bio.org/foodag/animals/ge\\_animal\\_benefits.pdf](http://www.bio.org/foodag/animals/ge_animal_benefits.pdf).
101. Grassberger M, Hoch W. Ichthyotherapy as alternative treatment for patients with psoriasis: a pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006;3(4):483-488.
102. Gross MP, Apesos J. The use of leeches for treatment of venous congestion of the nipple following breast surgery. *Aesthetic Plast Surg.* 1992;16(4):343-348.
103. Groth CG, Tibell A, Tollemar J, Bolinder J, Östman J, Möller E, Reinholt FP, Korsgren O, Hellerström C. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *The Lancet.* 1994;344(8934):1402-1404.
104. GTC Biotherapeutics. GTC biotherapeutics et LFB biotechnologies développent un anticorps anti-CD20. *GTC Biotherapeutics.* 2007. Available at: <http://www.transgenics.com/pressreleases/pr080207-french.html> [Accédé Novembre 4, 2009].
105. GTC Biotherapeutics. Science and Technology > How it works. *GTC Biotherapeutics.* Available at: <http://www.transgenics.com/science.html> [Accédé Novembre 4, 2009].
106. Guillot B, Guilhou J. Le psoriasis et son traitement. *Revue du Rhumatisme.* 2002;69(6):615-623.
107. Gur E, Eldor A. Medicinal leeches for the salvage of a replanted digit. *Isr. Med. Assoc. J.* 1999;1(1):62.
108. Hagelin J. Public opinion surveys about xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2004;11(6):551-558.
109. Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischnewski H, Wildt S, Gerngross TU. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science.* 2003;301(5637):1244-1246.
110. Hammer C, Linke R, Wagner F, Diefenbeck M. Organs from animals for man. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998;116(1):5-21.
111. Hamza B. Xénogreffes et éthique. Dans: *Congrès Mondial des Vétérinaires Worldvet.* Tunis; 2002.
112. Harrington JJ, Van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat. Genet.* 1997;15(4):345-355.

113. Harvey RP, Degryse E, Stefani L, Schamber F, Cazenave JP, Courtney M, Tolstoshev P, Lecocq JP. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(4):1084-1088.
114. Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat. Biotechnol.* 2002;20(4):396-399.
115. Heckmann JG, Dütsch M, Neundörfer B, Dütsch F, Hartung U. Leech therapy in the treatment of median nerve compression due to forearm haematoma. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2005;76(10):1465.
116. Heller R, Brown KE, Burgtorf C, Brown WR. Mini-chromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(14):7125-7130.
117. Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.* 2004;22(11):1415-1422.
118. Hering BJ, Walawalkar N. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation. *Transpl. Immunol.* 2009;21(2):81-86.
119. Homère. *L'Iliade*. Gallimard.; 501p.
120. Hong S, Rim GS, Yang HI, Yin CS, Koh HG, Jang M, Kim C, Choe B, Chung J. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon.* 2005;46(1):39-45.
121. Horan R, Powell R, McQuaid S, Gannon F, Houghton JA. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch. Androl.* 1991;26(2):83-92.
122. Houdebine L. Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Current Opinion in Biotechnology.* 2002;13(6):625-629.
123. Houdebine L. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod. Domest. Anim.* 2005;40(4):269-281.
124. Houdebine L. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod. Domest. Anim.* 2005;40(4):269-281.
125. Houdebine L. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod. Domest. Anim.* 2005;40(4):269-281.
126. Houdebine L. Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol. Biol.* 2007;360:163-202.
127. Houdebine L. Préparation de protéines thérapeutiques à partir des animaux transgéniques = Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *STV. Sang thrombose vaisseaux.* 2008;20(1):43-50.

128. Houdebine L. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009;32(2):107-121.
129. Hsu S, Tseng P, Chen P. Trichuris suis therapy for ulcerative colitis: nonresponsive patients may need anti-helminth therapy. *Gastroenterology.* 2005;129(2):768-769; author reply 769.
130. Hugot J, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard J. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet.* 2003;362(9400):2012-2015.
131. Hullett JS, Spinnato GG, Ziccardi V. Treatment of an ear laceration with adjunctive leech therapy: a case report. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007;65(10):2112-2114.
132. Huntley A. A review of the evidence for efficacy of complementary and alternative medicines in MS. *Int MS J.* 2006;13(1):5-12, 4.
133. Husain ZS, Fallat LM. Maggot therapy for wound debridement in a traumatic foot-degloving injury: a case report. *J Foot Ankle Surg.* 2003;42(6):371-376.
134. Ishida I, Yoshida H, Tomizuka K. Production of a diverse repertoire of human antibodies in genetically engineered mice. *Microbiol. Immunol.* 1998;42(3):143-150.
135. Ishida I, Tomizuka K, Yoshida H, Tahara T, Takahashi N, Ohguma A, Tanaka S, Umehashi M, Maeda H, Nozaki C, Halk E, Lonberg N. Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. *Cloning Stem Cells.* 2002;4(1):91-102.
136. Ivarie R. Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol.* 2006;24(3):99-101.
137. Jeon Y, Kwak K, Kim S, Kim Y, Lim J, Baek W. Intrathecal implants of microencapsulated xenogenic chromaffin cells provide a long-term source of analgesic substances. *Transplant. Proc.* 2006;38(9):3061-3065.
138. Jésupret CA. L'atelier de collecte des organes destiné à l'opothérapie dans l'abattoir moderne. *Thèse vétérinaire ENVA* 1967:63p.
139. Jukema GN, Menon AG, Bernardts AT, Steenvoorde P, Taheri Rastegar A, van Dissel JT. Amputation-sparing treatment by nature: "surgical" maggots revisited. *Clin. Infect. Dis.* 2002;35(12):1566-1571.
140. Kamihira M, Kawabe Y, Shindo T, Ono K, Esaka K, Yamashita T, Nishijima K, Iijima S. Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *J. Biotechnol.* 2009;141(1-2):18-25.
141. Karatzas CN, Turner JD. Toward altering milk composition by genetic manipulation: current status and challenges. *J. Dairy Sci.* 1997;80(9):2225-2232.
142. Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.* 2000;120(2):231-237.
143. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, Shaffer J, Preffer FI, Ding R, Sharma V, Fishman JA, Dey B, Ko DSC, Hertl M, Goes NB, Wong W,

- Williams WW, Colvin RB, Sykes M, Sachs DH. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(4):353-361.
144. Kazandjieva J, Grozdev I, Darlenski R, Tsankov N. Climatotherapy of psoriasis. *Clin. Dermatol.* 2008;26(5):477-485.
145. Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A, Karatzas CN. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 2001;64(3):849-856.
146. Kerr DE, Liang F, Bondioli KR, Zhao H, Kreibich G, Wall RJ, Sun TT. The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat. Biotechnol.* 1998;16(1):75-79.
147. Kim H, Kwon Y, Ham T, Roh D, Yoon S, Lee H, Han H, Yang I, Beitz AJ, Lee J. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 2003;65(3):349-355.
148. Klose R, Kemter E, Bedke T, Bittmann I, Kelsser B, Endres R, Pfeffer K, Schwinzer R, Wolf E. Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation.* 2005;80(2):222-230.
149. Koles K, van Berkel PHC, Pieper FR, Nuijens JH, Mannesse MLM, Vliegenthart JFG, Kamerling JP. N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology.* 2004;14(1):51-64.
150. Kozlowski T, Shimizu A, Lambrigts D, Yamada K, Fuchimoto Y, Glaser R, Monroy R, Xu Y, Awwad M, Colvin RB, Cosimi AB, Robson SC, Fishman J, Spitzer TR, Cooper DK, Sachs DH. Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regimen and antibody adsorption. *Transplantation.* 1999;67(1):18-30.
151. Kradin RL, Badizadegan K, Auluck P, Korzenik J, Lauwers GY. Iatrogenic *Trichuris suis* infection in a patient with Crohn disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006;130(5):718-720.
152. Kuroiwa Y, Shinohara T, Notsu T, Tomizuka K, Yoshida H, Takeda S, Oshimura M, Ishida I. Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(14):3447-3448.
153. Kuroiwa Y, Tomizuka K, Shinohara T, Kazuki Y, Yoshida H, Ohguma A, Yamamoto T, Tanaka S, Oshimura M, Ishida I. Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. *Nat. Biotechnol.* 2000;18(10):1086-1090.
154. Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ, Naeem R, Tomizuka K, Sullivan EJ, Knott JG, Duteau A, Goldsby RA, Osborne BA, Ishida I, Robl JM. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat. Biotechnol.* 2002;20(9):889-894.
155. Kuwaki K, Tseng Y, Dor FJMF, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman H, Sachs DH, Cooper DKC. Heart

transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med.* 2005;11(1):29-31.

