

XÉNOTRANSPLANTATION, UNE CHIMÈRE NOUS RATTRAPE

Jean-Paul Souillou

Ange, femme poisson, homme taureau, faune divers, l'homme a toujours rêvé de s'approprier certains attributs du bestiaire. Ce n'est que très récemment que l'éventualité de la xéno-greffe donne une encore plus grande dimension à ces chimères : celle d'une faible réalité. En cas de succès, la xénotransplantation représentera une révolution médicale majeure.

Si l'histoire des xénotransplantations a moins de 40 ans, la recherche coordonnée sur le mécanisme du rejet suraigu vasculaire, premier obstacle aux xéno-greffes, a moins de 10 ans. Aujourd'hui, une formidable course est engagée entre ce qui n'est encore qu'une poignée de laboratoires et certains progrès spectaculaires ont été obtenus. Pour exemple, 3 ans à peine séparent la mise en évidence du rôle protecteur des molécules de régulation du complément (CD55) par la transfection de cellules endothéliales porcines et l'obtention de porcs transgéniques pour le CD55 humain ou entre l'identification de l'épitope majeur reconnu par les xénoanticorps (Gal α 1-3Gal) et l'obtention de porcs transgéniques pour la α fucosyl transférase (α FT ou « H » transférase), première stratégie de parade. D'autre part, à l'inverse de ce que nous indiquons l'histoire de l'allo-transplantation, l'utilisation de techniques issues de l'immunologie sera bien une condition nécessaire à la réalisation des xéno-greffes. Leur succès procédera de la connaissance précise des mécanismes moléculaires

du rejet vasculaire dit hyperaigu et retardé, caractéristique et spécifique de ce type de greffe. Cette connaissance engendrera des parades qu'on imagine surtout fondées sur des stratégies de modification du greffon (transgénèse, sélection de mutants naturels, éventuellement invalidation génétique ou phénotypique) plutôt que sur un traitement spécifique du receveur.

Le choix de l'animal donneur

Les concepts et les grandes hypothèses de travail sur la xénotransplantation ont été bouleversés en moins de 5 ans. Les pionniers, qui ont d'abord travaillé en utilisant des organes de chimpanzé (Reemstma, New York, USA, 1964) ou de babouins (Baylet, Los Angeles, CA, USA, 1984 : greffes de cœur ou Starzl, Pittsburgh, PA, USA, 1993 : greffes de foie) ont abandonné ou abandonnent ces modèles alors que l'essentiel des recherches se concentre sur le porc et sur le modèle expérimental des greffes d'organes de porcs sur des primates. En effet, même en cas de succès, pour des raisons inhérentes à la reproduction et à la lenteur du développement staturo-pondéral des primates, aucun plan utilisant des chimpanzés (espèce protégée) ou même des babouins pourrait subvenir aux besoins de la xéno-greffe en moins de 50 ans. L'utilisation de primates soulèverait aussi des interrogations éthiques. En outre, le risque de xéno-zoonoses paraît démesuré si on utilise des organes de primates. Le

ADRESSE

J.P. Souillou : professeur, praticien hospitalier, directeur de l'Unité Inserm 437. Itert/Inserm U. 437, CHU de Nantes, 30, boulevard Jean-Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France.

porc qui atteint, quant à lui, une taille adéquate vers 6 mois (7-10 ans pour un primate), possède une anatomie et une physiologie (en particulier rénale : tension artérielle et débit sanguin, filtration glomérulaire, capacités de concentration, etc.) proches de celles de l'homme, se reproduit facilement, ses portées sont nombreuses et son élevage bien établi. Son utilisation fait aussi l'objet d'un débat éthique mais réunit le plus grand consensus.

Les risques infectieux

Préalable à toute xénogreffe, existe le risque de transmission de maladies de l'animal à l'homme malade et de diffusion aux hommes sains. Les caractéristiques sanitaires qui devront être celles de l'animal donneur ne sont pas encore légalement définies. Les porcs côtoient l'homme depuis l'Antiquité. Des millions de diabétiques ont été traités par l'insuline extraite de pancréas de porcs. Le porc est cependant potentiellement infecté par différents micro-organismes et par des rétrovirus de type C. Le risque encouru par le malade doit être ici distingué de celui encouru par le public. Les agents viraux, et particulièrement les rétrovirus (largement distribués chez les mammifères, et transmis sous forme d'ADN proviral génomique), sont impossibles à éradiquer d'un organisme selon les méthodes habituelles pour obtenir des animaux « libres de pathogènes ». Dans ce cas, une xénogreffe de porc pourrait être assimilée à l'injection de virus de type C, ubiquitaires et aussi présents chez cet animal. Ce risque a été récemment réactualisé par différentes zoonoses (agent du syndrome d'Ebola, maladie de Hantaan, maladie de Carré transmise à des félins, encéphalite de l'herpès simien, etc.).

