



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques

Année universitaire 2013-2014

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie
soutenue publiquement le 10 mars 2014
par Mélanie Vandervaeren

LES XENOGREFFES
D'ORGANES DE PORC
CHEZ L'HOMME...
UNE UTOPIE ?



Membres du jury :

Président : DURIEZ, Patrick, Professeur en Physiologie, à la Faculté de Pharmacie de Lille 2.

Conseiller de thèse: HERMANN, Emmanuel, Docteur en Immunologie, à la Faculté de Pharmacie de Lille 2..

Assesseur : ROGER, Nadine, Maître de conférence en Immunologie, à la Faculté de Pharmacie de Lille 2..

Membre extérieur : GOMEZ, Emmanuel, Docteur en Pharmacie, Regional Medical Liaison, chez Celgene.

Membre extérieur : BOUYE, Sébastien, Praticien hospitalier, Spécialiste de la Transplantation rénale , Service Urologie de l'Hôpital Claude Huriez, CHU de Lille.



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE	
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER	
	Professeur Régis BORDET	
	Professeur Patrick	PELAYO
	Professeur Frédéric LOBEZ	
	Professeur Monique CAPRON	
	Professeur Salem KACET	
	Madame Stéphanie DAMAREY	
	Monsieur Pierre RAVAUX	
	Monsieur Larbi AIT-HENNANI	
	Monsieur Edouard	DANJOU
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT	

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER
	Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique

Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique

M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
------	-----	--------	-------------

Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique
M.			



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Université de Lille 2

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire **2013-2014**

**VANDERVAEREN
MELANIE**

Titre de la thèse :

Les xénogreffes d'organes de porc chez l'homme, une utopie ?

Mots-clés :

xénogreffe, porc transgénique, rejet immunologique, rétrovirus, transgénèse animale, immunosuppresseur, accommodation, immunotolérance, dérégulation de la coagulation

Résumé :

La première partie de la thèse porte tout d'abord sur les travaux réalisés le siècle dernier et les découvertes historiques apportées en matière de xénotransplantation.

Suit à cela une liste d'avantages que présente la potentielle réussite de la xénotransplantation par rapport à l'allogreffe. Enfin, j'argumente pourquoi le porc serait l'animal idéal pour le don d'organes.

Qu'est-ce qui entrave la réussite actuelle de la greffe xénogénique ? Principalement, le rejet. De trois types : suraigu, aigu et chronique. D'autres problèmes s'additionnent : les différences physiologiques entre l'homme et le porc, le danger viral menaçant le malade et la société, les interrogations éthiques, telles que l'identité de l'homme remise en cause, la défense des droits de l'animal, la place des religions... Enfin, un obstacle, plus récent, touche le domaine de l'hématologie : la dérégulation de la coagulation.

La seconde partie s'intéresse à un projet européen, nommé projet XENOME. Son objectif principal est d'apporter des solutions aux difficultés évoquées plus haut, afin d'aboutir à l'application clinique de la xénogreffe. Quelles sont ces solutions ? Des stratégies anti-rejet consistant en la modification du donneur et la préparation du receveur. On abordera les thèmes de la transgénèse animale, de l'immunotolérance, de l'accommodation... Ensuite, je liste les recommandations sanitaires de prévention virologique. J'aborde aussi la polémique des moratoires, avant de finir par des idées pour contrer la dérégulation de la coagulation.

En conclusion, si dans les prochaines décennies la xénotransplantation s'avère être bel et bien une utopie..quelles en seraient les alternatives ?

Membres du jury :

Président : Duriez Patrick, Professeur en Physiologie, à la faculté de Lille 2.

Assesseurs : Hermann Emmanuel, Docteur en Immunologie, à Lille.

Roger Nadine, Maître de conférence en Immunologie, à Lille.

Membres extérieurs: Gomez, Emmanuel, Docteur en Pharmacie

Bouyé, Sébastien, Praticien hospitalier, Spécialiste de transplantation rénale, Service Urologie de l'Hôpital Claude Huriez, CHU de Lille

PLAN :

<u>REMERCIEMENTS</u>	p.12
<u>DEFINITIONS</u>	p.13
<u>ACRONYMES</u>	p.14
<u>INTRODUCTION</u>	p.15
<u>L'HISTORIQUE</u>	p.16

<p style="text-align: center;"><u>PARTIE 1 : LES POINTS POSITIFS ET NEGATIFS DE LA XENOTRANSPLANTATION</u></p>
--

<u>I) LES AVANTAGES</u>	p.19
-------------------------	------

<u>A) LES AVANTAGES DE LA XENOTRANSPLANTATION PAR RAPPORT A L'ALLOTRANSPLANTATION</u>	p.19
---	------

- 1) La pénurie d'organes
- 2) La programmation de l'opération
- 3) Le point de vue psychologique

<u>B) LES AVANTAGES DU PORC EN TANT QUE DONNEUR</u>	
---	--

<u>II) LES OBSTACLES</u>	p.22
--------------------------	------

<u>A) L'OBSTACLE IMMUNOLOGIQUE : LE REJET</u>	p.22
---	------

Rappels des bases de la réponse immunitaire
Comparaison avec la situation de rejet de greffe allogénique
Les différents stades du rejet

1) LE REJET SURAIGU

a) Quand se manifeste-t-il?

b) Les acteurs initiaux : Enzyme, Antigène et Anticorps

1. L'antigène : l'épitope « alpha-gal »

a. Sa description

b. Son expression sélective

c. L'évolution et la perte de cet épitope chez l'être humain

2. Les anticorps

a. Immunoglobulines et rejet

b. Les xénoanticorps naturels xénogéniques et le rejet

c. Comparaison entre greffe concordante et discordante

d. Les anticorps anti non gal

c) Les différentes étapes du rejet suraigu :

1. L'activation du complément :

- a. Le complément et le rejet
- b. Les voies d'activation du complément
- c. La régulation du complément

2. L'activation de l'endothélium :

- a. Activation endothéliale et coagulation
- b. Activation endothéliale et rejet
- c. Comparaison de l'activation endothéliale de type I et II

d) Comparaison au Système ABO des allogreffes

2) LE REJET AIGU

a) LE REJET VASCULAIRE AIGU

- 1. Délai d'apparition
- 2. Les acteurs
- 3. Le mécanisme

b) LE REJET CELLULAIRE AIGU

- 1. Les acteurs
- 2. Le mécanisme
- 3. Les manifestations cliniques
- 4. Comparaison avec le rejet allogénique

3) LE REJET CHRONIQUE

- a) Délai d'apparition
- b) Le mécanisme

B) LES OBSTACLES PHYSIOLOGIQUE ET ANATOMIQUE

p.38

- 1) La taille des organes
- 2) La longévité
- 3) La température corporelle
- 4) Les différences d'hormones, de protéines
- 5) L'environnement
- 6) Les besoins en substance nutritive

C) L'OBSTACLE VIRAL

p.39

- 1) LES CRAINTES
- 2) LES RETROVIRUS
 - a) Définition et origine
 - b) Réplication d'un rétrovirus infectieux
 - c) Chez le porc
 - 1. les virus porcins en général
 - 2. Les rétrovirus endogènes porcins
- 3) RISQUE REEL POUR L'HUMANITE?

D) L'OBSTACLE ETHIQUE

p.43

- 1) LES PROBLEMES D'IDENTITE CHEZ L'HOMME
 - a) Notion d'être humain et de personne
 - b) Notion de symbole
 - c) Notion de frontière
- 2) LE DROIT DE L'ANIMAL
 - a) L'évolution du statut de l'animal
 - b) La protection de l'animal de laboratoire

c) La notion de souffrance de l'animal

3) L'OPINION PUBLIQUE

4) LES CONSIDERATIONS RELIGIEUSES ET PHILOSOPHIQUES

1. Les considérations religieuses

a. La place de l'animal par rapport à l'homme

b. La xénotransplantation et les interdits religieux

2. Les considérations philosophiques

E) LE NOUVEL OBSTACLE RENCONTRE : HEMATOLOGIQUE

p.47

1) RAPPEL DES MECANISMES DE LA COAGULATION

a) Mécanisme d'initiation et de propagation de la coagulation

b) Voies de régulation de la coagulation

2) LE PROBLEME DE DEREGULATION DE LA COAGULATION

a) Description de la coagulopathie de consommation et de la microangiopathie thrombotique

b) Mécanisme de la coagulopathie de consommation et de la microangiopathie thrombotique

c) Causes de la dérégulation de la coagulation

PARTIE 2 : LES SOLUTIONS

D) LES STRATEGIES

p.53

A) LES STRATEGIES ANTI-REJET

1) MODIFIER LE DONNEUR

p.53

a) La définition de la transgénèse animale

b) Les études préalables avant la transgénèse

c) Les domaines d'application de la transgénèse animale

1. La transgénèse dans le cadre de la xénotransplantation

a. La suppression de l'épitope Gal du porc

b. L'inhibition du complément humain

c. L'induction de tolérance

2. Autres domaines d'application de la transgénèse

a. Les études biomédicales

b. La synthèse protéique

c. La lutte contre les maladies

d. L'agronomie

d) Les différentes techniques actuelles de transgénèse animale

1. LE TRANSFERT DE GENE

a. Microinjection pronucléaire

b. SMGT= sperm mediated gene transfer

c. Transgénèse à médiation virale

d. Transfert nucléaire de cellules somatiques

e. Génie enzymatique

f. Transfection de cellules via des vecteurs de SiRNA

2. LE CLONAGE

2) MODIFIER LE RECEVEUR

p.65

- a) L'immunosuppression
- b) La splénectomie
- c) L'élimination des xénoanticorps
- L'ACCOMODATION-
- d) L'inactivation des protéines du complément
- e) L'induction de l'immunotolérance

1. Rappels de la tolérance immunitaire

2. La définition et les caractéristiques de l'immunotolérance

3. Le protocole

4. Essais et résultats

5. Observations

6. Conclusion

B) LES IDEES CONTRE LE RISQUE VIRAL

- 1) La préparation du donneur
- 2) La protection du receveur
- 3) Les procédures administratives

C) LES SOLUTIONS CONCERNANT LES PROBLEMES ETHIQUES

D) STRATEGIES POUR LUTTER CONTRE LA DEREGULATION DE LA COAGULATION

- 1) Autres modifications génétiques du DONNEUR
- 2) Traitements anticoagulants du RECEVEUR
 - a) Les statines
 - b) La protéine C activée exogène
 - c) Les agents inhibant l'agrégation plaquettaire

II) LE PROJET XENOME

p.81

A) LA DEFINITION

B) LES PARTENAIRES

C) LES MISSIONS

CONCLUSION

p.84

ANNEXES

p.86

BIBLIOGRAPHIE

p.89

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier plusieurs personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail:

Tout d'abord Monsieur le Docteur Emmanuel Hermann, mon conseiller de thèse, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils éclairés qui m'ont guidée tout le long de la réalisation de cette thèse.

Ensuite, le Professeur Patrick Duriez de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être Président du jury, à Madame Roger pour sa collaboration en tant qu'assesseur, ainsi qu'à Monsieur Sébastien Bouyé et Monsieur Emmanuel Gomez d'avoir accepté d'y assister en tant que membre extérieur.

Charlotte et Aline qui sont pour beaucoup dans ma réussite de la première année de concours.

