

ACTUALITÉS RÉCENTES SUR LA XÉNOTRANSPLANTATION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES

par

G. BLANCHO*

La xénotransplantation correspond à la transplantation d'organes ou de cellules entre individus appartenant à des espèces différentes, par opposition à l'allotransplantation d'individus différents appartenant à une même espèce.

Le regain d'intérêt récent porté à la xénotransplantation tend à répondre au problème majeur de la pénurie d'organes : en effet le nombre de patients en attente de greffe ne décroît pas, malgré l'augmentation récente du nombre de transplantations (données de l'Agence de Biomédecine). De plus, les nouvelles biotechnologies de reproduction, transgénèse, clonage et thérapie génique se sont développées enfin chez les grands animaux et ont permis d'aborder les problèmes posés par la xénotransplantation sous un nouveau jour : la modification génétique du donneur d'organe.

HISTORIQUE DE LA XÉNOTRANPLANTATION

Après la mise au point des sutures vasculaires autour des années 1900 (Carrel, Ullmann, Jaboulay, Voronoy) [1], Mathieu Jaboulay publie dans le *Lyon médical*, en 1906, la réalisation de deux xénotransplantations d'un rein de porc puis de chèvre

* ITERT/Inserm U643, Immeuble Jean Monnet, Hôtel Dieu, Nantes.

au pli du coude de deux patientes insuffisantes rénales qui, bien entendu, seront des échecs très précoces mais qui auront eu le mérite de montrer la faisabilité de la technique.

Par la suite, d'autres expériences de xénotransplantation à partir de donneurs primates seront décrites jusqu'en 1992 avec des succès très significatifs pour certains (Reemtsma : plus de 9 mois de survie d'une xéno greffe rénale à partir d'un rein de chimpanzé [2]).

CHOIX DU DONNEUR D'ORGANE

À partir de la dernière expérience de Starzl en 1993 – transplantation d'un foie de babouin chez un patient VIH en hépatite fulminante (décès du patient à 70 jours post-greffe sur accident vasculaire cérébral avec un foie histologiquement non rejeté) [3] –, l'utilisation du primate a été remise en cause notamment sur la connaissance d'un risque élevé de la transmission rétrovirale à l'homme et sur la pression forte des ligues de défense animale. Les primates en particulier, qui ne sont pas en danger de disparition (macaques et babouins), sont cependant restés des sujets expérimentaux électifs permettant de mimer la situation porc sur homme.

Le choix de l'animal donneur s'est alors porté sur le porc qui présente les avantages d'une compatibilité de taille et de physiologie pour la majorité des organes, d'une facilité d'élevage, d'un accès récent aux dernières techniques de reproduction (transgénèse, clonage), sans aucune véritable barrière éthique. Cependant un risque certain de zoonoses, notamment d'origine virale, demeure.

PROBLÈMES IMMUNOLOGIQUES ET DE COAGULATION DE LA XÉNOTRANSPLANTATION

La spécificité des mammifères autres que primates de l'ancien monde et humains est l'expression à un niveau membranaire d'un disaccharide Gal α 1.3Gal β 1-4GlcNAc-R (R : résidu sucré), due à l'action de l'enzyme α -galactosyl transférase, qu'humains et primates de l'ancien monde ont au contraire inactivé. Il résulte de son absence chez ces derniers, une immunisation manifestée par la présence d'anticorps anti-Gal, probablement à la faveur de la reconnaissance d'épitopes Gal exprimés par la flore microbienne intestinale. Ainsi une xénotransplantation, dans une combinaison porc sur homme ou porc sur primate, se fait dans une situation dite discordante, du fait de l'existence d'anticorps préformés avant greffe, soit la pire situation de transplantation de cross-match pré-greffe positif. Sans aucune immunosuppression, cette discordance est responsable de rejet dit hyperaigu (en quelques minutes à quelques heures ; Figure 1, voir Planche couleurs p. 314) et qui est essentiellement due à une fixation très rapide, dès le déclampage du greffon, des xéno-anticorps (xénoAc) anti-Gal sur leur ligand Gal spécifique, responsable d'une activation de la voie classique du complément conduisant à des mécanismes : a) de cytotoxicité directe sur les cellules endothéliales (complexe d'attaque membra-