156. Kwon YB, Kim JH, Yoon JH, Lee JD, Han HJ, Mar WC, Beitz AJ, Lee JH. The analgesic efficacy of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis: a comparative study with needle acupuncture. *Am. J. Chin. Med.* 2001;29(2):187-199.

157. Laclotte C, Oussalah A, Rey P, Bensenane M, Pluvinage N, Chevaux J, Trouilloud I, Serre A, Boucekkine T, Bigard M, Peyrin-Biroulet L. Helminthes et maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* 2008;32(12):1064-1074.

158. Lanza RP, Kühnreiter WM. Xenotransplantation and cell therapy: progress and controversy. IBC's 4th International Conference on Xenotransplantation and Cell Therapy. Boston, MA, USA, 10-11 December 1998. *Mol Med Today.* 1999;5(3):105-106.

159. Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol. Reprod. Dev.* 2003;64(3):284-291.

160. Lee J, Park H, Chae Y, Lim S. An Overview of Bee Venom Acupuncture in the Treatment of Arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005;2(1):79-84.

161. Lee MS, Pittler MH, Shin B, Kong JC, Ernst E. Bee venom acupuncture for musculoskeletal pain: a review. *J Pain.* 2008;9(4):289-297.

162. Lee NJ, Peckitt NS. Treatment of a sublingual hematoma with medicinal leeches: report of case. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1996;54(1):101-103.

163. Lémery N, Benard P, Fontenelle B. *La pharmacopée universelle.* Houilles: Éd. Manucius; 2007:1 vol. (187 p.).

164. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM, Matas AJ. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation.* 1993;55(4):857-865; discussion 865-866.

165. Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, Sang HM. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov. Today.* 2005;10(3):191-196.

166. Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang HM. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(6):1771-1776.

167. Lin CC, Cooper DKC, Dorling A. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transpl. Immunol.* 2009;21(2):75-80.

168. Lineaweaver WC, O'Hara M, Stridde B, Valauri FA, Buncke HJ. Clinical leech use in a microsurgical unit: the San Francisco experience. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1991;2(1):189-192.

169. Lineaweaver WC, Hill MK, Buncke GM, Follansbee S, Buncke HJ, Wong RK, Manders EK, Grotting JC, Anthony J, Mathes SJ. *Aeromonas hydrophila* infections following use of medicinal leeches in replantation and flap surgery. *Ann Plast Surg.* 1992;29(3):238-244.
170. Linneberg A, Gislum M, Johansen N, Husemoen LLN, Jørgensen T. Temporal trends of aeroallergen sensitization over twenty-five years. *Clin. Exp. Allergy.* 2007;37(8):1137-1142.
171. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004;126(6):1504-1517.
172. Cooper D.C.K. Outwitting Evolution - Progress Towards Clinical Xenotransplantation. *The Journal of Surgery.* 2003;1(1):9-14.
173. Madsen JC, Hoerbelt R. Xenotransplantation. Dans: *Surgical Management of Congestive Heart Failure.*; 2005:239-277. Available at: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-842-0:239> [Accédé Décembre 18, 2009].
174. Makowa L, Cramer DV, Hoffman A, Breda M, Sher L, Eiras-Hreha G, Tusso PJ, Yasunaga C, Cosenza CA, Wu GD. The use of a pig liver xenograft for temporary support of a patient with fulminant hepatic failure. *Transplantation.* 1995;59(12):1654-1659.
175. Malassis S. Les sangsues. Ordre national des pharmaciens 2005. Available at: [http://www.ordre.pharmacien.fr/fr/jaune/index3\\_synthese1.asp?id=186&lib=Histoire%20et%20art%20pharmaceutique](http://www.ordre.pharmacien.fr/fr/jaune/index3_synthese1.asp?id=186&lib=Histoire%20et%20art%20pharmaceutique) [Accédé Juillet 27, 2009].
176. Markaki M, Drabek D, Livadaras I, Craig RK, Grosveld F, Savakis C. Stable expression of human growth hormone over 50 generations in transgenic insect larvae. *Transgenic Res.* 2007;16(1):99-107.
177. Martin U, Winkler ME, Id M, Radecke H, Arseniev L, Grotelüschen R, Simon AR, Steinhoff G. Transmission of pig endogenous retrovirus to primary human cells. *Transplant. Proc.* 2000;32(5):1157.
178. Massoud M, Attal J, Thépot D, Pointu H, Stinnakre MG, Théron MC, Lopez C, Houdebine LM. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.* 1996;36(5):555-563.
179. Mayer L. A novel approach to the treatment of ulcerative colitis: is it kosher? *Gastroenterology.* 2005;128(4):1117-1119.
180. Mazzucato M, De Marco L, Pradella P, Masotti A, Pareti FI. Porcine von Willebrand factor binding to human platelet GPIb induces transmembrane calcium influx. *Thromb. Haemost.* 1996;75(4):655-660.
181. McKay DM. The therapeutic helminth? *Trends in Parasitology.* 2009;25(3):109-114.
182. Medvei VC. *The history of clinical endocrinology : a comprehensive account of endocrinology from earliest times to the present day.* Carnforth, Lancs., UK: Parthenon Pub. Group ; 1993:XIX-551 p.

183. Menage MJ, Wright G. Use of leeches in a case of severe periorbital haematoma. *Br J Ophthalmol*. 1991;75(12):755-756.
184. Mercer NS, Beere DM, Bornemisza AJ, Thomas P. Medical leeches as sources of wound infection. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987;294(6577):937.
185. Meyer T, Höcht B, Ulrichs K. Xenogeneic islet transplantation of microencapsulated porcine islets for therapy of type I diabetes: long-term normoglycemia in STZ-diabetic rats without immunosuppression. *Pediatr. Surg. Int*. 2008;24(12):1375-1378.
186. Michalsen A, Moebus S, Spahn G, Esch T, Langhorst J, Dobos GJ. Leech therapy for symptomatic treatment of knee osteoarthritis: results and implications of a pilot study. *Altern Ther Health Med*. 2002;8(5):84-88.
187. Michalsen A, Klotz S, Lüdtke R, Moebus S, Spahn G, Dobos GJ. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med*. 2003;139(9):724-730.
188. Michalsen A, Lüdtke R, Cesur O, Afra D, Musial F, Baecker M, Fink M, Dobos GJ. Effectiveness of leech therapy in women with symptomatic arthrosis of the first carpometacarpal joint: a randomized controlled trial. *Pain*. 2008;137(2):452-459.
189. Mineo M, Jolley T, Rodriguez G. Leech therapy in penile replantation: a case of recurrent penile self-amputation. *Urology*. 2004;63(5):981-983.
190. Modlin IM, Kidd M, Farhadi J. Bayliss and Starling and the nascence of endocrinology. *Regul. Pept*. 2000;93(1-3):109-123.
191. Morgan BP, Berg CW, Harris CL. "Homologous restriction" in complement lysis: roles of membrane complement regulators. *Xenotransplantation*. 2005;12(4):258-265.
192. Mortenson BW, Dawson KH, Murakami C. Medicinal leeches used to salvage a traumatic nasal flap. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998;36(6):462-464.
193. Mortimer K, Brown A, Feary J, Jagger C, Lewis S, Antoniak M, Pritchard D, Britton J. Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with *Necator americanus* in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2006;75(5):914-920.
194. Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, Bichucher H, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Raz I. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *Int. J. Dermatol*. 1999;38(8):623-627.
195. Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol*. 2001;38(2):161-166.
196. Murray TJ. Complementary and alternative medicine for MS. *Int MS J*. 2006;13(1):3.
197. Nagler-Anderson C. Helminth-induced immunoregulation of an allergic response to food. *Chem Immunol Allergy*. 2006;90:1-13.