Eloïse et Pierre-andré, pour leur précieuse amitié au cours de ces sept années de pharmacie, leur bonne humeur et l'entraide généreuse pour la préparation des épreuves.

Chabha, mon amie parisienne et coach-spécial-thèse depuis plusieurs mois qui m'a sans cesse remotivée et boostée.

Enfin, ma maman, mes frères et soeurs et ma bonne-maman, pour leur présence constante et leurs nombreux encouragements...

DEFINITIONS

Allogreffe ou Greffe allogénique : Greffe entre deux individus différents au sein d'une même espèce.

Complément: Ensemble de protéines sériques qui constituent une cascade enzymatique initiée parfois par les anticorps pour aboutir à la destruction de cellules cibles d'origine microbienne ou non et renforcer la réponse inflammatoire.

Epitope: Déterminant antigénique, partie d'antigène reconnue par une partie d'anticorps nommée paratope.

Greffe: Transposition de cellules ou de tissus.

Greffe syngénique: Greffe entre deux individus identiques (jumeaux vrais).

Immunotolérance: Tolérance immunitaire induite chez le receveur d'une greffe suite à l'obtention d'un système immunitaire hybride (suite à la greffe de cellules immunitaires issues du donneur).

Retrovirus: Virus appartenant à la famille des Retroviridae, virus à ARN monocaténaire, de polarité positive, infectant les vertébrés et se distinguant par la présence d'une enzyme virale appelée transcriptase inverse.

Transgénèse: Introduction d'un ou plusieurs gènes dans le génome d'un organisme vivant. Celui-ci exprimera le transgène et est appelé OGM (organisme génétiquement modifié).

Transplantation : Transposition d'organes avec anastomose vasculaire.

Xéno greffe ou greffe xénogénique : Greffe entre deux individus d'espèce différente.

Note : Origine grecque : xenos= étranger (12)

Xéno greffe de type A : La transplantation, l'implantation ou la perfusion à un receveur humain d'organes, de tissus ou de cellules viables d'origine animale.

Xéno greffe de type B: Le contact ex vivo des fluides du corps humain avec des cellules, des tissus ou des organes d'origine animale.

Xéno greffe concordante: Greffe entre espèces plus proches (telles que l'homme et le chimpanzé/babouin, ou le modèle hamster-rat).

Xéno greffe discordante: Greffe entre espèces phylogénétiquement plus éloignées (telles que les espèces humaines/primates et porcines).

Note : C'est en 1970 que Calne a abordé la notion de distance phylogénétique en parlant de greffes "discordantes" ou "concordantes" selon l'éloignement des espèces.(18)

Xéno zoonose (zoonose, xénose) : Transmission d'agents infectieux entre les espèces par le biais d'une xéno greffe.

Sources des définitions (23) (3)

ACRONYMES

XT : xénotransplantation

IR : insuffisance rénale

HTA : hypertension artérielle

immunologie :

SI : système immunitaire

RI : réponse immunitaire

Ag : antigène

αgal : galactosyl-alpha-1-3-galactosyl

GT-KO : galactosylTransférase-Knock Out

AC : anticorps

XNA : anticorps naturels xénogéniques

C : complément

Ig : immunoglobuline

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

LcB : lymphocyte B

LcT : lymphocyte T

CPA : cellule présentatrice d'antigène

IL : interleukine

NK : natural killer

IS : immunosuppression

RC : rejet chronique

AHXR : rejet de la xéno greffe hyperaigu

ACXR : rejet de la xéno greffe cellulaire aigu

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

TG : transgénèse

MLR : réponse lymphocytaire mixte

CRP : Protéines régulatrices du complément

hématologie :

CC : coagulopathie de consommation

MAT : microangiopathie thrombotique

FvW : facteur von willebrand

TBM : thrombomoduline

TF : facteur tissulaire

TFPI : inhibiteur du facteur tissulaire

APC : protéine C activée

AT III : antithrombine

PS : protéine S

virologie :

RV : rétrovirus

PERV : rétrovirus endogène porcin

EOPS : exempt d'organismes pathogènes spécifiques

CMV : cytomégalovirus

HSV : herpès simplex virus

HTLV : Virus T lymphotrope Humain. (Rétrovirus causant lymphome et leucémie)

PBS : Primer Binding Sequence. (séquence de liaison des amorces au niveau du génome)

LTR : Long Terminal Repeat

INTRODUCTION

Alors que l'année 2012 fêtait le soixantième anniversaire de l'allogreffe rénale, la pénurie d'organes est au cœur de l'actualité. Les listes d'attente de demandeurs s'allongent. (16) La greffe de rein de porc chez l'homme pourrait-elle être une solution à ce problème?

La xénotransplantation n'est pas sans rappeler un vieux rêve de l'humanité : l'être hybride, mi-homme, mi-animal... (9)

Cette fascination chimérique envahit la mythologie depuis plus de 3000 ans. Elle est présente dans l'univers religieux et a également laissé son empreinte dans la Littérature.

En effet, ce fantasme ancien d'associer des espèces différentes est incarné par les créatures mythologiques telles que les satyres, demi-dieux champêtres à tête de bouc, les centaures, mi-hommes, mi-chevaux, les sirènes, mi-femmes, mi-poissons... ou les chimères, monstres à tête et poitrail de lion, à ventre de chèvre et queue de dragon... (17) Ou encore le célèbre Minotaure, créature de la mythologie grecque incarnant un homme dont la tête est celle d'un taureau. (9)

La religion n'est pas épargnée... En Inde, le dieu Ganesh porte une tête d'éléphant. En Egypte, Horus a une tête de faucon. (9)

Dans le domaine de la Littérature, de nombreux écrivains témoigneront de la proximité entre l'homme et l'animal... Dans les récits d'Homère, les compagnons d'Ulysse sont transformés par Circe en porcs intelligents. Marie Darrieusecq écrira «truisme», la version moderne de «la métamorphose de Kafka», dont l'intrigue est centrée sur la transformation d'une femme en truie dans un salon de massage. (16)

Depuis toujours donc, les animaux nourrissent l'imaginaire de l'homme. Ils font aussi partie de son alimentation, lui servent de compagnon de chasse, de moyen de transport, d'aide pour le travail agricole, de compagnon de jeu, d'animal de compagnie... Cette étroite relation qu'entretiennent les hommes avec les bêtes serait-elle sur le point de devenir plus intime encore avec l'arrivée de la xénotransplantation ? (12)

L'insuline porcine est utilisée depuis plus d'un siècle chez les diabétiques, des valves de porc sont greffées chez l'homme depuis près de quarante ans. Près de 80 tissus, tels que la peau, les os, sont utilisés de manière transitoire en médecine humaine... La xéno greffe des tissus n'est donc pas nouvelle...mais qu'en est-il des organes ? (7)

Dans cette thèse, je commencerai par retracer les différents étapes du progrès en matière de xénotransplantation depuis ses premières tentatives au 17^{ème} siècle jusqu'à nos jours. Ensuite j'avancerai des arguments quant à l'intérêt que présente la xéno greffe par rapport à l'allogreffe...avant d'étudier en détail les multiples barrières à la réussite de l'application clinique de la xénotransplantation, sur les plans immunologique, physiologique, viral et éthique. J'émettrai alors des hypothèses quant aux ruses pour détourner ces obstacles. Enfin, je me focaliserai sur les recherches les plus récentes, celles du 21^{ème} siècle.

La xéno greffe est une source de réflexion multi-facettes. Il s'agit d'une polémique au sein de laquelle se mêleront les aspects scientifiques, sanitaires, légaux, économiques, moraux, éthiques, psychologiques, théologiques et sociaux. (1)

Ce qui était jusqu'à présent simple jeu d'esprit serait-il sur le point de se concrétiser sous la forme d'élevage de petits cochons roses créés sur mesure pour nous servir de prothèse ?

L'HISTORIQUE

La xénotransplantation et ses premiers balbutiements ont vu le jour vers la fin du XVIIème siècle. Je vais retracer, à l'aide du tableau 1, les échecs et exploits réalisés par les équipes de chercheurs et chirurgiens pionnières dans le domaine de la xénogreffe.

Tableau 1a : L'histoire des xénogreffes avant l'arrivée des immunosuppresseurs

<u>ANNEE</u>	<u>CHERCHEUR</u>	<u>EXPERIENCE</u>	<u>RESULTATS</u>
1682 (1) (17)	Un médecin russe	Première xénogreffe : os de chien pour consolider le crâne d'un noble russe blessé	Succès mais Exérèse du greffon sous peine d'excommunication par l'Eglise
Fin 1800 (1) (17)	Chirurgien de l'armée britannique	Grefe de peau de grenouille pour soigner les grands brûlés	Bons résultats
Au début du vingtième siècle, la mise au point des anastomoses vasculaires permet de nouvelles perspectives... (1)			
1905 (17)	Chirurgien français	Tranches de rein de lapin chez un enfant en insuffisance rénale (IR)	Fonctionnement des tissus mais mort après 15jours
1906 (1) (9) (14)	Mathieu JABOULAY (chirurgien français)	Première xénotransplantation rénale : Anastomose de rein de porc et rein de chèvre au pli du coude de deux jeunes femmes en IR terminale	Première description des lésions vasculaires et thrombose caractéristiques du Rejet suraigu après 3jours
1920 (17)	Serge VORONOFF (chirurgien français d'origine russe)	Rêve de Jouvence : première greffe de tissus issus de testicules de singes pour rajeunir les patients sur le plan sexuel	Spécialistes septiques
1940 (17)	Peter MEDAWAR (Biologiste britannique, Londres)	Travaux sur l'immunologie	
1952	Hop Necker (Paris)	Première allogreffe de rein réalisée à partir d'un donneur vivant en France	Mort de l'enfant après 3semaines
1954 (17)	Joseph MURRAY (de l'Hopital Peter BENT BRIGHAM de Boston)	Première transplantation de rein entre deux vrais jumeaux	Réussite

Tableau Ib : L'histoire des xénogreffes à partir de l'introduction sur le marché des premiers immunosuppresseurs efficaces en 1960. (12)

On assiste à la reprise des essais cliniques (19)

1963 (9) (17) (23) (6)	Keith REEMTSMA (chirurgien américain, pionnier de la greffe)	2 Reins de chimpanzé chez une femme.	9mois sous IS (Premier succès !!) elle put reprendre son métier d'institutrice avant de décéder d'un déséquilibre ionique. Aucun signe de rejet post-mortem !
1964 (23)	Thomas STARZL (médecin américain, « père de la xénotransplantation moderne »)	Rein de babouin	2mois de survie du greffon
1964 (23)	HARDY (Mississippi)	Première xénogreffe cardiaque : Cœur de chimpanzé chez un homme de 68ans	45min... coeur trop petit pour assurer une circulation sanguine adéquate. Insuffisance cardiaque
1967 (12) (17)	Christian BARNARD (chirurgien sud-africain)	Première allotransplantation cardiaque chez l'homme	Réussite
1970- 1980	L'intérêt des chirurgiens pour la xénotransplantation diminue pour se concentrer sur les allogreffes cardiaques et rénales, en raison du développement considérable des prélèvements d'organes humains. (6)		
1980 est la naissance de la ciclosporine. (12) (10) Le nombre d'organes humains devenant limité, une nouvelle vague de tentatives cliniques de xénogreffes débute. (6)			
1985 (9) (17) (23) (6) (14) (19)	Léonard L.BAILEY (chirurgien en Californie aux USA)	Cœur de babouin chez un bébé de 15jours « baby Fae » atteint d'hypoplasie congénitale du cœur gauche	Mort 20jours plus tard à cause d'une infection et une destruction du greffon

À partir de 1990, on observe un essor de la xénotransplantation, un regain d'intérêt. (14)
 En outre, on commence à comprendre les mécanismes du rejet. (7)

Tableau 1c : L'histoire de la xénotransplantation de ces vingt dernières années

1990	Zbigniew RELIGA (chirurgien cardiaque polonais)	Cœur de porc	Survie de 24h
1993	Thomas STARZL (Pittsburgh)	Foie de babouin chez un jeune homme atteint d'une hépatite B	Survie de 70 jours, doses massives d'IS, mort d'une infection
1995	GORMAN	Cellules immunitaires de moelle osseuse de babouin chez un patient atteint du sida	L'état du patient s'est amélioré (bien que les cellules de babouin furent rapidement éliminées)
2001 (17)	SAVITZ	Cellules foetales neuronales de porc greffées chez des patients atteints de la maladie de Parkinson	Elles ont fonctionné plus de 7 mois chez l'un des patients.