naire : C_{5b-9}) ; b) de libération de facteurs pro-inflammatoires et chimiotactiques à l'origine d'une inflammation massive du greffon ; c) d'une activation endothéliale responsable d'une sur-régulation de la P-sélectine et d'une rétraction endothéliale, exposant le sous-endothélium, notamment le facteur von Willebrand (vWF) aux plaquettes débutant une agrégation par l'interaction de leur molécule glycoprotéine IB (gpIB) avec vWF. Très rapidement cette agrégation plaquettaire se complète d'une fibrino-formation responsable de mécanisme de thrombose diffuse dans tout le lit capillaire ; le greffon présente donc un aspect de nécrose massive ischémique et hémorragique. Ce rejet peut cependant être prévenu soit par déplétion pré-greffe des ces anticorps (échange plasmatique, immuno-adsorption) soit par blocage du complément.

Dès lors, un deuxième type de rejet xénogénique peut apparaître, retardé dans le temps (on parle de rejet xénogénique retardé ; Figure 1, voir Planche couleurs p. 314), permettant le développement de mécanismes notamment cellulaires additionnels. À partir du même *primum movens*, l'interaction de haute affinité xénoAc anti-Gal/Ligand Gal (Ac-Ag), se déclenche une activation endothéliale responsable de phénomènes d'adhésion leucocytaire, de relargage de facteurs chimiotactiques (en particulier IL-8), de perte de l'expression de molécules de la thromborégulation (ADPase, anti-thrombine III, thrombomoduline) conduisant également à des phénomènes de microthrombose, pouvant aller jusqu'à de la coagulation intra-vasculaire disséminée (DIC) dans des situations plutôt terminales du rejet. Les cellules *natural killer* (NK) sont capables d'induire de la cytotoxicité directe par deux mécanismes différents : a) elles reconnaissent directement l'épitope Gal via leur récepteur NKrp1 (humain ou primates) ; et b) elles ne reçoivent pas de signal inhibiteur via l'interaction CMH de classe I (porc)-récepteur inhibiteur (KIR) notamment CD94/NKG2D (humains ou primates), par non-reconnaissance des molécules porcines par les récepteurs humains (ou primates). Par ailleurs, elles sont capables d'induire indirectement de la cytotoxicité par des mécanismes d'ADCC [via la fixation d'Ac anti-Gal par les récepteurs Fc (CD16) de la cellule NK]. De plus, les monocytes, via des interactions d'adhésion avec l'endothélium porcine, vont de leur côté renforcer des mécanismes inflammatoires et de phagocytose. Quant aux lymphocytes T, ils sont retrouvés dans des infiltrats de rejets xénogéniques et peuvent également contribuer aux mécanismes de rejet. En effet, les interactions CD4 (humain ou primate)-CMH classe II (porc) et CD8-CMH classe I sont fonctionnelles et autorisent de véritables activations T par des cellules présentatrices d'Ag porcines [4].

L'ensemble de ces événements conduit à l'activation endothéliale caractérisée par une sur-régulation de la P-sélectine, une rétraction endothéliale, une exposition de la matrice sous-endothéliale [inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI), facteur VII (FVII), vWF, gpIB, facteur tissulaire (TF)], la libération de médiateurs de l'inflammation qui augmentent le recrutement leucocytaire, la libération de facteur activant les plaquettes conduisant à des thrombi plaquettaires, à des dépôts de fibrine et finalement au rejet de xéno greffe retardée (ou rejet vasculaire aigu) (Figure 1, voir Planche couleurs p. 314) [5].