198. Nexia Biotechnologies Inc. Technologie > Bien-être des animaux. *Nexia Biotechnologies*. Available at: [http://www.nexiabiotech.com/fr/01\\_tech/06.php](http://www.nexiabiotech.com/fr/01_tech/06.php) [Accédé Novembre 4, 2009].
199. Nexia Biotechnologies Inc. Notions élémentaires de biologies> Nos chèvres. *Nexia Biotechnologies*. Available at: [http://www.nexiabiotech.com/fr/03\\_bio/03.php](http://www.nexiabiotech.com/fr/03_bio/03.php) [Accédé Novembre 4, 2009].
200. Nexia Biotechnologies Inc. Technologie> Développement de produits> Protexia MC. *Nexia Biotechnologies*. Available at: [http://www.nexiabiotech.com/fr/01\\_tech/01-ptx.php](http://www.nexiabiotech.com/fr/01_tech/01-ptx.php) [Accédé Novembre 4, 2009].
201. Niemann H, Halter R, Carnwath JW, Herrmann D, Lemme E, Paul D. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res.* 1999;8(3):237-247.
202. Niemann H, Verhoeyen E, Wonigeit K, Lorenz R, Hecker J, Schwinzer R, Hauser H, Kues WA, Halter R, Lemme E, Herrmann D, Winkler M, Wirth D, Paul D. Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation.* 2001;72(12):1898-1906.
203. Niemann H, Kues WA. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim. Reprod. Sci.* 2003;79(3-4):291-317.
204. Oldmixon BA, Wood JC, Ericsson TA, Wilson CA, White-Scharf ME, Andersson G, Greenstein JL, Schuurman H, Patience C. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J. Virol.* 2002;76(6):3045-3048.
205. Orsolić N, Sver L, Verstovsek S, Terzić S, Basić I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon.* 2003;41(7):861-870.
206. Özçelik S, Polat HH, Akyol M, Yalçın AN, Özçelik D, Marufihah M. Kangal hot spring with fish and psoriasis treatment. *J. Dermatol.* 2000;27(6):386-390.
207. Ozer Z, Akpınar M, Ackay M, et al. Investigation of some chemical and biological properties of Kangal (Sivas) Fishy Hot Springs. *Fen Bilimleri Dergisi.* 1987;Suppl 5:1-34.
208. Paleyanda RK, Velandar WH, Lee TK, Scandella DH, Gwazdauskas FC, Knight JW, Hoyer LW, Drohan WN, Lubon H. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat. Biotechnol.* 1997;15(10):971-975.
209. Palmer CA, Lubon H, McManaman JL. Transgenic mice expressing recombinant human protein C exhibit defects in lactation and impaired mammary gland development. *Transgenic Res.* 2003;12(3):283-292.
210. Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science.* 1999;285(5431):1236-1241.

211. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 1997;3(3):282-286.
212. Petersen B, Carnwath JW, Niemann H. The perspectives for porcine-to-human xenografts. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009;32(2):91-105.
213. Petite JN, Mozdziak PE. The incredible, edible, and therapeutic egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(6):1739-1740.
214. Pharming Group NV. Produits. *Pharming*. Available at: <http://www.pharming.com/index.php?act=prod> [Accédé Novembre 4, 2009].
215. Pharming Group NV. Pharming Recombinant Human C1 Inhibitor: Results In Pre-clinical Ischaemic Reperfusion Model Confirm Potential For New Indications. *Pharming*. Available at: <http://www.pharming.com/> [Accédé Novembre 4, 2009].
216. Plaut M, Valentine MD. Clinical practice. Allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(18):1934-1944.
217. Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J. Immunol. Methods.* 1999;231(1-2):147-157.
218. Powell K. Barnyard biotech--lame duck or golden goose? *Nat. Biotechnol.* 2003;21(9):965-967.
219. Prete PE. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 1997;60(8):505-510.
220. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 2002;20(5):200-206.
221. Pursel VG, Bolt DJ, Miller KF, Pinkert CA, Hammer RE, Palmiter RD, Brinster RL. Expression and performance in transgenic pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1990;40:235-245.
222. Pursel VG, Rexroad CE. Status of research with transgenic farm animals. *J. Anim. Sci.* 1993;71 Suppl 3:10-19.
223. Quinn G, Wood J, Suling K, Arn S, Sachs DH, Schuurman H, Patience C. Genotyping of porcine endogenous retroviruses from a family of miniature swine. *J. Virol.* 2004;78(1):314-319.
224. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology.* 2000;10(5):477-486.
225. Ramirez P, Chavez R, Majado M, Munitiz V, Muñoz A, Hernandez Q, Palenciano CG, Pino-Chavez G, Loba M, Minguela A, Yelamos J, Gago MR, Vizcaino AS, Asensi H, Cayuela MG, Segura B, Marin F, Rubio A, Fuente T, Robles R, Bueno FS, Sansano T, Acosta F, Rodriguez JM, Navarro F, Cabezuelo J, Cozzi E, White DJ, Calne RY, Parrilla P. Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the

- metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days. *Transplantation*. 2000;70(7):989-998.
226. Rao J, Whitaker IS. Use of *Hirudo medicinalis* by maxillofacial surgical units in the United Kingdom: current views and practice. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2003;41(1):54-55.
227. Raynal-Cartabas C. *Guérir avec les Abeilles, Apithérapie et Médecine Chinoise*. 2005 éd. Guy Tredaniel; :171p.
228. Reemtsma K. Xenotransplantation a personal history. Dans: *Xenograft 25*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam: Hardy M. A. ; 1989:7-16.
229. Reyes JL, Terrazas LI. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunol*. 2007;29(12):609-619.
230. Rho YH, Woo J, Choi SJ, Lee YH, Ji JD, Song GG. A new onset of systemic lupus erythematosus developed after bee venom therapy. *Korean J. Intern. Med*. 2009;24(3):283-285.
231. Ricarimpex. La sangsue. *Ricarimpex - Elevage de sangsues*. Available at: <http://www.sangsue-medicinale.com/default.php> [Accédé Décembre 18, 2009].
232. Ricarimpex. Les applications médicales. *Ricarimpex - Elevage de sangsues*. Available at: <http://www.sangsue-medicinale.com/default.php> [Accédé Juillet 28, 2009].
233. Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM, Kuroiwa Y. Production of cattle lacking prion protein. *Nat. Biotechnol*. 2007;25(1):132-138.
234. Ringe B, Lorf T, Braun F. The future of xenotransplantation: clinical and ethical considerations. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 1999;13(2):227-239.
235. Rival-Gervier S, Viglietta C, Maeder C, Attal J, Houdebine L. Position-independent and tissue-specific expression of porcine whey acidic protein gene from a bacterial artificial chromosome in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev*. 2002;63(2):161-167.
236. Roussel JC, Moran CJ, Salvaris EJ, Nandurkar HH, d'Apice AJF, Cowan PJ. Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am. J. Transplant*. 2008;8(6):1101-1112.
237. Royer C, Jalabert A, Da Rocha M, Grenier A, Mauchamp B, Couble P, Chavancy G. Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. *Transgenic Res*. 2005;14(4):463-472.
238. Ruan G, Ma L, He X, Meng M, Zhu Y, Zhou M, Hu Z, Wang X. Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A\*0201 heavy chain and light chain (beta2m). *Protein Expr. Purif*. 2005;44(1):45-51.
239. Rudolph NS. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*. 1999;17(9):367-374.

240. Ruysers NE, De Winter BY, De Man JG, Loukas A, Herman AG, Pelckmans PA, Moreels TG. Worms and the treatment of inflammatory bowel disease: are molecules the answer? *Clin. Dev. Immunol.* 2008;2008:567314.
241. Ryoo ZY, Kim MO, Kim KE, Bahk YY, Lee JW, Park SH, Kim JH, Byun SJ, Hwang HY, Youn J, Kim TY. Expression of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (hGM-CSF) in mouse urine. *Transgenic Res.* 2001;10(3):193-200.
242. Sachs DH, Sykes M, Yamada K. Achieving tolerance in pig-to-primate xenotransplantation: reality or fantasy. *Transpl. Immunol.* 2009;21(2):101-105.
243. Sartor C, Limouzin-Perotti F, Legré R, Casanova D, Bongrand M, Sambuc R, Drancourt M. Nosocomial Infections with *Aeromonas hydrophila* from Leeches. *Clin. Infect. Dis.* 2002;35(1):E1-5.
244. Savitz SI, Dinsmore J, Wu J, Henderson GV, Stieg P, Caplan LR. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc. Dis.* 2005;20(2):101-107.
245. Sawyer RT. *Leech biology and behaviour*. Oxford [Oxfordshire]: Clarendon Press ; 1986:3 v.
246. Sayili M, Akca H, Duman T, Esengun K. Psoriasis treatment via doctor fishes as part of health tourism: A case study of Kangal Fish Spring, Turkey. *Tourism Management.* 2007;28(2):625-629.
247. Sayles M, Jain M, Barker RA. The cellular repair of the brain in Parkinson's disease--past, present and future. *Transpl. Immunol.* 2004;12(3-4):321-342.
248. Schaapherder AF, Daha MR, te Bulte MT, van der Woude FJ, Gooszen HG. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against porcine endothelium induced by a majority of human sera. *Transplantation.* 1994;57(9):1376-1382.
249. Schedl A, Montoliu L, Kelsey G, Schütz G. A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature.* 1993;362(6417):258-261.
250. Scheef G, Fischer N, Flory E, Schmitt I, Tönjes RR. Transcriptional regulation of porcine endogenous retroviruses released from porcine and infected human cells by heterotrimeric protein complex NF-Y and impact of immunosuppressive drugs. *J. Virol.* 2002;76(24):12553-12563.
251. Schmidtchen A, Wolff H, Rydengård V, Hansson C. Detection of serine proteases secreted by *Lucilia sericata* in vitro and during treatment of a chronic leg ulcer. *Acta Derm. Venereol.* 2003;83(4):310-311.
252. Schmoeckel M, Bhatti FN, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ, Pino-Chavez G, Goddard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J, White DJ. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation.* 1998;65(12):1570-1577.

253. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmot I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 1997;278(5346):2130-2133.
254. Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, Avagyan A, Wittig BM, Loddenkemper C, Hamann A, Hamelmann E, Lucius R, Hartmann S. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *J. Immunol*. 2008;180(6):4265-4272.
255. Schulte am Esch J, Cruz MA, Siegel JB, Anrather J, Robson SC. Activation of human platelets by the membrane-expressed A1 domain of von Willebrand factor. *Blood*. 1997;90(11):4425-4437.
256. Schumacher JM, Ellias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, Fischman AJ, Thomas C, Feldman RG, Kassissieh S, Raineri R, Manhart C, Penney D, Fink JS, Isacson O. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*. 2000;54(5):1042-1050.
257. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, Tilahun D, Girma S, Ali S, McElroy P, Custovic A, Woodcock A, Pritchard D, Venn A, Britton J. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet*. 2001;358(9292):1493-1499.
258. Seidel GE. Resource requirements for transgenic livestock research. *J. Anim. Sci*. 1993;71 Suppl 3:26-33.
259. Seveno C, Fellous M, Ashton-Chess J, Soullillou J, Vanhove B. Les xénogreffes finiront-elles par être acceptées? *M. S*. 2005;21(3):302-308.
260. Seymour P, Winokur R, Artz G, Pribitkin E. Successful Non-Microvascular Nasal Tip Replantation After Traumatic Avulsion. *The Internet Journal of Plastic Surgery*. 2006;2(2).
261. Shafren DR. Viral cell entry induced by cross-linked decay-accelerating factor. *J. Virol*. 1998;72(11):9407-9412.
262. Shapiro RS. Future issues in transplantation ethics: ethical and legal controversies in xenotransplantation, stem cell, and cloning research. *Transplant Rev (Orlando)*. 2008;22(3):210-214.
263. Sharma A, Naziruddin B, Cui C, Martin MJ, Xu H, Wan H, Lei Y, Harrison C, Yin J, Okabe J, Mathews C, Stark A, Adams CS, Houtz J, Wiseman BS, Byrne GW, Logan JS. Pig cells that lack the gene for alpha1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*. 2003;75(4):430-436.
264. Shenfeld OZ. Successful use of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) for the treatment of venous insufficiency in a replanted digit. *Isr. Med. Assoc. J*. 1999;1(3):221.
265. Sherman RA. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen*. 2002;10(4):208-214.

266. Sherman RA. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care*. 2003;26(2):446-451.
267. Shin JL, Gardiner GW, Deitel W, Kandel G. Does whipworm increase the pathogenicity of *Campylobacter jejuni*? A clinical correlate of an experimental observation. *Can. J. Gastroenterol*. 2004;18(3):175-177.
268. Siddall ME, Trontelj P, Utevsky SY, Nkamany M, Macdonald KS. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proc. Biol. Sci*. 2007;274(1617):1481-1487.
269. Siepe M, Martin J, Sarai K, Ihling C, Sommer P, Beyersdorf F. Anatomical study on the surgical technique used for xenotransplantation: porcine hearts into humans. *J. Surg. Res*. 2007;143(2):211-215.
270. Smith LC, Bordignon V, Babkine M, Fecteau G, Keefer C. Benefits and problems with cloning animals. *Can. Vet. J*. 2000;41(12):919-924.
271. Soler E, Le Saux A, Guinut F, Passet B, Cohen R, Merle C, Charpilienne A, Fourgeux C, Sorel V, Piriou A, Schwartz-Cornil I, Cohen J, Houdebine L. Production of two vaccinating recombinant rotavirus proteins in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res*. 2005;14(6):833-844.
272. Soler E, Parez N, Passet B, Dubuquoy C, Riffault S, Pillot M, Houdebine L, Schwartz-Cornil I. Recombinant rotavirus inner core proteins produced in the milk of transgenic rabbits confer a high level of protection after intrarectal delivery. *Vaccine*. 2007;25(34):6373-6380.
273. Son DJ, Ha SJ, Song HS, Lim Y, Yun YP, Lee JW, Moon DC, Park YH, Park BS, Song MJ, Hong JT. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappaB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2006;317(2):627-634.
274. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol. Ther*. 2007;115(2):246-270.
275. Specke V, Rubant S, Denner J. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology*. 2001;285(2):177-180.
276. Stachowiak J. Bee Venom Therapy for MS . Available at: [http://ms.about.com/od/alternativemedicine/a/bee\\_stings.htm](http://ms.about.com/od/alternativemedicine/a/bee_stings.htm) [Accédé Octobre 18, 2009].
277. Stangaciu S. Api countries. *Apitherapy.com, return to natural wisdom*. Available at: <http://www.apitherapy.com/countries.php> [Accédé Octobre 8, 2009].
278. Starlz TE, Fung JJ, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino I, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Kusne S, Rudert WA, Trucco M, Michaels M. Baboon-to-human liver transplantation. *The Lancet*. 1993;341(8837):65-71.
279. Starlz TE, Fung JJ, Tzakis A. Human liver transplantation. *Xeno*. 1993;1(4).

280. Steenvoorde P, Jacobi C, Oskam J. Maggot debridement therapy: free-range or contained? An in-vivo study. *Adv Skin Wound Care*. 2005;18 (issue 8):430-5.
281. Steenvoorde P, Budding T, Oskam J. Determining pain levels in patients treated with maggot debridement therapy. *J Wound Care*. 2005;14(10):485-488.
282. Steenvoorde P, Jukema GN. The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results. *J Tissue Viability*. 2004;14(3):97-101.
283. Stowers AW, Chen Lh L, Zhang Y, Kennedy MC, Zou L, Lambert L, Rice TJ, Kaslow DC, Saul A, Long CA, Meade H, Miller LH. A recombinant vaccine expressed in the milk of transgenic mice protects Aotus monkeys from a lethal challenge with *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(1):339-344.
284. Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2003;98(9):2034-2041.
285. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*. 2005;54(1):87-90.
286. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis : a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128 (4):825-832.
287. Summers RW, Elliott DE, Weinstock JV. Why *Trichuris suis* should prove safe for use in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis*. 2005;11(8):783-784.
288. Sun TQ, Fernstermacher DA, Vos JM. Human artificial episomal chromosomes for cloning large DNA fragments in human cells. *Nat. Genet.* 1994;8(1):33-41.
289. Svoboda E. Sciencist at work / David Pritchard; The Worms Crawl In. *The New York Times*. 2008. Available at: <http://query.nytimes.com/gst/fullpage.html?res=9800E6DD1138F932A35754C0A96E9C8B63> [Accédé Octobre 8, 2009].
290. Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell JK, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S, Logan JS. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology (N.Y.)*. 1992;10(5):557-559.
291. Sykes M, Sandrin M, Cozzi E, Rees MA. World Health Organization resolution on xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2004;11(3):224-225.
292. Tacke SJ, Bodusch K, Berg A, Denner J. Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2001;8(2):125-135.
293. Talbi M, Stussi JD, Meley M. Microsurgical replantation of a totally amputated ear without venous repair. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17(6):417-420.
294. Thomas S. Cost of managing chronic wounds in the U.K., with particular emphasis on maggot debridement therapy. *J Wound Care*. 2006;15(10):465-469.

295. Thomas S, Jones M, Shutler S, Jones S. Using larvae in modern wound management. *J Wound Care*. 1996;5(2):60-69.
296. Timur M, Çolak A, Marufi M. A study on the systematic identification of the Balikli thermal spring (Sivas) fish and the curative effects of the fish on dermal diseases. *Vet Fakült Dergis (Ankara)*. 1983;(30):276-82.
297. Tomizuka K, Yoshida H, Uejima H, Kugoh H, Sato K, Ohguma A, Hayasaka M, Hanaoka K, Oshimura M, Ishida I. Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat. Genet*. 1997;16(2):133-143.
298. Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, Tanaka S, Sato K, Oshimura M, Ishida I. Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(2):722-727.
299. Tseng Y, Kuwaki K, Dor FJMF, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, Yamada K, Robson SC, Awwad M, Schuurman H, Sachs DH, Cooper DKC. alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation*. 2005;80(10):1493-1500.
300. Tuncali D, Terzioglu A, Cigsar B, Aslan G. The value of medical leeches in the treatment of class IIC ring avulsion injuries: report of 2 cases. *J Hand Surg Am*. 2004;29(5):943-946.
301. U.S. National Institute of Health. Honeybee Venom Treatment for Osteoarthritis Pain and Inflammation . *ClinicalTrials.gov*. 2009. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00949754> [Accédé Octobre 8, 2009].
302. Valdés-González RA, Dorantes LM, Garibay GN, Bracho-Blanchet E, Mendez AJ, Dávila-Pérez R, Elliott RB, Terán L, White DJG. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur. J. Endocrinol*. 2005;153(3):419-427.
303. van de Lavoie M, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*. 2006;441(7094):766-769.
304. van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*. 2000;356(9243):1723-1727.
305. van den Biggelaar AHJ, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YCM, Souverijn JHM, Missinou MA, Borrmann S, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J. Infect. Dis*. 2004;189(5):892-900.
306. van der Plas MJA, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HCM, van Gulpen C, van Dissel JT, Nibbering PH, Jukema GN. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect*. 2007;9(4):507-514.