Note : Travaux plus récents voir Annexe 2.

PARTIE 1 : LES POINTS POSITIFS ET NEGATIFS

D) LES AVANTAGES

Si les chercheurs ont décidé de s'attaquer à la tâche ardue de greffer des organes d'espèce étrangère à l'homme c'est dans le but de profiter des nombreux avantages que présente la xéno greffe et dont ne dispose pas l'allotransplantation.

A) LES AVANTAGES DE LA XENOTRANSPLANTATION PAR RAPPORT A L'ALLOTRANSPLANTATION

La réussite de la xéno greffe n'est pas sans l'apport de certains avantages: Elle nous promet une solution au manque d'organes humains, la possibilité de programmer à l'avance la greffe, ainsi qu'un atout de caractère psychologique.

1) La pénurie d'organes

Tout d'abord, en disposant d'un stock illimité d'organes, on pourra pallier au problème actuel de pénurie d'organes. (15)

Cela permettra premièrement de minimiser le temps passé sur la liste d'attente et donc de greffer les candidats à une transplantation à un stade précoce de leur maladie. (10) Ainsi, on évite la détérioration progressive clinique qui survient habituellement dans l'attente d'un organe (9) et on diminue ainsi le risque de décès avant la greffe du malade. (15)

Deuxièmement, on pourra réduire considérablement les coûts de traitements destinés à maintenir en vie jusqu'à la greffe les patients atteints de défaillance d'un organe en phase terminale (dialyse, etc...). (15)

Ensuite, une diminution du commerce illégal d'organes humains pourra être observée. (7)

Enfin, remédier à la pénurie d'organe a pour conséquence d'apporter une alternative au problème éthique de l'utilisation des organes d'un être humain en état de mort cérébrale dont le cœur bat encore. (15)

La définition de la mort dépasse le champ des sciences naturelles et relève de la morale et de la philosophie. Elle repose sur deux d'hypothèses:

a) La vie est associée à la conscience . Ainsi, la mort est établie dès que l'activité du cortex cérébral a cessé.

On parle de "mort cérébrale" lorsque des spécialistes ont prouvé l'arrêt irréversible du fonctionnement du cerveau et du tronc cérébral.

b) Si on ne tient compte que de la vie des cellules, alors un corps pourrait être considéré comme vivant plusieurs jours après la date officielle du décès.

La loi actuelle sur la transplantation se base sur la première hypothèse.

(19)

Notons que cela apporte aussi une solution au problème éthique de l'ordre de priorité dans la liste d'attente. (12)

2) La programmation de l'opération

La chirurgie peut être programmée dans des conditions idéales cliniques, car il n'y a pas le caractère d'urgence auquel on est confronté lorsque les organes sont issus des victimes des accidents de la route ou des suicides en état de coma dépassé. L'intervention devient alors électorive. (15)

Cela permet le choix du meilleur moment : On peut planifier les xénogreffes et disposer d'une banque d'organes en bon état au moment précis où l'on en a besoin, en fonction des critères de la maladie et du patient. (7)

De plus la préparation de l'infrastructure pourra s'effectuer de manière optimale, avec une réduction du temps d'ischémie (facteur important pour la survie à long terme du greffon). (12)

Un avantage supplémentaire sera de pouvoir choisir le donneur : Les prélèvements sont réalisés sur des animaux sélectionnés, sains (porcs EOPS : Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés), élevés et préparés à cet effet. La qualité de l'organe greffé est garantie. (15)

Enfin, la préparation du receveur au niveau immunologique et psychologique sera également possible. (7)

3) Le point de vue psychologique

D'un point de vue psychologique, le patient greffé est susceptible d'accepter plus facilement de devoir sa survie à la mort d'un animal plutôt qu'à la mort d'un autre être humain. (7) (12)
Cet aspect de la xénogreffe sera réabordé de manière plus explicite dans le chapitre "L'obstacle éthique".(15)

De plus, la possibilité d'utiliser des tissus embryonnaires animaux plutôt qu'humains réglerait la polémique sur l'utilisation des foetus humains. (7)

Enfin, on contourne ainsi les problèmes éthiques de prélèvements d'organes sur les cadavres humains. (7)

B) LES AVANTAGES DU PORC EN TANT QUE DONNEUR

Je vais à présent comparer, à l'aide du tableau 2, les point positifs et négatifs qui distingue le porc du primate dans le rôle de donneur de rein pour la xénogreffe. Le porc est plus intéressant, autant sur le plan infectieux, que sur les plans éthique, chronologique, anatomique, physiologique, et financier.

Tableau 2 : Tableau comparatif des avantages à utiliser le porc comme donneur par rapport au primate (réalisé à partir de (1) (3) (9) (10) (12) (14) (15) (18))

<u>PORC</u>	<u>PRIMATE</u>
<u>Espèce discordante</u>	<u>Espèce concordante</u>
<u>LES INFECTIONS</u>	
a) Son éloignement phylogénétique avec l'homme permet de diminuer (mais non d'éliminer totalement) les risques de transmission de maladies infectieuses.(6) b) La connaissance acquise dans le domaine agroalimentaire permet la production de lignées de porcs EOPS ainsi que le contrôle des conditions de sécurité sanitaire.(3) (15) c) On connaît les agents infectieux issus du porc et des méthodes de diagnostic fiables existent déjà.(14)	a) Le risque infectieux de zoonose est majeur.(1) En effet, leur proximité phylogénétique avec l'homme fait craindre le passage d'un virus qui, plus adapté à l'homme qu'un virus d'une espèce éloignée, pourrait se révéler virulent. (1) (16) b) Il y a des problèmes techniques : un élevage dans des conditions d'isolement strict est impossible car le degré de socialisation du primate est important . (1) c) Les virus simiens sont moins bien connus et donc mal contrôlés.
<u>L'ETHIQUE</u>	
Le porc est déjà utilisé dans l'alimentation et fait depuis longtemps l'objet d'un élevage industriel, ce qui laisse supposer une probable meilleure acceptation par le public(18) (3) (15). De plus, le porc fournit ses valves cardiaques à l'homme depuis plusieurs décennies. (12)	Les problèmes éthiques sont importants. (9) (6) L'utilisation de primates tels que les gorilles, les chimpanzés et les orangs-outans posent problème. (1) La rareté de l'espèce impose des mesures de protection. (10)
<u>LA DISPONIBILITE</u>	
La reproduction du porc est facile et rapide, sa portée est nombreuse(10 ou plus...(3)). Quant à sa croissance, le porc atteint une taille adéquate vers 6mois. (15) (10) (1)	C'est peu prolifique : La reproduction du primate est lente(1), il est unipare et sa croissance dure 6 à 10 ans. (12)
<u>L'ANATOMIE ET LA PHYSIOLOGIE</u>	
Concernant l'anatomie du porc, la taille et le poids sont adéquats. (3) (1) La physiologie est proche de celle de l'homme (Tension artérielle, débit sanguin, filtration globulaire, capacité de concentration, la taille des globules rouges (15) (1))	On est confronté à une limitation d'ordre physiologique : la taille des organes du primate permet de greffer uniquement les enfants. (1)
<u>L'ECONOMIE</u>	
Le coût de production est faible. (9) (1)	Problèmes économiques (9)

L'usage du primate est ainsi essentiellement réservé à celui de receveur d'organes pour les expériences. Les cobayes sont des macaques et des babouins. (1)

II) LES OBSTACLES

De nombreuses difficultés freinent l'avancée de la xénotransplantation en matière d'application clinique. Je détaillerai ces différents problèmes au sein de ce chapitre, en commençant par le principal : le rejet de greffe. La barrière physiologique sera évoquée, avant d'approcher le cœur de la polémique : le danger viral et les questions d'éthique. Nous concluons le chapitre par un obstacle hématologique plus récemment découvert.

A) L'OBSTACLE IMMUNOLOGIQUE : LE REJET

La barrière immunologique à franchir pour réussir la xénotransplantation d'organes est l'endothélium qui représente l'interface entre le sang du receveur et l'organe du donneur. Il a pour rôle de contrôler le tonus et la perméabilité vasculaires, la coagulation et le trafic leucocytaire.(18)

Rappels des bases de la réponse immunitaire

Rappelons les bases du système immunitaire : Celui-ci se divise en deux types de réponses :

Premièrement, la réponse immunitaire innée et naturelle... Lors de l'immunité innée, qui prend en compte principalement la phagocytose, l'activation du complément ainsi que l'activation de la réponse inflammatoire, les cellules présentatrices d'antigène sont activées et migrent vers les tissus lymphoïdes secondaires, où elles sont elles-mêmes responsables de l'activation des lymphocytes : lymphocytes B, lymphocytes T-CD4 et lymphocytes T-CD8.

Cette réponse innée est médiée par les neutrophiles, les macrophages et les cellules tueuses « natural killers » (NK). Les cellules myéloïdes (neutrophiles et macrophages) reconnaissent des structures conservées des microorganismes (Microbe Associated Molecular Patterns ou MAMPs) grâce aux ligands qu'ils expriment (Pattern Recognition Receptors ou PRR). Le système du Complément et sa cascade enzymatique interviennent dans cette défense contre les infections. (75)

Cette réponse intervient en xénotransplantation.

Le second type de réponse est la réponse immunitaire acquise ou adaptative... Les acteurs sont les lymphocytes B et T dont les récepteurs spécifiques à l'antigène sont caractérisés par une extrême diversité dans leur capacité de reconnaissance antigénique...

Les lymphocytes auxiliaires (T CD4+) ont un rôle à jouer dans l'activation des Lc T cytotoxiques et des Lc B. Les Lymphocytes cytotoxiques (T CD8+) interviennent dans l'immunité à médiation cellulaire par destruction des cellules infectées. Tandis que les plasmocytes sont acteurs de l'immunité à médiation humorale en sécrétant des anticorps qui facilitent la phagocytose et l'activation du complément .

Après reconnaissance de l'antigène spécifique, ils se multiplieront, réagiront et garderont une mémoire. (75)

Ce type de défense joue un rôle principal dans le rejet des allogreffes.