Il n'existe cependant pas de maladie connue attribuée au rétrovirus de type C porcine. En revanche, les bactéries ou les parasites, dont le diagnostic clinique est relativement aisé, représentent un risque moindre. Bien qu'actuellement incomplètement cerné, il n'est pas certain que le risque infectieux des xénogreffes à partir d'un organe de porc soit supérieur à celui des allogreffes (rétrovi-

rus, hépatites, infections à pyogènes) issues de sujets morts dont l'histoire médicale ne peut pas être totalement et précisément connue ; une source de donneurs animaux peut donc, à terme, représenter plutôt une sécurité. La surveillance précise de tous les sujets dont la circulation sanguine a été directement mise au contact de tissus porcins (par exemple, circulation croisée temporaire de suppléance avec un foie de porc pour hépatites fulminantes ou transplantation d'îlots de pancréas porcins chez l'homme) est fondamentale. A ce titre, il est intéressant de noter qu'aucun des diabétiques ayant reçu des îlots d'embryons de porcs dans l'étude de C.G. Groth (Huddinge, Suède) *et al.* [1] n'a présenté, avec 6 ans de recul, de problème infectieux particulier (C.G. Groth communication personnelle). Ces risques potentiels ont imposé un moratoire. Cependant, on estime qu'entre 6 000 et 10 000 malades meurent tous les ans, faute d'un transplant, pour les seuls États-Unis et l'Europe. Le risque infectieux de xénogreffes d'organes de porcs doit donc être apprécié avec réalisme. L'importance de ces remarques sur le risque de cette technique est proportionnelle à la conviction des transplantateurs que, d'un statut d'utopie, la xénotransplantation est en voie de devenir une réalité.

Le rejet hyperaigu : rôle déterminant du complément

Sans reprendre la description exhaustive des problèmes biologiques soulevés par la xénotransplantation et développés dans l'article de Christine Pourcel *et al.* (voir p. 301 de ce numéro), essayons de dégager les principaux obstacles et les raisons d'espérer et d'aboutir. Pour les organes vascularisés, le problème majeur qui retient l'attention de tous les laboratoires est le rejet hyperaigu. Les acquis récents sont importants. L'antigène principal (estimé à 80 % des épitopes) est identique à l'épitope bactérien Gal α 1-3 Gal, identifié par Gallili [2]. L' α 1-3 galactosyl transférase (α GT) humaine étant non fonctionnelle, une formidable

immunisation contre cet épitope ubiquitaire (et des déterminants croisés) est entretenue dès le sevrage [3]. L'essentiel des lésions endothéliales résultant de l'interaction entre les IgM anti-Gal α 1-3Gal (0,1 % à 1 % des IgM humaines) est cependant sous le contrôle de l'activation du complément. Les IgG anti-Gal α 1-3Gal (\approx 1% des Ig humaines), non impliquées dans le mécanisme du rejet vasculaire hyperaigu, jouent cependant un rôle important dans les lésions du rejet vasculaire dit aigu retardé. Les molécules régulatrices du complément étant principalement spécifiques d'espèce, l'absence de mécanismes « naturels » de régulation de cette interaction aboutit au rejet suraigu. A ce titre, ce défaut de régulation interspèce est aussi retrouvé dans d'autres systèmes comme la coagulation dont le contrôle est aussi essentiel : le facteur tissulaire (TF) porcine n'est pas inhibé par l'inhibiteur plasmatique (TFPI) humain, le facteur von Willebrand porcine circulant est capable de lier directement son récepteur sur les plaquettes (Gp1b) humaines, non activées (à l'inverse de ce qui se passe chez l'homme).