307. Vickers A, Goyal N, Harland R, Rees R. Do certain countries produce only positive results? A systematic review of controlled trials. *Control Clin Trials*. 1998;19(2):159-166.
308. Vos JM. The simplicity of complex MACs. *Nat. Biotechnol*. 1997;15(12):1257-1259.
309. Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning the laboratory mouse\*1. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 1999;10(3):253-258.
310. Wall RJ. Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology*. 1996;45(1):57-68.
311. Walton RL, Beahm EK, Brown RE, Upton J, Reinke K, Fudem G, Banis J, Davidson J, Dabb R, Kalimuthu R, Kitzmiller WJ, Gottlieb LJ, Buncke HJ. Microsurgical replantation of the lip: a multi-institutional experience. *Plast. Reconstr. Surg*. 1998;102(2):358-368.
312. Wang O, Ahn K, Jang H. Clinical study on effectiveness of bee venom therapy on degenerative knee arthritis. *J Kor Acu Mox Soc*. 2001;(18):35-47.
313. Wang W, Zhaohui M, Bin Y, et al. Intra-hepatic artery transplantation of newborn porcine islets into 20 type 1 diabetic patients with steroids immunosuppression protocol (Abstract OP-056). Dans: Geneva; 2005.
314. Warwick D, Warwick J. Turkey : The doctor fish a cure for psoriasis? *The Lancet*. 1989;334(8671):1093-1094.
315. Weinstock JV, Elliott DE. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm. Bowel Dis*. 2009;15(1):128-133.
316. Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, L'Huillier PJ, Tervit HR, Oback B. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*. 2003;59(1):45-59.
317. Wesselius T, Heersema DJ, Mostert JP, Heerings M, Admiraal-Behloul F, Talebian A, van Buchem MA, De Keyser J. A randomized crossover study of bee sting therapy for multiple sclerosis. *Neurology*. 2005;65(11):1764-1768.
318. Whitaker IS, Rao J, Izadi D, Butler PE. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004;42(2):133-137.
319. Whitaker IS, Cheung CK, Chahal CAA, Karoo ROS, Gulati A, Foo ITH. By what mechanism do leeches help to salvage ischaemic tissues? A review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2005;43(2):155-160.
320. Whitaker IS, Kamyra C, Azzopardi EA, Graf J, Kon M, Lineaweaver WC. Preventing infective complications following leech therapy: is practice keeping pace with current research? *Microsurgery*. 2009;29(8):619-625.
321. Wikipedia. Doctor fish. *Wikipedia, the free encyclopedia*. Available at: [http://en.wikipedia.org/wiki/Doctor\\_fish](http://en.wikipedia.org/wiki/Doctor_fish) [Accédé Octobre 20, 2009].

322. Wilkins TD, Velander W. Isolation of recombinant proteins from milk. *J. Cell. Biochem.* 1992;49(4):333-338.
323. Winkler ME, Winkler M, Burian R, Hecker J, Loss M, Przemeck M, Lorenz R, Patience C, Karlas A, Sommer S, Denner J, Martin U. Analysis of pig-to-human porcine endogenous retrovirus transmission in a triple-species kidney xenotransplantation model. *Transpl. Int.* 2005;17(12):848-858.
324. Xu Y, Lorf T, Sablinski T, Gianello P, Bailin M, Monroy R, Kozlowski T, Awwad M, Cooper DK, Sachs DH. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4 $\beta$ Glc-X immunoaffinity column. *Transplantation.* 1998;65(2):172-179.
325. Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'Malley P, Nobori S, Vagefi PA, Patience C, Fishman J, Cooper DKC, Hawley RJ, Greenstein J, Schuurman H, Awwad M, Sykes M, Sachs DH. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat. Med.* 2005;11(1):32-34.
326. Yang XW, Model P, Heintz N. Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* 1997;15(9):859-865.
327. Yim Y, Seo J, Kim Y, Kim C, Lee Y, Choi D. The effect of bee venom acupuncture into Chok-samni (ST36) formalin-induced pain behavior. *J Kor Acu Mox Soc.* 2000;(17):139-52.
328. Zbikowska HM, Soukhareva N, Behnam R, Lubon H, Hammond D, Soukharev S. Uromodulin promoter directs high-level expression of biologically active human  $\alpha$ 1-antitrypsin into mouse urine. *Biochem. J.* 2002;365(Pt 1):7-11.
329. Zhou Q, Kyazike J, Echelard Y, Meade HM, Higgins E, Cole ES, Edmunds T. Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats. *J. Biotechnol.* 2005;117(1):57-72.
330. Zhu L, van de Lavoie M, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuison S, Deng DF, Deshpande S, Diamond JH, Green L, Halk EL, Heyer BS, Kay RM, Kerchner A, Leighton PA, Mather CM, Morrison SL, Nikolov ZL, Passmore DB, Pradas-Monne A, Preston BT, Rangan VS, Shi M, Srinivasan M, White SG, Winters-Digiacinto P, Wong S, Zhou W, Etches RJ. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat. Biotechnol.* 2005;23(9):1159-1169.
331. Zuelke KA. Transgenic modification of cows milk for value-added processing. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998;10(7-8):671-676.

## Annexe 1 Comparaison des différents systèmes pour produire des protéines pharmaceutiques recombinantes

Points to consider	Production systems					
	Bacteria	Yeast	Insect cells + baculovirus	Animal cells (CHO cells	Transgenic plants	Transgenic animals
Theoretical production level	+++++	+++++	+++	+	+++++	+++++
Practical production level	++ (+)	++ (+)	+	+	++	++++
Investment cost	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Production cost	+++++	+++++	++	++	+++++	++++
Flexibility	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Line conservation	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Line stability	+++++	+++++	++++	+++	+++++	+++++
Delay for the first production	+++++	+++++	+++	+++++	++++	+++ (+)
Scaling up	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Collection	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Effect on organism	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++
Post-translational modifications	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Stability of product	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Purification	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Contaminant pathogens	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Intellectual property	++++	+++	+++	++	+++	+++
Products on the market	++++	+++	+++	+++++	+	+++

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



## Annexe 2 Liste des agents pathogènes du singe et de leur potentiel zoonotique

*Microorganismes (à l'exception des retrovirus) de primates non-humains, pouvant infecter les humains*

Microorganism	Non-human primate	Human disease	Disease in the non-human primate
<b>Viruses</b>			
Herpesvirus simae (B virus)	Macaca spp.	paralysis, fatal	usually inapparent
Monkeypoxvirus	Macaca mulatta, M. fascicularis, Cercopithecus hamlyni, Hylobates lar, Pan troglodytes	benign papules	fever, pox-like exanthema, frequently fatal
Yaba-Virus (Poxgrup)	Macaca spp.	benign, pseudotumors, fever	pseudotumors (histiocytomas)
Yaba-like virus (Poxgroup)	Macaca mulatta, M. fascicularis	benign, pseudotumors, high fever	histiocytic proliferation
Or-Te-Ca-Virus	Macaca sp.	benign cutaneous lesions	Pock-like lesions
SV 5 (Myxovirusgroup)	Macaca mulatta	antibody formation	respiratory symptoms
Yellow fever virus	Colobus sp., Cercopithecus spp., Saimiri sp., Cebus spp.	mild to severe disease, haemorrhages	fatal disease in New World monkeys, haemorrhages
SV 40 (Papovagroup)	Macaca mulatta, M. fascicularis, Chlorocebus aethiops	antibody formation (oncogenic in hamsters)	none
Poliomyelitis virus	Pan troglodytes, Gorilla gorilla	poliomyelitis	anorexia, occasionally fatal, encephalomyelitis
Marburg disease virus (Filogroup) Ebola virus (Filogroup)	Chlorocebus aethiops, Pan troglodytes	haemorrhagic fever, fatal	febrile illness, occasionally fatal, splenomegaly, haemorrhages
Hepatitis virus	Pan troglodytes, Hylobates sp., Gorilla gorilla	hepatitis, occasionally fatal	usually inapparent, antibody formation, in P. troglodytes occasionally mild disease, diarrhoea