Comparaison avec la situation de rejet de greffe allogénique

En allotransplantation ou en xénotransplantation concordante*, seuls les mécanismes immunitaires acquis sont à maîtriser (exception faite de l'incompatibilité des groupes sanguins ABO entre le couple donneur/receveur) , tandis que dans les xénotransplantations discordantes*, les réponses innées ET acquises doivent être inhibées.(61)

* voir DEFINITIONS page 7.

Nous sommes confrontés à deux problèmes majeurs :

Le premier est que le rejet est beaucoup plus rapide et violent en situation xénogénique qu'en situation allogénique.

Le seconde consiste en le fait que les traitements immunosuppresseurs classiques se révèlent insuffisants dans le cas des xénogreffes.(6)

Les différents stades du rejet

Plusieurs étapes sont décrites pour différencier les barrières immunologiques xénogéniques . La phase initiale nommée rejet suraigu a lieu dans les minutes et les heures qui suivent la transplantation. Si ce processus est évité, un rejet vasculaire aigu est observé dans les jours suivants. Comme dans toute transplantation, une composante immunitaire cellulaire est attendue dans un rejet cellulaire aigu tandis qu'un rejet chronique peut avoir lieu plus tardivement.(61)

Nous allons détailler chacune de ces étapes en évoquant pour chacune d'elles leur délai d'apparition, leurs principaux acteurs, leur mécanisme et une éventuelle comparaison au système allogénique.

1) LE REJET SURAIGU

On parle également de rejet hyperaigu.

a) Quand se manifeste-t-il?

Ce type de rejet se produit dans les minutes ou les heures qui suivent la xénotransplantation. Il survient dans les cinq premières minutes de l'opération dans le cas du modèle cœur de rat à primate . Dans le système cœur de porc à primate , le délai d'apparition du rejet est de une à deux heures.(6)

b) Les acteurs initiaux : Enzyme, Antigène et Anticorps

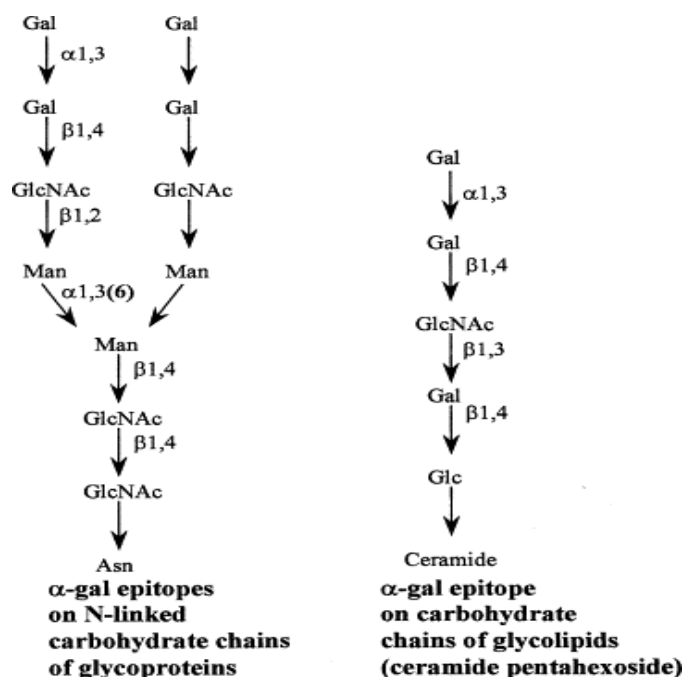
La cause principale du rejet suraigu réside en la liaison d'un anticorps naturel du receveur à l'antigène alpha-gal du donneur.

1. L'antigène : l'épitope « alpha-gal »

a. Sa description

Il s'agit d'une structure glucosidique, plus précisément d'un épitope alpha-1,3-Galactosyl : Gal alpha1-3 Gal 1-4 GlcNac-R. (18) Il est représenté sur cette image :

Schéma 1 : Représentation de l'épitope Gal (36)



Comme l'illustre le schéma 1bis, l'enzyme responsable de l'existence de l'épitope alpha-gal est l'alpha-galactosyl Transférase.

Ces antigènes sont présents en quantité très abondante : 1×10^6 à 35×10^6 épitopes / cellule. (15)

b. Son expression sélective

Tous les mammifères n'expriment pas cet épitope Gal :

→ D'une part, les mammifères inférieurs (non-primates), les prosimiens et les singes du nouveau monde possèdent cette enzyme alpha-galactosyl transférase, responsable de la présence de l'épitope alpha-gal (gal-alpha1,3Gal) sur l'endothélium des vaisseaux des organes.

Ces mammifères, dont le porc, expriment cet épitope gal à des degrés plus ou moins importants au niveau de leur endothélium vasculaire. Un gros rongeur d'Amérique latine, le capybara, fait exception car il ne l'exprime qu'au niveau des globules rouges (C'est pour cette raison qu'il a été proposé comme donneur d'organes potentiel pour l'homme) (6)

→ D'autre part, l'homme et les primates de l'Ancien Monde (Afrique et Asie : babouins et chimpanzés) ne possèdent pas cette enzyme. Le gène codant reste présent mais est inactivé. Et par conséquent, ils vont reconnaître comme étranger l'épitope alpha-gal. Dès les premières semaines de la vie, il y a la synthèse d'anticorps naturels xénoréactifs (XNA ou xénoanticorps), absents à la naissance, suite à la colonisation de l'intestin par des bactéries qui ont des groupements galactose sur leur paroi cellulaire. La majorité de ces XNA sont des Immunoglobulines M, mais on retrouve aussi des Immunoglobulines de classe G et A. Le but initial de cette synthèse étant de lutter contre les micro-organismes infectieux, l'élimination des cellules mortes et la régulation des réponses immunes. (15)

Le schéma 1bis résume la situation. Quant au tableau 3, il cite avec plus de précision les animaux concernés .

Schéma 1bis : L'origine de l'épitope alpha-gal (23)

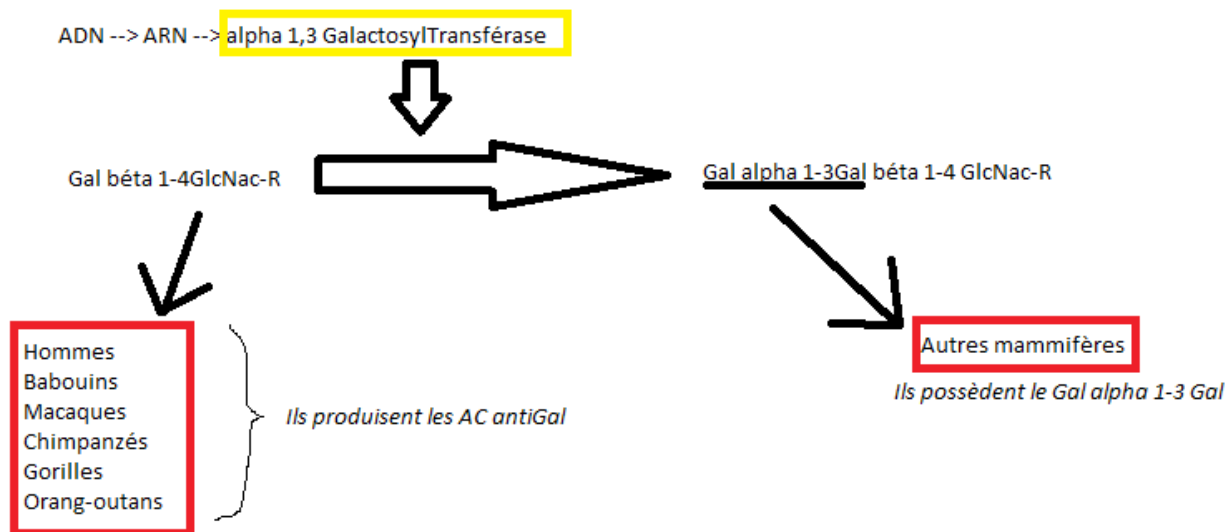


Tableau 3 : Distribution de l'épitope Galactosyl dans le règne animal (61)

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

c. L'évolution et la perte de cet épitope chez l'être humain

L'homme a perdu durant son évolution phylogénétique l'expression de ce sucre galactose alpha1-3 galactose à la surface de ses cellules . (10)

Cette perte date de 20 à 35 millions d'années, au moment de la séparation des continents africain et américain. Cette perte d'expression pourrait avoir été causée par l'action d'un agent infectieux endémique à l'Afrique et à l'Asie. (15)

2 Les anticorps naturels xénogéniques

a. Immunoglobulines et rejet

Ces XNA sont une sous-population des Anticorps naturels. Il peuvent représenter 1 à 4 % des Immunoglobulines totales.(6)

Les rôles de ces différentes immunoglobulines sont les suivants :

- L'Immunoglobuline M est responsable du rejet suraigu. Elle se charge de l'activation du complément (la voie classique) et de l'activation endothéliale.

- L'Immunoglobuline G exerce, à l'inverse des Ig M, un rôle protecteur vis-à-vis du rejet suraigu, par modulation de l'activation du complément (probablement par compétition* antigénique avec les Ig M). On note également un rôle dans le rejet vasculaire et chronique : ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des AC).

Les immunoglobulines G sont caractéristiques de la réponse immunitaire secondaire et de la mémoire.

- L'Immunoglobuline A a une fonction dans l'activation de la voie alterne du complément (dans une situation pathologique telle que la néphropathie, où les IgA sont polymériques et glycosylées de manière aberrante).

Notons que les immunoglobulines D et E n'interviennent pas dans l'activation du complément. (76) et (6)

*Un mot sur ce phénomène de compétition antigénique entre les immunoglobulines M et les immunoglobulines G : Une telle concurrence s'explique par le fait que l'avidité fonctionnelle des IgG et IgM pour α Gal sont à peu près du même ordre, les concentrations molaires sont comparables dans certains sérums. Cette compétition se prouve également par le fait que la liaison des IgM humaines à l' α Gal porcine est inversement corrélée avec la concentration des IgG anti-Gal. Ainsi, en rivalisant avec les IgM pour la liaison à α Gal, les IgG antiGal modulent ainsi la fixation du complément médiée par les IgM.

Précisons enfin que les IgG(de type 2 principalement) atténue jusqu'à 80% de la fixation de C1q. (84)

b. Anticorps naturels xénogéniques et rejet

On peut prouver le rôle de ces XNA dans le mécanisme de rejet par :

. la présence de dépôts d'Immunoglobulines dans les organes rejetés,

. le développement d'un rejet après leur transfert passif,

. l'absence de rejet suraigu après leur seule élimination,

. l'absence d'un rejet suraigu pour un organe de porc greffé chez un nouveau-né, exempt donc d'anticorps naturels. (6)

c. Comparaison entre greffe concordante et discordante

En théorie, le titre des XNA est d'autant plus élevé que le donneur et le receveur appartiennent à des espèces plus distantes dans l'échelle zoologique. En pratique cependant, la violence de la réaction s'avère très différente selon le modèle expérimental étudié.

Dans le modèle porc à chien, la destruction se produit dans les minutes qui suivent l'opération.

Dans le cas d'un xéno greffe de porc-à-babouin, la production d'urine peut dépasser les 24 heures post-greffe.