Ainsi, la mise en évidence du rôle majeur du complément dans ces deux types de rejets a conduit à générer, lorsque la technologie l'a permis, des porcs transgéniques exprimant des molécules humaines inhibitrices du complément au niveau de l'endothélium porcine, dans le but de protéger ce dernier de cette agression.

L'ÉVOLUTION DE LA XÉNOTRANSPLANTATION D'ORGANES VASCULARISÉS : DES PORCS DONNEURS D'ORGANES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS

Les deux avancées récentes les plus spectaculaires de la xénotransplantation sont l'application avec succès de la transgénèse et du clonage par transfert nucléaire au porc. La transgénèse consiste à introduire un gène étranger dans un génome. L'ADN complémentaire codant la molécule d'intérêt est introduit par micro-injection dans le noyau d'un embryon, stade une cellule, issu d'une super-ovulation et fécondation. Cet embryon micro-injecté est ensuite introduit dans une femelle pseudo-gestante. La première génération F0 (appelée fondateur) est alors contrôlée pour la présence du transgène dans son génome par la technique de détection classique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Au stade adulte, la semence des animaux F0 transgéniques est cryopréservée, et les animaux adultes sont croisés entre eux de façon à obtenir des animaux F1 hétérozygotes pour le transgène. Au final, les F1 sont croisés entre eux afin d'obtenir une population F2, au sein de laquelle certains animaux seront homozygotes pour le transgène. Diverses souches d'animaux transgéniques voire multi-transgéniques ont été générées, utilisant essentiellement les molécules inhibitrices, CD55 (DAF), CD59, CD46 (MCP) (Figure 2, voir Planche couleurs p. 316) [5]. Tous les greffons exprimant de tels transgènes ont montré une protection très efficace contre le rejet hyperaigu, équivalente à l'effet des plasmaphères et en présence d'immunosuppression (associant diversement des drogues telles que cyclophosphamide, ciclosporine A, rapamycine, mycophénolate mofétil, corticostéroïdes), permettant des prolongations de survie très significatives jusqu'à 3 mois et demi en xénogreffe de cœur [6, 7].

L'étape ultérieure a été l'application du clonage par transfert nucléaire qui consiste à transférer, dans un ovocyte préalablement énucléé, un noyau isolé d'une cellule somatique préalablement modifié par recombinaison homologe ; cela permet l'introduction ciblée d'une séquence ADN particulière aboutissant soit à une expression nouvelle pour un gène fonctionnel, ou au contraire à une invalidation de son expression si la séquence insérée casse son cadre ouvert de lecture, technique du knock out (KO). Ces embryons nouvellement obtenus sont alors réintroduits dans une femelle pseudo-gestante. Ainsi des porcs « invalidés » pour le gène de l' α -galactosyl-transférase (GalT) ont été générés, constituant une étape supplémentaire majeure en n'exprimant plus le Gal à la surface de l'endothélium (porc GalT-KO) (Figure 2, voir Planche couleurs p. 316) [8-10]. Des prolongations de survie encore supérieures ont ainsi été obtenues (6 mois en xénogreffe cardiaque [11], et 3 mois en xénogreffe rénale [12]), sous traitement immunosuppresseur, mais finalement évoluant toujours tardivement vers des rejets vasculaires aigus plus ou moins associés à de la micro-angiopathie thrombotique [11], avec persistance d'une immunisation anti-porcine humorale dirigée contre des motifs non Gal à identifier [12, 13] mais aussi persistance d'une réponse cellulaire [14, 15].

Les prochaines étapes seront : a) des modifications génétiques additionnelles du donneur couplant sur un fond GalT-KO de l'expression de molécules transgéniques régulant le complément (hCD46, hCD55, hCD59...), le contrôle de l'activation endothéliale et de la coagulation (hCD39), le blocage de la réponse cellulaire innée (HLA E...) et adaptative au niveau des voies de co-stimulation (CTLA-4Ig) [4, 14,

15], associés à b) une amélioration des traitements immunosuppresseurs permettant de cibler plus spécifiquement la réponse humorale comme cellulaire [14, 15].