Microorganism	Non-human primate	Human disease	Disease in the non-human primate
<b>Bacteria</b>			
Shigella spp.	all non-human primates susceptible	diarrhoea, haemorrhagic enteritis, sometimes fatal	from inapparent infection to fatal haemorrhagic diarrhoea
Salmonella spp.	all species susceptible	fever, diarrhoea	from inapparent infection to fatal haemorrhagic diarrhoea
Leptospira haemorrhagae	Pan troglodytes, Papio sp., Macaca spp.	Weils's disease, occasionally death from renal failure	usually inapparent, antibody formation, occasionally jaundice
Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis	Macaca mulatta, all Old World, rare New World monkeys	respiratory disease, subacute or chronic disease	fatal disease
Dermatophilus congolensis	Aotus trivirgatus, Lagotrix lagotricha	dermatitis, furunculosis	dermatitis
<b>Fungi</b>			
Microsporium canis	Macaca mulatta, Pan troglodytes, Hylobates lar, Gorilla gorilla	eczema	eczema
<b>Parasites</b>			
Trypanosoma brucei	Cercopithecus sp.	sleeping sickness	unknown
Plasmodium schwetzi	Pan troglodytes Gorilla gorilla	tertian malaria	asymptomatic, occasionally fever
Plasmodium brasilium	Aotus spp., Callitrix spp.	anorexia, headache	asymptomatic, occasionally anaemia, fever
Plasmodium cynomolgi	Macaca fascicularis	tertian malaria	asymptomatic tertian malaria
Plasmodium knowlesi	Macaca fascicularis	quotidian malaria	experimentally jaundice
Plasmodium Inui inui	Macaca fascicularis	quartan malaria	asymptomatic, occasionally fever
Plasmodium simium	Callitrix sp.,	tertian malaria	asymptomatic
Plasmodium catneyi	Macaca spp.	quartan malaria	asymptomatic, occasionally fever

*Infections humaines liées au contact avec des primates non humains*

Virus	Number of human cases
B virus	40
Marburg	35
Ebola	42
Simian immunodeficiency virus	2
Simian foamy virus	3
Monkeypox	1

*Herpèsvirus des humains et non-humains*

Scientific name	Common name	Host	Disease
<b>α-Herpesviruses</b>			
Human herpesvirus 1, 2 (HHV-1, HHV-2)	Herpes simplex types 1 and 2	Humans	Self-limiting mucocutaneous vesicles
		Gibbons	Self-limiting vesicles or encephalitis
		Owl monkeys, marmosets	Fatal infection
Saimirine herpesvirus 1	Herpes T	Squirrel monkey	Self-limiting mucocutaneous vesicles
Cercopithecine herpesvirus 1	Herpes simiae, B virus	Macaques	Self-limiting mucocutaneous vesicles
		Humans	Fatal encephalomyelitis
Cercopithecine herpesvirus 2	SA 8	African green monkey ( <i>Chlorocebus aethiops</i> ) Baboon	Myelitis latent
Human herpesvirus 3 (HHV-3)	Herpes varicella, Herpes zoster	Humans Great apes	Chicken pox, shingles Chicken pox
Cercopithecine herpesvirus 6, 7, 9	Simian varicella	African green monkey ( <i>Chlorocebus aethiops</i> ), Macaque ( <i>Macaca nemestrina</i> , <i>Macaca fascicularis</i> )	Chicken pox-like disease
Ateline herpesvirus 1	Spider monkey herpesvirus	Spider monkey	Usually latent, may cause fatal infection
<b>β-Herpesviruses</b>			
Human herpesvirus 5 (HHV-5)	Cytomegalovirus (CMV)	Humans	Cytomegalic inclusion body disease
Aotine herpesvirus 1, 3, 4	Herpes aotus types 1, 3, 4	Owl monkey	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent
Cercopithecine herpesvirus 3	SA 6	Vervet monkey ( <i>Chlorocebus aethiops pygerytrus</i> )	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent
Human herpesvirus 7 (HHV-7)		Humans	associated with exanthem subitum, pityriasis rosea, neurological manifestations
Cercopithecine herpesvirus 4	SA 15	Vervet monkey ( <i>Chlorocebus aethiops pygerytrus</i> )	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent
Cercopithecine herpesvirus 4	African green monkey CMV	African green monkey ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent
Cercopithecine herpesvirus 5	Rhesus monkey CMV	Rhesus monkey	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent

Scientific name	Common name	Host	Disease
Cercopithicine herpesvirus ?	Baboon CMV	Baboon	?
Cercopithicine herpesvirus ?	Baboon CMV	Baboon	?
Callitrichine herpesvirus 1, 2	Herpesvirus saguinus, marmoset CMV	Cotton-top tamarin	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent
Cebine herpesvirus 1	Capuchin herpesvirus (AL 8)	Cebus monkey	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent
Cebine herpesvirus 2	Capuchin herpesvirus	Cebus monkey	Cytomegalic inclusion body disease / usually latent
Human herpesvirus 6 (HHV-6)	Human B lymphotropic virus (HBLV)	Humans	Exanthem subitum
<b>γ-Herpesviruses</b>			
<b>Gamma 1-viruses</b>			
Human herpesvirus 4 (HHV-4)	Epstein-Barr virus (EBV)	Humans	Infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, Nasopharyngeal carcinoma
Cercopithicine herpesvirus 14	African green EBV-like	African green monkey ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )	?
other EBV-like viruses		Macaques ( <i>Macaca mulatta</i> , <i>Macaca fascicularis</i> )	associated with lymphoma
	Herpesvirus gorilla	Gorilla	?
	Herpesvirus pan	Chimpanzee	?
	Herpesvirus pongo	Orangutan	?
Herpesvirus papio	Baboon	?	?
<b>2. rhadinoviruses</b>			
Saimirine herpesvirus 2	Herpesvirus saimiri (HVS)	Squirrel monkey Owl monkey Marmosets Spider monkey	Latent infection Lymphoma, leukaemia
Ateline herpesvirus	Herpesvirus ateles (HVA)	Spider monkey Owl monkey	Latent infection Lymphoma, leukaemia
Aotine herpesvirus 2	Herpesvirus aoti type 2	Owl monkey	?
<b>Scientific name</b>			
<b>Common name</b>			
<b>Host</b>			
<b>Disease</b>			
Cercopithicine herpesvirus 10, 11	Rhesus rhadinovirus (RRV) Retroperitoneal fibromatosis herpesvirus	Rhesus monkey Macaque ( <i>Macaca nemestrina</i> , <i>M. mulatta</i> )	?
Cercopithicine herpesvirus 12	Herpesvirus papio	Baboon	?
Cercopithicine herpesvirus	Chlorocebus rhadinovirus 1 (ChRV 1)	African green monkey <sup>1)</sup>	
	Chlorocebus rhadinovirus 2 (ChRV 2)	African green monkey <sup>1)</sup>	
Human herpesvirus 8 (HHV-8)	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)	Human	Kaposi's sarcoma, Castleman's disease, primary effusion lymphoma

*Infection de primates non-humains par les virus hépatiques, potential risqué pour les xénotransplantations*

Virus	Classification	Size	Genomic Structure	Natural Infection	Experimental Infection
Hepatitis A virus (enterically transmitted)	Picornaviridae	27 nm	ssRNA	Cynomolgus macaque; Orangutan ?; Baboon; African green monkey	Old and New World monkeys: Chimpanzee; Marmoset; Owl Monkey; Tamarin
Hepatitis B virus (transmitted by the parenteral route)	Hepadnaviridae	42-47 nm (22-27 core)	dsDNA	Woolly monkey Orangutan	Old World monkeys: Chimpanzee; Gibbon; Gorilla; Orangutan; Woolly monkey
Hepatitis C virus (transmitted by the parenteral route)	Flaviviridae	30-60 nm	ssRNA		Old World monkeys: Chimpanzee; Marmoset ?
Hepatitis D virus (transmitted by the parenteral route)	Viroid, related to plant satellite virus	36 nm	ssRNA		Old World monkeys: Chimpanzee
Hepatitis E virus (enterically transmitted)	Caliciviridae	27-34 nm	ssRNA		Old and New World monkeys: Chimpanzee; Marmoset; Macaque; Owl Monkey
Hepatitis F virus	(not a hepatitis virus)	-	-	-	-
Hepatitis G virus	Flaviviridae	?	ssRNA	Marmoset; Tamarins; Owl monkey; Chimpanzee	Tamarin
TTV (associated with hepatitis)	Circoviridae (related to Circoviridae)	12-18 nm	ssDNA	Chimpanzee (Pan troglodytes verus; Pan paniscus)	Chimpanzee Bonobo