(15)

Le rejet hyperaigu est caractéristique des greffes discordantes, ce qui est le cas de la xéno greffe de rein de porc chez l'homme.

En revanche si le donneur et le receveur appartiennent à la même classe, donc dans le cas d'une greffe dite concordante, il n'y aura pas d'anticorps XNA, tel que le résume ce tableau:

(23)

Combinaison DISCORDANTE	Combinaison CONCORDANTE
Anticorps préformés	Pas d'Anticorps préformés
Rejet Hyperaigu	Pas de Rejet Hyperaigu

d. Les anticorps anti non gal

Enfin, on peut s'interroger s'il existe d'autres complexes antigène-anticorps responsables de ce type de rejet :

L'existence d'anticorps naturels dirigés contre des épitopes non-alphaGal reste à démontrer.

(18)
En effet : la structure Gal n'est probablement pas la seule structure antigénique reconnue par les anticorps humains à la surface des cellules endothéliales porcines. Effectivement, l'élimination soit des AC anti-gal, soit des déterminants galactosylés (par digestion enzymatique) n'élimine que 80 % environ de la réactivité anti-porc. Ces autres antigènes dont la nature est encore mal connue pourraient jouer un rôle important dans une réponse AC induite, après la transplantation. (6)

Nous reparlerons de ces antigènes non Gal dans la dernière partie de cette thèse.

c) Les différentes étapes du rejet suraigu :

Voici les différentes étapes en cascade du rejet hyperaigu :

La reconnaissance des AC naturels xénoréactifs (circulant dans le sang du receveur primate) par les épitopes alpha-gal (présents sur l'endothélium du donneur non-primate) entraîne l'activation de la **voie classique du système du complément** . Celle-ci a pour conséquence la formation et la fixation du complexe d'attaque membranaire (C5b-C9) . On parle alors d'**activation endothéliale** de type 1 qui consiste en l'inflammation et la lyse endothéliale, provoquant ainsi la destruction des capillaires, responsable d'hémorragies interstitielles et d'oedème interstitiel. (6) Seront aussi observés : l'agrégation de **plaquettes**, la coagulation, le dépôt de fibrine et un phénomène de vasoconstriction ...qui à long terme auront pour conséquence la thrombose vasculaire bloquant la circulation sanguine au niveau du greffon, causant ainsi la nécrose de la xéno greffe. (61)

Penchons-nous avec plus de précision sur l'activation du complément et l'activation endothéliale qui entrent en jeu dans ce mécanisme.

1. L'activation du complément :

a. Le complément et le rejet

Le rôle du complément est primordial dans le rejet suraigu. Il joue un rôle important dans la modification de la physiologie de l'endothélium du greffon.

Trois preuves le démontrent :

Tout d'abord, un dépôt de protéines du complément est observé dans les organes greffés rejetés. De plus, la survie des xénogreffes se prolonge après inhibition du complément. Enfin, le rejet suraigu est absent chez les receveurs qui présentent une déficience congénitale pour un facteur du complément. (6)

b. Les voies d'activation du complément

Trois voies distinctes activent le complément. Le schéma 2 les illustre parfaitement.

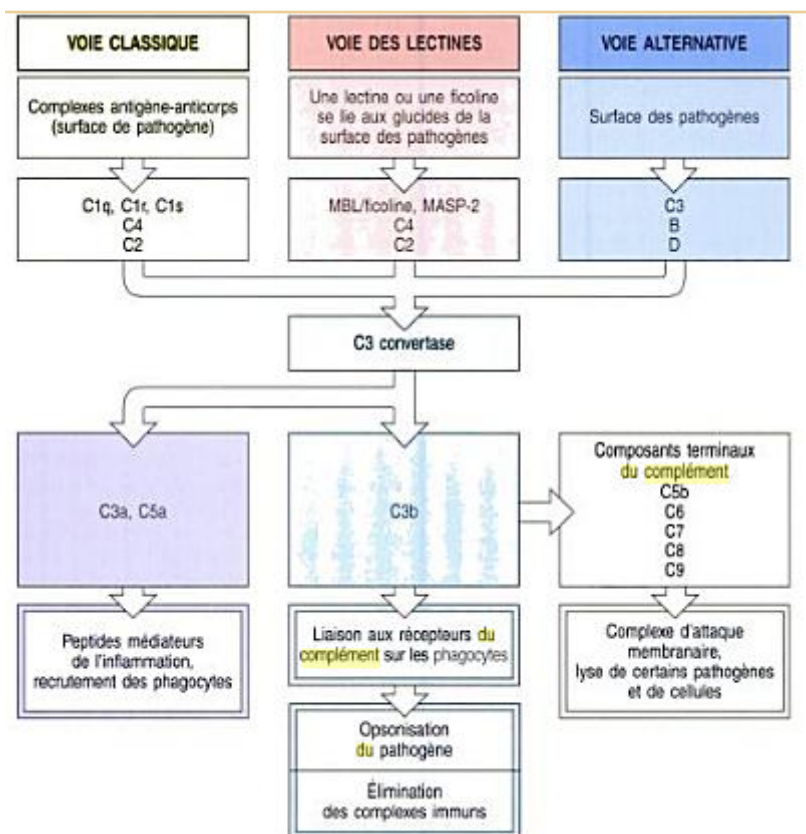
- 1) La voie classique qui est initiée par la présence d'un complexe antigène-anticorps
- 2) La voie alterne qui est directement activée par le dépôt de fragments C3b sur une surface ou une substance étrangère
- 3) La voie des lectines : MBP (Mannose Binding Protein, de la famille des collectines) se lie aux résidus mannose et GlcNac (N-acétylGlucosamine) des microorganismes. Ces interactions vont activer les sérine Protéase (MASP 1, 2 ou 3) qui cliveront et activeront C4 et C2. C'est ensuite la voie commune à celle de la voie classique qui sera poursuivie. (83)

Dans le modèle xénogreffe porc-primate, de nombreux travaux suggèrent l'importance de la voie classique. Cependant certaines expériences in vitro n'excluent pas totalement la participation de la voie alterne.

Notons que dans le modèle cobaye-rat ou lapin-homme, c'est la voie alterne qui domine.

(6)

Schéma 2 : Voies d'activation classique et alterne du complément (71)



Ainsi, comme le témoigne le schéma2, plusieurs mécanismes effecteurs interviennent dans le système du complément :

Premièrement, l'enzyme C3convertase se charge du clivage de l'élément C3 en C3a et en C3b. Deuxièmement, l'enzyme C5convertase, issue de l'association de C3b et de la C3convertase, clivera C5 en C5a et en C5b. Les rôles de ces divers fragments du complément sont les suivants : C3a et C5b, nommés anaphylatoxines, sont les médiateurs de l'inflammation locale et du chimiotactisme des polynucléaires. Ensuite, C3b est responsable du phénomène d'opsonisation, celui-ci sera suivi d'une ingestion par les phagocytes. Enfin, C5b est le déclencheur d'une cascade d'activation tardive qui mènera à l'élaboration du complexe d'attaque membranaire(CAM). Le CAM endommage les membranes des pathogènes et lyse les cellules endothéliales étrangères. (6)

c. La régulation du complément

Nous aborderons dans la partie « stratégies » les différentes façons de contrer le rejet suraigu, notamment en inhibant le complément du receveur :

- Le venin de cobra entre en compétition avec C3
- Les AC monoclonaux dirigés contre des fractions du complément

L'inconvénient est une inhibition du complément prolongée et des effets à long terme méconnus. (6)

- Principalement : l'intervention d'une dizaine de protéines régulatrices du complément, plasmatiques et membranaires, qui se chargeront d'inhiber le complément : Les plus connues dans le domaine de la xénotransplantation sont :

- CD35 = CR1 : Récepteur soluble recombinant de type 1 : Il régule négativement, il inhibe la

cascade du complément au niveau de la voie classique et alterne.

- CD46 = protéine cofacteur de membrane, MCP (Membrane Cofactor Protein) : Il inhibe les convertases C3 et C5.

- CD55 = hDAF (Human Decay Accelerating Factor) : Il inhibe les convertases C3 et C5.

- CD59 = protectin= MAC-IP-protéine inhibitrice de la formation du complexe d'attaque membranaire.

(61)

2. L'activation de l'endothélium :

L'épitope Gal est présenté à la surface des cellules endothéliales de porc par des glycolipides et des glycoprotéines telles que le facteur von Willebrand (FvW) et les intégrines . Ce qui suggère que la fixation des XNA pourrait moduler la fonction des cellules endothéliales par des processus de signalisation cellulaire . (6)

a. Activation endothéliale et coagulation

Le terme « activation endothéliale » comprend un certain nombre de modifications morphologiques et phénotypiques. La conséquence d'un tel phénomène est l'établissement d'un environnement procoagulant favorisant l'adhésion des plaquettes et initiant la cascade de la COAGULATION.

(6)

b. Activation endothéliale et rejet

Plusieurs preuves attestent de l'importance du rôle de l'activation endothéliale au cours du rejet de la greffe :

- Une première preuve est la suivante : Après incubation de cellules endothéliales porcines avec du sérum humain (ou des immunoglobines humaines purifiées) , on observe la transcription de plusieurs gènes tels que Interleukine 8, PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I)

- De plus, en présence du complément et d'anticorps, les cellules endothéliales porcines en culture vont subir des modifications morphologiques comme une rétractation cellulaire.

- Enfin, la thrombine, les cellules natural killers, les monocytes et d'autres facteurs présents dans le contexte d'une xéno greffe sont capables d'activer l'endothélium.

(6)

c. Comparaison de l'activation endothéliale de type I et II

Si l'activation endothéliale intervient dans le mécanisme du rejet suraigu, il en est de même pour le rejet vasculaire aigu, dit rejet retardé ou humoral (que nous aborderons plus bas).

Il existe deux phases dans l'activation de l'endothélium...

Le tableau 4 se charge d'établir la comparaison en ce qui concerne le délai d'apparition, le type de rejet concerné et les caractéristiques principales des deux phases de l'activation de l'endothélium.

Tableau 4 : Comparaison entre l'activation endothéliale de phase 1 et le rejet vasculaire aigu de phase 2. (6) et (18)

<u>Activation endothéliale :</u>	De phase 1	De phase 2
<u>Cinétique :</u>	Apparition précoce, immédiate	Apparition tardive
<u>Intervient dans :</u>	Le rejet SURAIGU	Le rejet VASCULAIRE AIGU
<u>Dépendante de la synthèse protéique de novo :</u>	NON (relargage de molécules préformées)	OUI Activation de NFkappaB*, facteur transactivateur qui va conduire à la transcription de gènes codant pour la synthèse de protéines.
<u>Caractérisée par :</u>	<ul style="list-style-type: none"> - La rétraction cellulaire responsable d'oedèmes et d'hémorragies, ainsi que l'exposition de la surface pro-coagulante du sous-endothélium - La perte des héparanes sulfates - La sécrétion du facteur von willebrand et du PAF (facteur d'activation plaquettaire) - L'expression à la surface endothéliale de molécules d'adhérence : P-sélectine 	<ul style="list-style-type: none"> - La perte des héparanes sulfates (à nouveau) et de la thrombomoduline de la surface cellulaire - La synthèse par la cellule de facteurs de coagulation : le FT et le PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène) - La production de cytokines (IL1, IL6) et de chimiokines (IL8, MCP1, RANTES) - L'expression à la surface cellulaire de molécules d'adhérence : E-sélectine (adhérence leucocytaire), ICAM-1 (adhérence intercellulaire), VCAM-1 (adhésion des cellules vasculaires). - L'expression à la surface cellulaire de CMH I et II. - La synthèse d'agents vasoactifs : prostacycline, monoxyde d'azote et endothéline 1. - La libération de facteurs de croissance (GM-CSF, TGFα).