Le rôle déterminant du complément a été attesté *in vivo* par les résultats obtenus d'abord par l'utilisation du facteur du venin de cobra (un analogue de C3b inhibant le complément) et par ceux des greffes pratiquées chez des primates α GT^{-/-} avec des cœurs de porcs transgéniques pour le CD55 humain (la plus importante des molécules régulatrices du complément). Dans ce cas, le rejet hyperaigu disparaît chez la majorité des singes rhésus transplantés, alors même que les anticorps naturels xénogéniques (ANX) se fixent massivement sur le cœur greffé (disparition des ANX du sérum). Bien plus, l'administration d'un traitement immunosuppresseur aux animaux transgéniques CD55 permet de conserver une certaine fonction des cœurs greffés jusqu'à 70 jours avec, fait surprenant, une structure histologique proche de la normale ([4] et, David White (Cambridge, GB) (communication personnelle), suggérant que le rejet vasculaire aigu retardé (dans lequel les cellules *natural killer*

et les macrophages joueraient un rôle particulier) est accessible au traitement immunosuppresseur classique. L'absence d'activation du complément pourrait jouer aussi un rôle important en diminuant le recrutement des leucocytes. Bien que remarquables, ces résultats n'ont cependant pas été obtenus dans les conditions optimales, mais avec des animaux hétérozygotes. Les cellules endothéliales des animaux transgéniques homozygotes synthétisent 8 fois plus de CD55 que les cellules endothéliales humaines, ce qui pourrait permettre d'espérer des résultats encore meilleurs. Il est cependant vraisemblable que, sur le long terme, d'autres facteurs de l'activation endothéliale et de ses conséquences, en particulier la thrombose [5], doivent être contrôlés. Les techniques de transgénèse permettent, ici aussi, un type d'intervention sur des cibles identifiées, impossible dans l'allotransplantation : surexpression de la thrombomoduline et de l'ADPase, deux molécules inhibées lors de l'activation des cellules endothéliales qui contrôlent en partie le micro-environnement anticoagulant, utilisation de porcs déficients en facteurs de déclenchement de la coagulation ou de l'adhérence plaquettaire (comme le facteur de von Willebrand), surexpression endothéliale de l'inhibiteur de NF- κ B (IkB) par transgénèse ou de molécules contrôlant les radicaux activés de l'O₂ (SOD).

Xéno-anticorps

Alternativement, la diminution de la quantité d'épitopes Gal α 1-3Gal pourrait être obtenue de différentes façons. En l'absence de lignées de cellules embryonnaires souches (cellules ES) chez le porc, l'inactivation par recombinaison homologue du gène codant pour l' α GT est actuellement impossible. Cependant, l'utilisation d'ARN d'antisens ou de nouvelles techniques d'inactivation phénotypiques (mises au point en particulier dans notre laboratoire) est possible. En outre, récemment le groupe australien de Sandrin et McKenzie (Melbourne, Australie) a transfecté la H transférase, branchant un fucose au lieu d'un galactose ter-

minal sur les chaînes sucrées des glycoprotéines et des glycolipides et diminuant ainsi les sites Gal α 1-3Gal chez la souris [6]. Chez ses animaux, la compétition H transférase/ α GT s'effectue en faveur de la première enzyme. Le profil antigénique des cellules endothéliales des porcs transgéniques pour la H transférase est encore inconnu. Cependant, une inactivation complète de l' α GT (comme cela a été obtenu par invalidation génique chez la souris, par le groupe de A. d'Apice à Melbourne) devrait être combinée à la transgénèse de la H transférase pour réellement « humaniser » le motif sucré antigénique sans créer de néo-épitope. Il est aussi possible d'agir – momentanément – sur le receveur : immuno-absorption des anticorps sur divers supports, utilisation de glycosyl hydrolase, d'anti-idiotypes, etc. Les stratégies possibles sont donc nombreuses et leur effet doit être exploré *in vivo*. Des combinaisons d'interventions sur les animaux donneurs seront certainement nécessaires. En outre, les stratégies optimales pourraient dépendre de l'organe qui serait greffé. Par exemple, même si les cellules endothéliales des îlots de Langherans expriment l'épitope Gal α 1-3 Gal, leur revascularisation après greffe à partir des vaisseaux de l'hôte est particulière. Ici, l'obtention d'îlots ne synthétisant plus les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I pourrait être cruciale [7].