*Distribution des herpes virus chez les singes*

Host	Viruses or antibodies detected
Gorilla (captive)	92% anti-HSV-1 + 8% anti-HSV-2
Gorilla (captive)	Varicella zoster virus
Gorilla (mountain)	58% anti- HSV-1, HSV-2, SA 8
Chimpanzee (captive)	71% anti-HSV-2
Gibbon (captive)	100% anti-HSV-1
Orangutan (wild)	59.4% anti-B virus,
Orangutan (captive)	0% anti-HSV-1, HSV-2, SA 8, B virus

*Nombre d'orang-outangs séropositifs pour des infectieux virales spécifiques*

Type of virus	Number of individuals	
	Total number n=143	%
Hepatitis B virus (HBV)	85	59.4
Hepatitis A virus (HAV)	50	34.9
Herpes simplex virus 1 (HSV-1)	21	14.7
Simian retrovirus 1 (SRV-1)	16	11.2
Human T cell leukaemia virus (HTLV)	2	1.4
Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)	0	0
Simian immunodeficiency virus (SIV)	0	0

*Rétrovirus exogènes chez les primates non-humains*

	Virus	Infected animals	Disease
<b>1</b>	<b>Type C retroviruses</b>		
	STLV-1 (STLV, Simian T cell leukaemia virus)	Gorilla ( <i>Gorilla gorilla</i> ), Chimpanzee ( <i>Pan troglodytes</i> , <i>P. paniscus</i> ), Baboons ( <i>Papio cynocephalus</i> , <i>P. anubis</i> , <i>P. hamadryas</i> , <i>P. sphinx</i> ), African green monkey ( <i>Chlorocebus aethiops</i> , <i>C. sabaesus</i> ), Patas monkeys ( <i>Erythrocebus patas</i> ), Macaques ( <i>Macaca arctoides</i> , <i>M. fascicularis</i> , <i>M. fuscata</i> , <i>M. mulatta</i> , <i>M. nigra</i> , <i>M. radiata</i> )	Asymptomatic, some lymphomas, leukaemia
<b>2</b>	<b>Type D retroviruses</b>	Macaques ( <i>M. fascicularis</i> from Indonesia, not from Philippines, <i>M. nemestrina</i> from Indonesia, <i>M. radiata</i> from India, <i>M. tonkeana</i> from Sulawesi, <i>M. mulatta</i> from China)	AIDS
	SRV-1 (SRV Simian retrovirus) (SAIDS/CA, /NE)		
	SRV-2 (SAIDS/WA, SAIDS/OR)	Macaques, Celebes	Retroperitoneal fibromatosis, subcutaneous fibrosarcoma
	SRV-3 (MPMV, Mason-Pfizer monkey virus)		
	SRV-4	<i>M. fascicularis</i>	
	SRV-5		
	SRV-Pc	Baboon ( <i>Papio cynocephalus</i> )	Not known to be pathogenic
	Type D retrovirus	Talapoins ( <i>Miopithecus</i> sp.)	

	Virus	Infected animals	Disease
<b>3</b>	<b>Lentiviruses</b>		
		Macaques ( <i>Macaca</i> )	
	SIVmac (SIV, Simian immunodeficiency virus)	Rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> )	AIDS (in captivity only)
	SIVmne	Pigtailed macaque ( <i>M. nemestrina</i> )	AIDS (in captivity only)
	SIVstm	Stump-tailed macaque ( <i>M. arctoides</i> )	? (in captivity only))
		Guenons ( <i>Cercocebus</i> )	
	SIVsyk	Sykes' monkey ( <i>Cercopithecus albogularis</i> )	Apathogenic*
	SIVblu	Blue monkey ( <i>C. mitis</i> )	Apathogenic*
	SIVlhoest	L'Hoest monkey ( <i>C. lhoesti</i> )	Apathogenic*
	SIVsun	Sun-tailed monkey ( <i>C. solatus</i> )	Apathogenic*
	SIV?	Hamlyn's monkey ( <i>C. hamlyni</i> )	Apathogenic*
	SIVdeb	DeBrazza monkey ( <i>C. neglectus</i> )	Apathogenic*
	SIVmon	Campbell's mona ( <i>C. campbelli</i> )	Apathogenic*
	SIV?	Wolf's mona ( <i>C. wolffi</i> )	Apathogenic*
		African green monkeys ( <i>Chlorocebus</i> )	
	SIVagmVer	Vervet monkey ( <i>Chlorocebus pygerythrus</i> )	Apathogenic*
	SIVagmGri	Grivet monkey ( <i>C. aethiops</i> )	Apathogenic*
	SIVagmSab	Green monkey ( <i>C. sabaesus</i> )	Apathogenic*
	SIVagmTan	Tantalus monkey ( <i>C. tantalus</i> )	Apathogenic*
		White-eyelid mangabeys ( <i>Cercocebus</i> )	
	SIVsm	Sooty mangabey ( <i>Cercocebus atys</i> )	Apathogenic*
	SIVrcm	Red-capped monkey ( <i>C. torquatus</i> )	Apathogenic*
	SIVwcm	White-crowned mangabey ( <i>C. torquatus lunulatus</i> )	Apathogenic*
		Talapoins ( <i>Miopithecus</i> )	
	SIVtal	Angolan talapoin ( <i>Miopithecus talapoin</i> )	Apathogenic*
		Black and white colobus ( <i>Colobus</i> )	
	SIVcol	Mantled guereza ( <i>Colobus guereza</i> )	Apathogenic*
		Mandrills ( <i>Mandrillus</i> )	
	SIVmnd/SIVmnd2	Mandrill ( <i>Mandrillus sphinx</i> )	Apathogenic*
	SIVdrl	Drill ( <i>M. leucophaeus</i> )	Apathogenic*
		Chimpanzee ( <i>Pan</i> )	
	SIVcpz(P.t.t.)	Western chimpanzee ( <i>Pan troglodytes troglodytes</i> )	Apathogenic*
	SIVcpz(P.t.s.)	Eastern chimpanzee ( <i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> )	Apathogenic*
		Patas monkey ( <i>Erythrocebus</i> )	
	SIVagmSab	Patas monkey ( <i>Erythrocebus patas</i> )	Apathogenic*
		Baboons ( <i>Papio</i> )	
	SIVagmVer	Yellow baboon ( <i>Papio cynocephalus</i> )	Apathogenic*
	SIVagmVer	Chacma baboon ( <i>P. ursinus</i> )	Apathogenic*
<b>4</b>	<b>Spumaviruses</b>		
	Foamyviruses	Macaques and others	Apathogenic°

\* apathogenic in its natural host ; °apathogenic in non-human primates and in humans

*Transmission inter espèce de rétrovirus de primates non-humains*

Original virus	Species	Pathogenicity		Species	Virus	Pathogenicity
SIVcpz	chimpanzee ( <i>Pan troglodytes troglodytes</i> )	apathogenic ?	⇒	human ( <i>Homo sapiens</i> )	HIV-1	AIDS
SIVsm	sooty mangabey ( <i>Cercocebus torquatus atys</i> )	apathogenic	⇒	human rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> )	HIV-2 SIVmac	AIDS AIDS
STLV-1	mandrill ( <i>Mandrillus sphinx</i> ), chimpanzee ( <i>P. t. troglodytes</i> ), baboon ( <i>Papio sp.</i> ), rhesus monkey ( <i>M. mulatta</i> )	T-cell leukaemia	⇒	human	HTLV-1	T-cell-leukemia, immunodeficiency
STLV-1	chimpanzee ( <i>P. t. verus</i> )	T-cell-leukaemia	⇒	African green monkey ( <i>C. a. sabaeus</i> )	STLV-1	T-cell-leukemia
SFV	African green monkey ( <i>Chlorocebus aethiops</i> ), baboon ( <i>Papio sp.</i> )	apathogenic	⇒	human	SFV	apathogenic
PriERV (endogenous)	non-human primates	apathogenic	⇒	cat	RD-114 (endogenous)	apathogenic
PO-I-Lu (endogenous)	langur ( <i>Presbytis obscuris</i> )	apathogenic	⇒	rhesus monkey	SRV	AIDS

*Transmission inter espèce expérimentale de rétrovirus de primates non-humains*

Original virus	Species	Pathogenicity		Species	Virus	Pathogenicity
SIVagm	African green monkey ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )	apathogenic	⇒	pig tailed macaques ( <i>M. nemestrina</i> ), rhesus monkey ( <i>M. mulatta</i> ), crab eating macques ( <i>M. fascicularis</i> )	SIVagm	apathogenic
SIVagm9063			⇒	pig tailed macaques ( <i>M. nemestrina</i> )	SIVagm9063	AIDS
SIVsyk	Syke's monkey ( <i>Cercopithecus mitis</i> )	apathogenic	⇒	rhesus monkey		apathogenic
SIVsm	sooty mangabey ( <i>Cercocebus atys</i> )	apathogenic	⇒	rhesus monkey ( <i>M. mulatta</i> ), pig tailed macques ( <i>M. nemestrina</i> )	SIVmac, SIVmme	AIDS

Source [43]: Comité directeur pour la bioéthique, Comité européen de la santé. Report on the state of the art in the field of xenotransplantation. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2003.