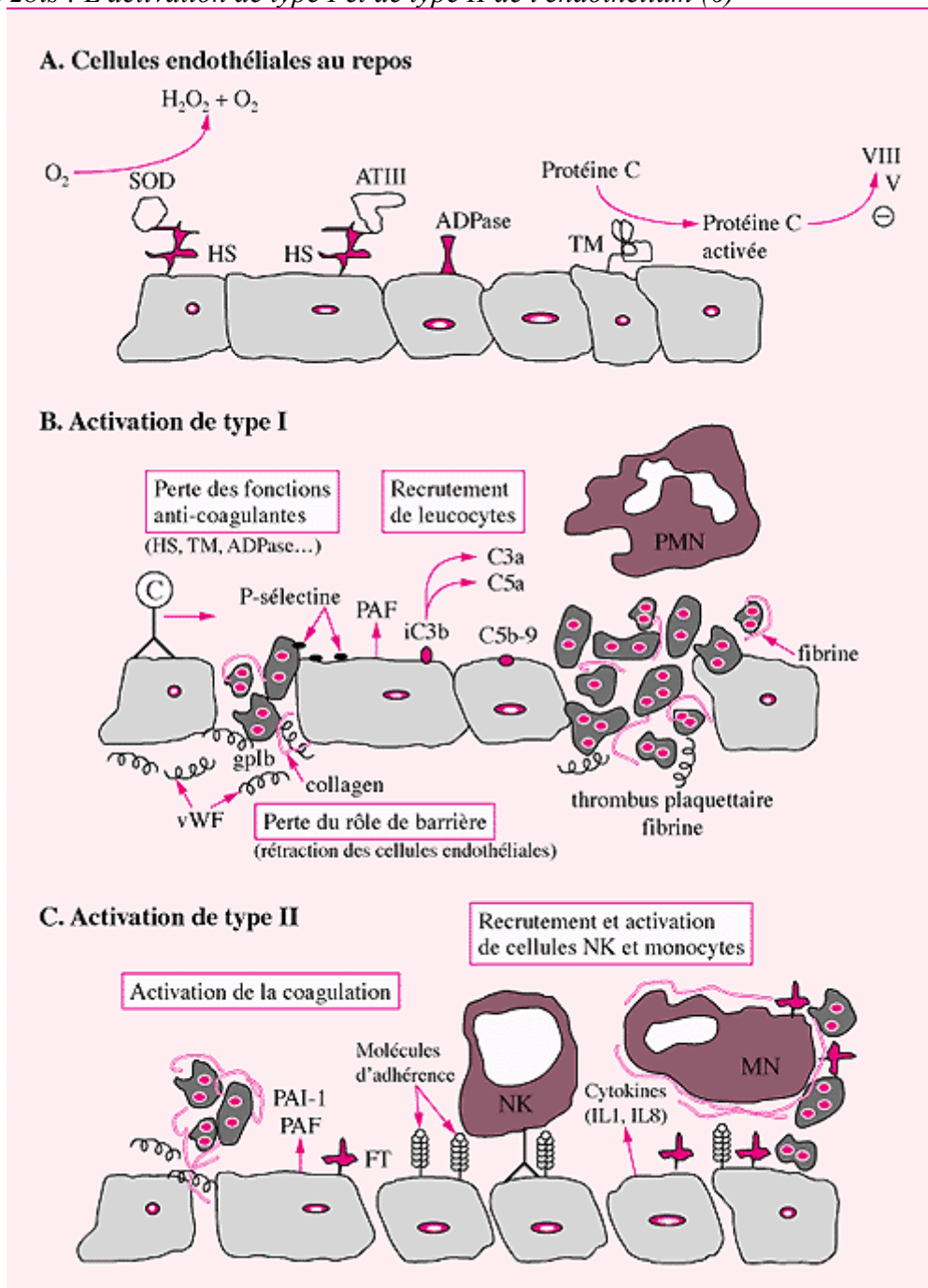
Les anticorps et le complément, en détruisant l'endothélium, vont exposer une surface procoagulante et proinflammatoire. Nous étudierons, par la suite, les stratégies anti-rejet qui consisteront, par conséquent, à neutraliser donc les anticorps et le complément, ainsi qu'à agir sur l'inflammation et la coagulation...(6)

*Il est important de signaler que le NfκB, en plus de son rôle dans le processus inflammatoire, va également conduire à l'induction de gènes protecteurs codant pour des molécules anti-apoptotiques telles que A1, A20, Bcl-xL, bcl2 et HO-1 (hème oxygénase) . (18)

Ces gènes luttent contre l'apoptose, mais aussi l'inflammation : Par exemple, l'interleukine 10 induit l'expression d'hème-oxygénase 1 (HO-1) , protéine inductible par le stress et dont l'effet est anti-inflammatoire (par l'intermédiaire d'une protéine kinase). (63)

Concluons par l'illustration de l'activation endothéliale via le schéma 2bis :

Schéma 2bis : L'activation de type I et de type II de l'endothélium (6)



Légende :

HS = héparane sulfate ATIII = antithrombine TM = thrombomoduline
 PAF = facteur d'activation plaquettaire FvW= facteur van willebrand
 FT = facteur tissulaire PAI = inhibiteur de l'activateur du plasminogène
 IL = interleukine

d) Comparaison au Système ABO des allogreffes

Ce type de rejet est comparable à celui qu'on observe dans les cas d'allogreffes humaines de groupe sanguin ABO-incompatible chez un receveur non-préparé. Les anticorps naturels (c'est-à-dire présents dans la circulation sanguine indépendamment de toute stimulation antigénique) anti A et anti B sont des isoagglutinines. Il s'agit de glycoprotéines dont la structure est d'ailleurs très proche des glycoprotéines anti-gal. (15)

Ces épitopes Gal se retrouvent sur tout l'endothélium vasculaire et dans tous les organes de porc, de façon similaire à l'expression des déterminants du groupe sanguin chez l'homme. La structure Gal est apparentée au déterminant du groupe sanguin B. Les alloAC antiB pourraient par conséquent intervenir en xénotransplantation. (6)

Après le rejet hyperaigu, intervient le rejet aigu :

2) LE REJET AIGU

Il y a deux types de rejet aigu : le rejet vasculaire aigu et le rejet cellulaire aigu.

Dans les deux cas, des **cellules** joueront un rôle important. La composante cellulaire du rejet vasculaire concerne la réponse immunitaire innée, impliquant les **macrophages et les natural killers**. Tandis que le rejet cellulaire fera intervenir majoritairement des **lymphocytes**, caractéristiques du système immunitaire adaptatif.

a) LE REJET VASCULAIRE AIGU

Le rejet vasculaire aigu est aussi appelé rejet retardé, différé (6) ou encore rejet humoral.

Il est considéré actuellement comme le principal obstacle de la xénotransplantation clinique d'un organe vascularisé porcin.

1. Délai d'apparition

Le délai d'apparition de ce rejet est compris entre deux à trois jours à quelques semaines suivant l'opération selon les cas. D'un point de vue clinique, les manifestations sont une thrombose vasculaire, des vaisseaux endommagés, un oedème interstitiel, et un phénomène de nécrose. (19)

2. Les acteurs

De nombreux travaux soulignent l'importance des anticorps dans la genèse de ce rejet vasculaire. La réponse immunitaire humorale rentre en jeu, provoquée par les XNA. Il s'agit d'immunoglobines G anti Gal ou contre d'autres antigènes présents sur l'endothélium porcin. Il y a également une participation cellulaire impliquant les macrophages, les natural killers, les neutrophiles... Quant au complément, celui-ci n'est plus le médiateur principal, contrairement au rejet suraigu. Son rôle est débattu étant donné que le rejet vasculaire est observé même lorsque le complément du receveur est inhibé. (6)

3. Le mécanisme

Le mécanisme du rejet vasculaire aigu est plus complexe que celui du rejet suraigu. Deux mots clés sont inflammation et recrutement cellulaire. (6)
Deux types d'activation sont rencontrés : celle des macrophages et celle de l'endothélium.

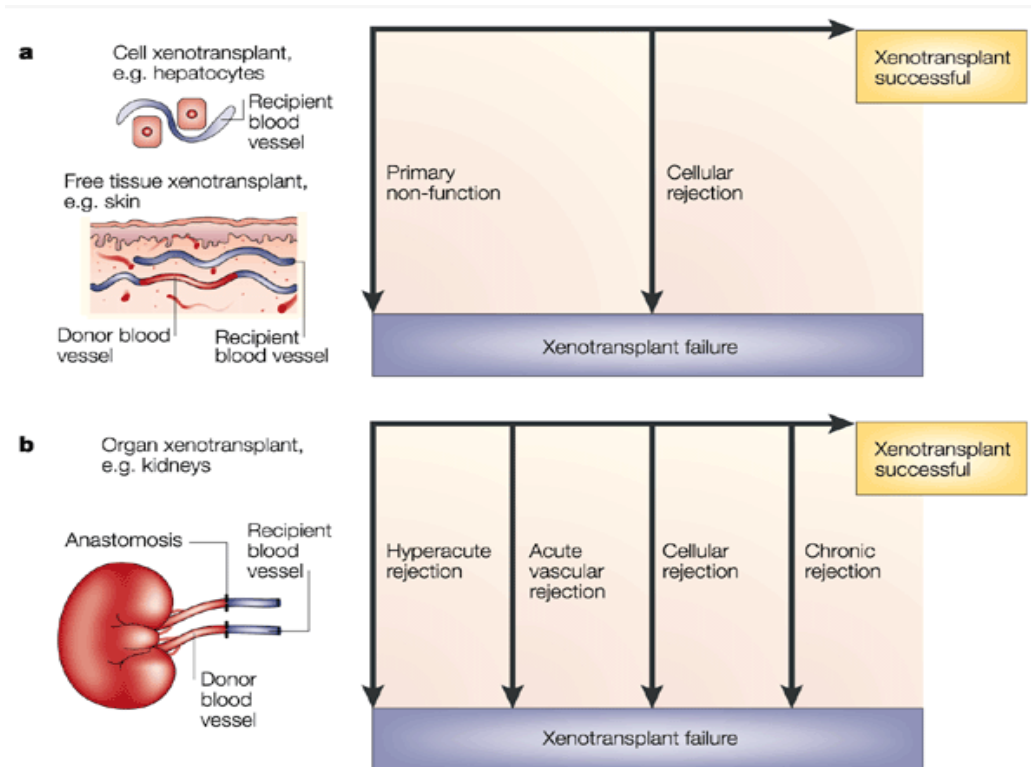
La fixation des anticorps sur les antigènes au niveau de l'endothélium porcine va entraîner d'une part une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) impliquant l'activation de NK, de macrophages et éventuellement de neutrophiles. Cet infiltrat cellulaire est composé de 10 à 20% de NK et de 70 à 80% de macrophages. Cette ADCC aboutira à la destruction de l'endothélium.