XÉNOGREFFES CELLULAIRES

Une autre application de la xénotransplantation est l'utilisation de cellules isolées, en particuliers d'îlots de Langerhans porcins dans l'indication du diabète ou de neurones porcins dans le cadre de maladies neurodégénératives (Parkinson, Huntington). Les expérimentations pré-cliniques de greffes d'îlots sur primates diabétiques sont extrêmement prometteuses avec d'excellents contrôles de diabète sur plusieurs mois avec immunosuppressions [16] ou utilisation d'îlots encapsulés [17].

LE FUTUR

Malgré les progrès récents considérables que nous venons de citer, il apparaît donc que les xéno greffes vascularisées nécessitent encore d'autres avancées avant d'envisager des essais thérapeutiques. Il n'en va pas de même de xéno greffes cellulaires, en particulier d'îlots de Langerhans, puisque au moins deux essais thérapeutiques ont débuté dans le monde et que secondairement des xéno greffes de neurones porcins pourraient être aussi proposées.

BIBLIOGRAPHIE

1. MATEVOSSIAN E, KERN H, HUSER N et al. Surgeon Yurii Voronoy (1895-1961) - a pioneer in the history of clinical transplantation : in memoriam at the 75th anniversary of the first human kidney transplantation. *Transpl Int*, 2009, 22 : 1132-1139.
2. REEMTSMA K, McCracken BH, Schlegel JU et al. Renal Heterotransplantation In Man. *Ann Surg*, 1964, 160 : 384-410.
3. STARZL TE, FUNG J, TZAKIS A et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*, 1993, 341 : 65-71.
4. LE BAS-BERNADET S, BLANCHO G. Current cellular immunological hurdles in pig-to-primate xenotransplantation. *Transpl Immunol*, 2009, 21 : 60-64.
5. LE BAS-BERNADET S, ANEGON I, BLANCHO G. Progress and prospects : genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther*, 2008, 15 : 1247-1256.
6. LAMBRIGTS D, SACHS DH, COOPER DK. Discordant organ xenotransplantation in primates : world experience and current status. *Transplantation*, 1998, 66 : 547-561.
7. MCGREGOR CG, TEOTIA SS, BYRNE GW et al. Cardiac xenotransplantation : progress toward the clinic. *Transplantation*, 2004, 78 : 1569-1575.
8. DAI Y, VAUGHT TD, BOONE J et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002, 20 : 251-255.
9. PHELPS CJ, KOIKE C, VAUGHT TD et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299 : 411-414.

10. NOTTLE MB, BEEBE LF, HARRISON SJ et al. Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation*, 2007, *14* : 339-344.
11. KUWAKI K, TSENG YL, DOR FJ et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors : initial experience. *Nat Med*, 2005, *11* : 29-31.
12. YAMADA K, YAZAWA K, SHIMIZU A et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med*, 2005, *11* : 32-34.
13. CHEN G, QIAN H, STARZL T et al. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med*, 2005, *11* : 1295-1298.
14. COOPER DK, DORLING A, PIERSON RN 3rd et al. Alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs for xenotransplantation : where do we go from here? *Transplantation*, 2007, *84* : 1-7.
15. TAI HC, ZHU X, HARA H et al. The pig-to-primate immune response : relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 2007, *14* : 227-235.
16. CARDONA K, MILAS Z, STROBERT E et al. Engraftment of adult porcine islet xenografts in diabetic nonhuman primates through targeting of costimulation pathways. *Am J Transplant*, 2007, *7* : 2260-2268.
17. DUFRANE D, GOEBBELS RM, SALIEZ A et al. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates : proof of concept. *Transplantation*, 2006, *81* : 1345-1353.