### Annexe 3 Agents zoonotiques trouvés chez le porc

#### **Bactéries et parasites**

<i>Bordetella bronchiseptica,</i> <i>Bacillus anthracis,</i> <i>Erysipelothrix rhusiopathiae,</i> <i>Leptospira spp.,</i> <i>Mycobacterium spp.,</i> <i>Chlamydia psittaci,</i> <i>Pasteurella multocida,</i>	<i>Campylobacter spp.,</i> <i>Streptococcus suis,</i> <i>Listeria spp.,</i> <i>Escherichia coli,</i> <i>Brucella suis,</i> <i>Salmonella spp.,</i> <i>Toxoplasma gondi,</i> <i>Trichinella spiralis.</i>
---	---

Ces agents sont contrôlés par des méthodes de gestion des risques

#### **Virus**

##### **Les virus suivants sont pathogènes chez le porc et chez l'Homme**

- ✦ Rage
- ✦ Influenza A (H1N1 and H3N2)
- ✦ Nipah
- ✦ Stomatite vésiculeuse,
- ✦ Encéphalite Équine de l'Est, Encéphalite japonaise, Encéphalomyocardite
- ✦ Rotavirus.

D'autres virus infectent les porcs sans signe clinique et sont pathogènes pour l'Homme :

- ✦ Chorioméningite lymphocytaire
- ✦ Hanta,
- ✦ Hépatite porcine E
- ✦ parainfluenza humaine, virus murin de la parainfluenza (Sendai), autres virus influenza humains,
- ✦ Adenovirus humains,
- ✦ Bornavirus,
- ✦ Rhinovirus humains.

##### **Les virus suivant infectent les porcs mais n'ont pas montré de pathogénicité chez l'Homme:**

- ✦ Fièvre porcine classique, Fièvre porcine africaine
- ✦ Pseudorage
- ✦ Gastroentérite transmissible,
- ✦ Fièvre aphteuse,
- ✦ Entérovirus porcins,
- ✦ Coronavirus respiratoire porcine,
- ✦ Encéphalomyélite hémagglutinante,
- ✦ Circovirus porcins,
- ✦ Syndrome dysgénésique et respiratoire porcine,
- ✦ Diarrhée épidémique porcine,
- ✦ Diarrhée virale bovine (BVD),
- ✦ Border disease,
- ✦ Swine pox.

Les virus cités sont les plus importants, cependant, d'autres virus mineurs peuvent être rajoutés dans chaque catégorie.

Source [43] : Conseil de l'Europe. Report on the state of the art in the field of xenotransplantation. CDBI/CDSP-XENO (2003) 1

# L'ANIMAL MEDICAMENT, L'OPOTHERAPIE AU DEBUT DU XXI<sup>E</sup> SIECLE

**NOM et Prénom : BUISSON Fanny**

## **Résumé**

De tout temps, l'animal, source de nourriture et de médicaments, a été utilisé pour soulager les maux de l'Homme. Mais aujourd'hui, l'animal-médicament tient-il encore une place dans l'arsenal thérapeutique de la médecine humaine conventionnelle? Cette thèse espère donner un petit aperçu de la part que tient l'animal entier dans la médication humaine, d'aujourd'hui et de demain. C'est ainsi que nous allons parler de "L'animal médicament : l'opothérapie au début du XXI<sup>e</sup> siècle". L'utilisation historique de l'animal-médicament, faisait appel aux propriétés parfois fantastiques des organes animaux. L'opothérapie, c'est-à-dire le traitement avec des organes ou cellules animales, a traversé l'Histoire non sans quelques déboires, pour finalement participer aux progrès de la médecine et de l'endocrinologie.

Aujourd'hui, nous avons redécouvert l'usage ancestral de certains animaux-médicaments aux vertus irremplaçables. La sangsue participe ainsi au succès de greffes peu vascularisées et à la résorption de certains hématomes. L'asticothérapie est également d'une grande aide pour la détersion de plaies étendues, le parage minutieux de tissus nécrosés, la gestion de plaies chroniques. L'abeille, quant à elle, est utilisée vivante pour instiller son venin qui aurait des vertus thérapeutiques. L'utilisation de poissons mangeurs de peaux mortes se développe dans le traitement du psoriasis. Enfin des recherches sont lancées pour un usage potentiel des propriétés immunomodulatrices de certains helminthes, vers parasites.

Les progrès biotechnologiques élargissent encore la palette d'utilisation de l'animal médicament. Les animaux génétiquement modifiés ouvrent un nouvel horizon thérapeutique. Des animaux « usines à médicament » pourraient produire bientôt dans le lait ou les œufs, des protéines médicamenteuses. Dans un futur plus lointain, des animaux transgéniques pourraient être donneurs d'organes ou de tissus pour l'Homme.

Les animaux combinent plusieurs fonctions que la technologie n'égale pas. L'animal-médicament est un moyen thérapeutique pratique qu'il ne faut cependant pas accepter sans preuves d'efficacité. Les perspectives offertes par l'animal sont prometteuses.

**Mots clés : ABEILLE, ANIMAL MEDICAMENT, ANIMAUX TRANSGENIQUES, APITHERAPIE, ASTICOT, BIOREACTEUR, GARRA RUFa, HELMINTHE, HIRUDO MEDICINALIS, O.G.M., SANGSUE, THERAPEUTIQUE, XENOGREFFE, XENOTRANSPLANTATION, PROTEINE, RECOMBINANTE.**

## **Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Dr. S. Perrot

Assesseur : Dr. C. Degueurce

Adresse de l'auteur :

Les Ages

43120 Monistrol sur Loire

# THE PHARM-ANIMAL, THE OPOTHERAPY IN THE BEGINNING OF THE XXI<sup>TH</sup> CENTURY

**Surname :BUISSON**

**Given name : Fanny**

## **Summary**

Throughout the times, animals, as sources of supply for food and drugs, have been used to allay humans' sufferings. But does the drug-animal still belong within the therapeutic arsenal of traditional human medicine? This thesis will try to give an insight of what part the animal, as a whole, occupies in current and future human medication. And so, we shall talk about "the pharm-animal : the opotherapy in the beginning of the XXI<sup>th</sup> century" The historical use of the drug-animal, would call on to the sometimes fantastic proprieties of animal organs. Opothrapy, that is to say treatment using animal organs or cells, has crossed History with difficulty; but it eventually participates in the progress of medicine and endocrinology.

Today, we have rediscovered irreplaceable proprieties of several drug-animals ancestral uses. Thus, the leech participates in the success of poorly vascularized grafts, and in the resorbition of certain hematomas. Maggot-therapy is of great help in the debridement of large wounds, the meticulous excision of necrotic tissues, and the management of chronic wounds. Honey bees are themselves, used alive to instil their venom which may have therapeutic proprieties. The use of the dead-skin-eater fish is growing for psoriasis' treatment. Finally, some researches have started for the prospective use of certain helminths' immunoregulatory proprieties.

Biotechnology progress still extends the range of pharm-animal use. Genetically modified animals are opening new therapeutic perspectives. Soon, animal-pharming could produce pharmaceutical proteins in milk or in eggs. Later on, transgenic animals could become tissue or organ donors for humans.

Technology doesn't level up with animals which combine several functions. The drug-animal is a handy therapeutic mean that should nevertheless not be acknowledged unless proof of it's effectiveness is produced. Animal prospects are promising.

**Keywords : ANIMAL PHARMING, RECOMBINANT PROTEIN, LEECH, MAGGOT, BEE VENOM THERAPY, HELMINTHE, *GARRA RUF*A, *HIRUDO MEDICINALIS*, XENOGRAFT, XENOTRANSPLANTATION, THERAPEUTIC, TRANSGENICS ANIMALS, BIOREACTOR, G.M.O.**

## **Jury :**

President : Pr.

Director : Dr. S. Perrot

Assessor : Dr. C. Degueurce

Author's address:

Les Ages

43120 Monistrol sur Loire