D'autre part, le complexe antigène-anticorps participe au déclenchement de l'activation endothéliale :

Il s'agit ici de l'activation endothéliale de phase II.
Je vous renvoie au tableau 4 (plus haut).

Notons également que le rejet VASCULAIRE est caractéristique des xéno greffes d'organes. On ne le rencontre pas, comme le témoigne le schéma 14, dans les greffes de tissus ou de cellules :

Schéma 14 : Différents types de rejet dans les greffes de cellules et les greffes d'organes (82)



La figure a représente le cas d'une greffe de cellule : d'hépatocyte. Il faut franchir l'étape du rejet cellulaire avant d'estimer que la greffe est réussie.

Dans la figure b, qui concerne la greffe d'organe, on observe que pour que la greffe soit un succès, il faut surpasser quatre types de rejet différents, notamment le rejet vasculaire.

b) LE REJET CELLULAIRE AIGU

1. Les acteurs

Dans ce cas, il s'agit de l'intervention de l'immunité cellulaire. Celle-ci est médiée par les cellules NK, les macrophages et surtout les lymphocytes T.

2. Le mécanisme

Ce recrutement cellulaire est une conséquence inflammatoire de l'activation endothéliale abordée plus haut. (18)

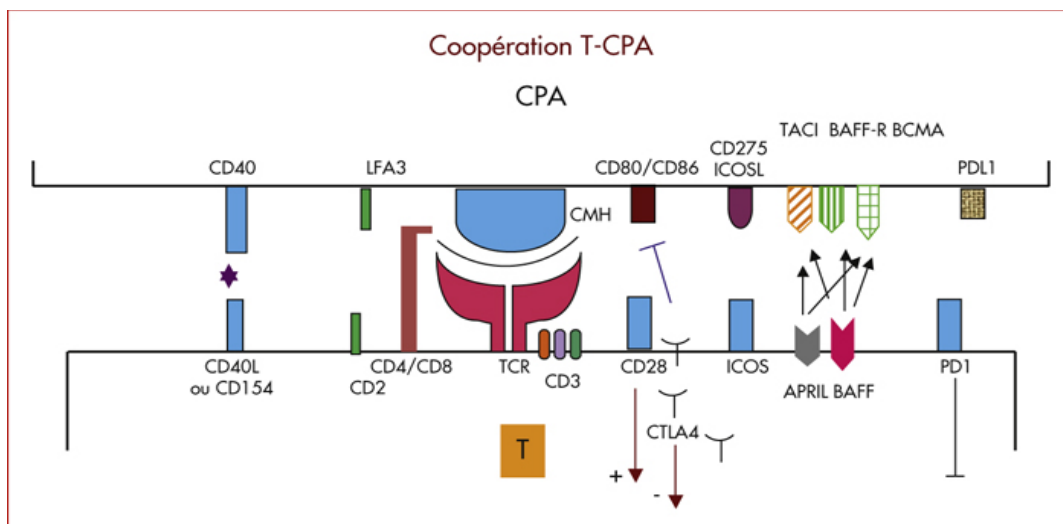
Dans un premier temps, à partir de 12 à 24 heures, l'infiltrat cellulaire sera composé de macrophages activés et de NK, alors que les lymphocytes T jouent un rôle mineur les premiers jours (contrairement à l'allogreffe). Les lymphocytes T ne prendront le dessus que dans une étape plus tardive du rejet cellulaire. (19) Lors de greffes de porc à babouin, les biopsies prélevées au cours de la seconde semaine ont révélé l'existence d'un infiltrat de type lymphocytaire abondant. (15)

Les cellules présentatrices d'antigène (CPA), après avoir phagocyté les antigènes du greffon, vont se charger de les présenter aux lymphocytes T CD4 via le CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité). La conséquence est une synthèse d'interleukine 2. Les lymphocytes T CD8 peuvent également être activés via la présentation des antigènes par le CMH de classe I.

(75)

Le schéma 11 représente les molécules de stimulation et les molécules d'adhérence qui interagissent entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène.

Schéma 11 : Interactions entre le LcT et la CPA (66) :



Note : Il existe aussi l'interaction entre LFA-1(CD11a/CD18) du lymphocyte T et ICAM1 (CD54) de la CPA, ne figurant pas sur le schéma 11. (23)

3. Les manifestations cliniques

La manifestation clinique de ce type de rejet est la nécrose du parenchyme du greffon.

4. Comparaison avec le rejet allogénique

En comparant les réactions du système xénogénique à celles du système allogénique, on conclut que les mécanismes impliqués semblent similaires mais varient par leur intensité. En effet, le rejet aigu sera beaucoup plus important en xénotransplantation.

Cette observation trouvent quatre explications :

- 1) Tout d'abord, les antigènes sont susceptibles d'être plus nombreux dans le cas de la xéno greffe.
- 2) Deuxièmement, les mécanismes régulateurs du SI via les cytokines sont moins efficaces en xénotransplantation.
- 3) De plus, le système xénogénique privilégie une réponse immunitaire indirecte, faisant intervenir les cellules présentatrices d'antigène du receveur, alors qu'en allotransplantation, la réponse immunitaire est directe. En effet, ce sont les cellules dendritiques du donneur qui se dirigeront dans les organes lymphoïdes secondaires du receveur pour l'activation des lymphocytes T afin que ceux-ci se multiplient et migrent vers le greffon.
- 4) Enfin, alors que la ciclosporine permet d'évincer le rejet aigu d'une allogreffe, les immunosuppresseurs classiques se révèlent insuffisants dans le cas des xéno greffes.

L'ultime stade du rejet est la phase chronique:

3) LE REJET CHRONIQUE

Le rejet chronique est mal connu en allogreffe...Et les données sont pour ainsi dire absentes en xéno greffe étant donné la courte durée de survie des xénotransplants. (61)

a) Délai d'apparition

Ce dernier type de rejet va se faire de façon lente et progressive, il peut survenir beaucoup plus tard dans la vie du patient greffé.

b) Le mécanisme

Le mécanisme de ce rejet est un remplacement des structures du greffon par du tissu conjonctif. Cela entrave le bon fonctionnement de l'organe greffé.

Deux observations sont à relever :

D'une part, les macrophages activés par les lymphocytes vont sécréter des facteurs de croissance qui vont entraîner la prolifération de cellules mésenchymateuses...on parle de fibrose.

D'autre part, des lésions vasculaires sont sources d'ischémie prolongée. Ces macrophages activés sont aussi responsables de la multiplication de cellules musculaires lisses (qui s'accumulent sur la paroi des vaisseaux). Cette multiplication est responsable de thromboses vasculaires... Le réseau vasculaire se durcit et rétrécit. On parle ici d'artériosclérose du greffon. (19) (59)

B) L'OBSTACLE PHYSIOLOGIQUE ET ANATOMIQUE

Pour qu'une greffe soit réussie, la compatibilité anatomique et physiologique des organes humains et porcins doit être garantie à long terme. Malheureusement, très peu de données expérimentales nous éclairent sur la capacité ou l'incapacité d'un rein porcine à assurer les fonctions vitales humaines. Plusieurs facteurs rentrent en jeu : le gabarit des organes, leur durée de vie, leur température, les molécules hormonales et protéiques, le caractère environnemental ainsi que le type de nutrition requis. (9) (12)

1) La taille des organes

Quelques exemples de problème de taille : Le rein de primate est trop petit pour être fonctionnel chez un homme adulte. Il en est de même pour un cœur de porc.

2) La longévité

La durée de vie de la plupart des porcs est d'environ 15 ans. On ignore actuellement si le greffon pourrait fonctionner plus longtemps car les données expérimentales font défaut.

3) La température corporelle

La moyenne chez le porc est de 39°, celle de l'homme est de 37°.

4) Les différences d'hormones, de protéines

Il existe des incompatibilités moléculaires. Ce problème concerne davantage les greffes hépatiques.

Tous les organes sont sous contrôle hormonal et on ignore si les hormones humaines sont capables de contrôler les organes animaux. Il y a eu le cas d'un patient, greffé d'un rein de babouin, mort de déshydratation suite à une sécrétion d'urine totalement incontrôlée.

Le taux de cholestérol est plus élevé chez l'homme que chez le porc. Il y a-t-il un risque d'obstruction du greffon par des plaques d'athérome ?

Les compatibilités physiologiques entre organes porcins et humains sont encore méconnues, en ce qui concerne par exemple les différences de spécificités enzymatiques, les problèmes de compatibilité ligand-récepteur, les différents rythmes chronobiologiques, la sensibilité aux stimulations neurogènes...(7)

5) L'environnement

On note entre le porc et l'homme des différences de pression hydrostatique pouvant influencer sur le fonctionnement de l'organe.

6) Les besoins en substances nutritives

Par exemple, les besoins en oligoéléments et en vitamines de l'homme diffèrent de ceux du porc. → (9) (12)

C) L'OBSTACLE VIRAL

Ce chapitre présentera ce que les virologues redoutent, la façon dont se définit et se réplique le rétrovirus de manière générale, avant d'aborder les rétrovirus spécifiques du porc...et son impact hypothétique sur la population mondiale.

1) LES CRAINTES

Plusieurs spécialistes redoutent que les animaux donneurs n'hébergent des agents pathogènes qui, tels le virus Ebola ou l'agent de la maladie de la vache folle, seraient susceptibles de menacer la santé humaine. En effet, après avoir contaminé un patient greffé, ces agents pathogènes pourraient se répandre dans la population générale et y déclencher une épidémie. (17)

Ce phénomène porte le nom de zoonose, zoonose ou encore xénose.

Par exemple, le cas de la grippe aviaire illustre le phénomène de transmission de virus malgré la barrière interspèce. Il s'agit ici de la transmission du virus influenza A/H5N1 de l'oiseau à l'homme. (77)

Les chercheurs ne craignent pas tellement les agents pathogènes qui déploient des effets immédiats et dramatiques, comme l'exemple du virus Ebola. Leur principal souci porte sur des agents comme le virus du sida qui se répandent pendant des années de façon silencieuse, qui sont difficiles à découvrir en raison du manque de symptômes et qui recèlent ainsi le risque d'une épidémie pouvant même devenir mondiale. (12)

La xénotransplantation augmente le risque de transmission de maladies de deux manières :

D'une part, l'opération de greffe viole la barrière physique du receveur qui le protège naturellement contre les maladies.