Les défis de la xénotransplantation

Si le problème immunologique est central, il ne résume pas toutes les difficultés. En effet, si la physiologie du rein ou des îlots laisse envisager des applications plus faciles, la capacité d'un cœur de porc d'assurer une plénitude fonctionnelle est inconnue (position horizontale du quadrupède, diamètre valvulaire aortique et amplitude systolique différents). La transplantation hépatique est encore plus ardue à concevoir compte tenu de l'extrême complexité fonctionnelle de cet organe et de la régulation différente des synthèses protéiques, comme cela a déjà été noté lors de

l'utilisation de greffes de babouins (par exemple, le receveur de la xéno-greffe de foie de primate réalisée par le groupe de T. Starzl avait un taux d'albumine sérique correspondant à celui du primate et non pas à celui de l'homme). Il est donc vraisemblable qu'à titre de greffes définitives, le premier développement des xénotransplantations ait lieu pour les reins et les îlots de Langherans et, comme soutien provisoire, pour le foie et pour le cœur. Plusieurs groupes ont d'ailleurs déjà utilisé des foies de porcs (après immuno-absorption préalable des anticorps naturels xénogéniques sur reins de porcs) dans des cas d'hépatites fulminantes. Une première série de greffes d'îlots fœtaux de porc a été aussi réalisée par le groupe de C.G. Groth [1]. Des îlots ont persisté chez environ la moitié des malades greffés pendant plusieurs mois (taux sanguins mesurables de peptide C de la pro-insuline porcine) avec un traitement conventionnel, malgré l'augmentation importante du titre et de l'affinité des immunoglobulines anti-Gal α 1-3Gal. Dans le cadre d'une transplantation de rein de porc, quel pourrait être le premier malade ? Certainement des sujets hyperimmunisés, présentant des taux très élevés d'anticorps anti-HLA de classe I (2 % à 4 % des sujets de notre liste d'attente de transplantation, par exemple) et une dysrégulation de leur synthèse d'anticorps avec des anticorps à large spectre dont les taux élevés restent inchangés des années durant, malgré l'absence de stimulation antigénique. Bien que présentant une forte allo-immunisation, ces sérums n'ont pas de réactivité augmentée contre les plaquettes ou les cellules endothéliales de porcs. Dans ce cas précis, en notre incapacité actuelle de contrôler la synthèse de ces allo-anticorps, la xénotransplantation représenterait un recours spécifique éthiquement acceptable. Comment conclure ce bref exposé sans évoquer la place de la France, pays où fut réalisée la première greffe de rein par l'équipe de Jean Hamburger en 1955 ? Il semble que cette recherche n'ait pas revêtu encore les atours d'une grande popularité ; bien que nécessitant des moyens importants (intervention génétique,

modèles de greffes de tissus de porcs sur primates), elle reste marginale et n'a bénéficié encore d'aucune action spécifique de nos institutions. De ce fait, notre pays est moins avancé que les États-Unis, le Royaume-Uni, la Suède ou l'Australie. Pourtant, indépendamment des problèmes spécifiques de la xénotransplantation, cette recherche dynamise de nombreux domaines tels que ceux de l'activation endothéliale, de la fonction et de la structure des glycolipides et des glycoprotéines membranaires, du rôle des anticorps dits « naturels », de l'obtention de cellules ES ou de la mise au point de techniques alternatives à l'inactivation de gène par recombinaison homologe sur les grands mammifères, etc. Autant de défis audacieux mais stimulants, qu'il nous reste à relever _

RÉFÉRENCES

1. Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollema J, Möller E, Bolinder J, Östman J, Reinholdt FP, Hellerström C, Andersson A. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1994 ; 344 : 1402-4.
2. Gallili U. Interaction of the natural anti-gal antibody with α -galactosyl epitopes : a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 1993 ; 14 : 480.
3. Thibaudeau K, Borche L, Soullillou JP, Blanchard D. Characterisation of porcine platelet glycoproteins recognized by human natural anti-gal antibodies. *Blood* 1997 (sous presse).
4. White DJG, Braidley P, Dunning J, Cozzi, Chavez G, Langford G, Wallwork J. Hearts from pigs transgenic for human DAF are not hyperacutely rejected when xenografted to primates. *Transplant Proc* 1997 (sous presse).
5. Robson SC, Kopp C, Lesnikoski B. Platelets and xenograft rejection. *Xeno* 1994 ; 2 : 38-46.
6. Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohny S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IF. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nature Med* 1995 ; 1 : 1261-7.
7. Faustman D, Coe C. Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens. *Science* 1991 ; 252 : 1700-2.

TIRÉS À PART

J.P. Soullillou.