D'autre part, la xéno greffe s'accompagne d'une immunosuppression du receveur. Celui-ci va donc perdre ses défenses naturelles contre les virus et autres microbes. Cette immunosuppression est due à l'immuno thérapie anti-rejet post-greffe et également à l'inactivation des protéines du système du complément de l'homme, moins apte à se défendre. (16)

Ainsi, les organes animaux peuvent abriter des microorganismes dont ils sont seulement porteurs sains (car ils ont développé au cours de l'évolution des mécanismes de protection les rendant résistants) ces microorganismes sont susceptibles de franchir la barrière d'espèce et de s'exprimer chez le greffé immunodéprimé. (7)

En conclusion, on craint donc un danger individuel et collectif (23) :

En effet, la xénotransplantation pourrait dans un premier temps favoriser l'infection du receveur par un virus porcine et, dans un second temps, cette infection pourrait se transmettre aux différents contacts du receveur : le personnel soignant, la famille, l'entourage proche, moins proche et finalement la population toute entière. (11)

Selon Fritz Bach (Médecin chercheur autrichien, diplômé de Harvard aux USA) : « Il nous faut peser un bénéfice individuel face à un risque collectif » (14)

En France, un récent rapport du comité national d'éthique soulève un certain nombre de questions dont la principale : le risque infectieux. (1)

(Une loi de la bioéthique et une loi de la sécurité sanitaire sont en cours de discussion.)
Tout le dilemme repose sur le passage du « savoir » au « faire ». La connaissance doit pouvoir se développer librement, mais la mise en pratique ne peut échapper au contrôle de ses risques éventuels. (16)

2) LES RETROVIRUS

a) Définition et origine

Un rétrovirus est un virus dont la stratégie de réplication est d'insérer son propre génome dans celui de la cellule de l'hôte infecté.

Ces séquences génétiques peuvent produire des particules virales infectieuses.

Les rétrovirus endogènes sont des vestiges d'anciennes infections virales, trouvés dans le patrimoine génétique de la plupart des espèces de mammifères.

La présence de ces séquences s'explique par des infections rétrovirales subies par les ancêtres des mammifères actuels.

Lorsque les virus sont intégrés dans l'ADN chromosomique des spermatozoïdes et des ovocytes, sous forme d'ADN proviral, ils sont transférés verticalement par héritage. Ils se transmettent de façon mendélienne. En raison de nombreuses mutations, ils ne sont généralement pas infectieux chez l'espèce hôte, mais le virus peut devenir contagieux chez une autre espèce, en ayant conservé un pouvoir pathogène. (17)

b) Réplication d'un rétrovirus infectieux

La réplication d'un rétrovirus est structurée en plusieurs étapes :

Tout d'abord, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN par une rétrotranscriptase virale qui utilise un ARN de transfert cellulaire spécifique s'hybridant à la région PBS du génome rétroviral.

Ensuite, ce provirus (ADN bicaténaire) est intégré dans le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase virale.

L'expression de ce provirus intégré est ainsi dépendante de la machinerie cellulaire de l'hôte. Le provirus est flanqué par de longues régions répétées (LTR) issues de séquences virales R-U5 et U3-R qui contiennent les séquences promotrices et modulatrices conférant une expression tissu-spécifique ainsi que les signaux de polyadénylation.

La troisième étape consiste en la transcription du provirus, celle-ci induit la synthèse d'ARNm qui seront traduits en protéines. Les ARNm non épissés ou génomiques permettent la synthèse de protéines codées par les gènes gag, pro et pol. Quant aux ARNm épissés ou sous-génomiques, ils conduisent à la synthèse des glycoprotéines de l'enveloppe.

Enfin, l'assemblage des protéines virales en présence d'ARN génomique conduit à la formation de nouvelles particules infectieuses. (22)

c) Chez le porc :

Dans cette thèse, rappelons que l'animal concerné est le porc.

1. Les virus porcins en général :

Le porc est porteur de virus de l'herpès, le rotavirus, le parvovirus, le circovirus.

Il est également porteur d'autres virus tels que le virus de Nipah (responsable de maladies neurologiques et respiratoires chez les porcs des fermes de Malaisie), virus HAN1 (responsable de la grippe aviaire, décelée dans des échantillons prélevés sur des porcs en 2001 et 2003). (23)

Les principaux virus infectant le porc et qui pourraient être théoriquement dangereux pour notre espèce sont : les rétrovirus, le virus EMC (EncéphaloMyoCardite), le coxsackievirus, voisin du Cox B5 humain, les virus grippaux A. Le virus menangle semble pouvoir infecter aisément l'homme en contact avec les porcs. (14)

La plupart de ces virus sont potentiellement transmissibles. En effet, en Suède, des malades ayant reçu des cellules d'ilôts de langerhans foetaux de porc ont développé des anticorps contre la grippe de porc, le parvovirus et 5 autres virus porcins. Seul le parvovirus fût à l'origine de symptômes chez un des patients. (14)

2. Les rétrovirus endogènes porcins :

Focalisons-nous sur la principale préoccupation des virologues : les RétroVirus Endogènes Porcins (PERV).

- Leur découverte et classification :

Les PERV ont été découverts en 1997. (1)

Il y a 3 sous-groupes de PERV infectieux : les PERV A , B et C. Ces types de PERV sont comparables dans la région transmembranaire mais différents en région extracellulaire. (21)

On retrouve environ 50 génomes PERV dans l'ADN des porcs.(1)

PERV A possède entre 10 et 23 séquences provirales par cellule et PERV B en possède entre 7 et 12. (21)

- Le danger qu'ils représentent :

Même s'il est probable que la plupart d'entre eux soient défectueux, certains peuvent produire des virus infectieux. Chaque génome proviral devrait être séquencé pour déterminer ceux qui constituent une menace.

En effet, le danger est le suivant :

Les fragments viraux inactifs du donneur pourraient se combiner à ceux du receveur humain pour devenir une structure infectieuse active. Il pourrait en résulter de nouvelles pathologies parfois difficiles à identifier, faute de méthodes de détection validées. (19)

Ainsi, ces rétrovirus de porc une fois implantés chez l'homme risquent de se muter et de se combiner avec des rétrovirus humains, produisant un agent pathogène de type nouveau. Ces séquences provirales peuvent muter et intégrer des oncogènes pouvant induire des cancers chez le receveur. (7) Certains rétrovirus sont à l'origine de cancers et d'infections durables. (17)

3) RISQUE REEL POUR L'HUMANITE ?

La xénotransplantation met-elle réellement l'homme en danger à plus ou moins long terme ? Cette question est soulevée par de nombreux virologues et inquiète la plupart d'entre eux...

On pourrait penser que le risque de zoonose est faible étant donné que l'être humain vit depuis des siècles en étroite symbiose avec le porc, et que ce dernier ne lui a transmis que peu d'agents pathogènes. Mais rappelons que lors d'une xénotransplantation les défenses immunitaires du greffé seraient contournées, délibérément supprimées ! (12)

Des expériences in vitro ont montré que les PERV A et B peuvent infecter des cellules humaines en culture. (21) (24) (16) (14)

Cependant, il n'existe aucune preuve que les PERV peuvent infecter ou entraîner tout type de maladie chez les receveurs humains de cellules porcines ou d'organes porcins. (3)
Il n'existe pas de maladie qui soit assurément liée à des PERV, ni de preuve de leur pathogénicité chez l'homme. (1)

Le risque de transmission de maladies virales est donc toujours incertain. Plusieurs travaux publiés ont rapporté l'étude de patients transplantés avec des tissus porcins, avec un suivi allant jusque douze ans. Dans aucun des cas, une infection par rétrovirus porcine n'a pu être mise en évidence. (10)

Cette observation peut trouver son explication dans le fait que le porc et l'homme étant deux espèces phylogénétiquement éloignées, la transmission d'un rétrovirus porcine à l'homme devrait avoir peu de chance de se produire. En effet, la consommation de viande porcine, les blessures causées par le porc à l'homme, l'administration de médicaments d'origine porcine telle que l'insuline, ne se sont jamais accompagnés de transmission de maladies à l'espèce humaine. (1)

Toutefois, le développement de l'utilisation d'hépatocyte, de pancréatine et de FVIII d'origine porcine a été freinée par la découverte des PERV chez le porc. (24)

De plus, diverses expériences de xénotransplantation, telles que la greffe de peau de porc, d'ilôts pancréatiques ou la perfusion de sang humain via des reins de porcs, n'ont jusqu'ici jamais permis l'identification d'une quelconque maladie nouvelle.

Notons cependant qu'il a été retrouvé, en Suède, dans le sang de certains patients des AC dirigés contre les virus porcins : la grippe, le parvovirus et cinq autres virus porcins... Seul le parvovirus a entraîné des symptômes chez un des patients. (14)

L'intercommission II de l'INSERM estime que « les biorisques liés aux xénotreffes d'organes porcins peuvent être limités par de nouveaux résultats de recherche et qu'ils ne doivent pas interdire a priori tout essai thérapeutique chez l'homme. (7)

D) L'OBSTACLE ETHIQUE

La xéno greffe est une procédure controversée... au centre d'un débat dont les acteurs sont des médecins, des chercheurs, des spécialistes de la biologie moléculaire, de l'immunologie et de la pharmacologie, des virologistes, des juristes, des économistes, des philosophes, des religieux, les comités d'éthique.. et bien entendu la société.(1)

La xénotransplantation intrigue, elle dérange, elle engendre des questionnements existentiels et est source de polémique... Cette partie va mettre en avant trois sujets : l'homme, l'animal, et la société. L'homme et son identité propre, l'animal et ses droits, la société et son opinion, ainsi que ses pensées et ses religions.

1) LES PROBLEMES D'IDENTITE CHEZ L'HOMME

Il ne faut pas négliger les aspects psychosociaux, les réactions psychologiques pouvant toucher le malade mais aussi ses proches. A défaut de témoignages, le contenu de ce chapitre sera essentiellement fondé sur des questionnements...

a) Notion d'être humain et de personne

Tout d'abord, la greffe d'un organe animal chez l'homme a-t-il des répercussions sur l'identité de l'être humain ? Va-t-il percevoir son corps comme un puzzle dont certaines pièces sont animales ?

Définir l'être humain n'est pas simple... De nos jours, les différentes conceptions de l'humanité ont des implications morales, éthiques, scientifiques, juridiques et environnementales qui s'expriment, par exemple, dans les débats sur la personnalité juridique de l'embryon humain ou le statut des grands singes.

« La xénotransplantation ne devrait pas modifier la personnalité humaine, sa liberté, son niveau de responsabilité morale » .

Cependant, même s'il existait une démonstration objective que l'identité humaine n'est pas uniquement définie par un ensemble d'organes, il y a-t-il un risque que le patient greffé se sente rabaissé par rapport aux autres personnes « 100% humaines » ? Voire qu'il ressente de la honte par rapport à cet état « chimérique »? (1)

« Un foie cancéreux qui tue progressivement un homme lui conserve-t-il plus son humanité qu'un foie de porc qui lui permet de continuer à vivre et donc de garder sa définition d'homme ? » (7)

La notion de dignité humaine ne signifie pas que l'humanité d'un être humain réside dans ses organes. (7)

b) Notion de symbole

Deuxièmement, qu'en est-il de l'importance symbolique des organes ?

Concernant les organes, l'homme aura tendance à hiérarchiser l'importance des greffons. Un rein sera mieux accepté qu'un cœur, celui-ci étant attaché à une importance symbolique, le cœur étant l'emblème de l'amour. Le cœur est un organe systématiquement associé aux émotions, aux sentiments, à la vie.(1) En effet, on peut se demander quel serait l'impact psychologique sur un patient qui sentirait battre dans sa poitrine un cœur de porc.(12)

Il en est de même pour le cerveau : L'autopsie de patients, atteints de Parkinson et ayant

bénéficié de greffe de tissu nerveux porcin, a révélé qu'une connexion s'était établie entre les cellules nerveuses humaines et porcines. Cette constatation peut déranger, le cerveau étant le siège de la pensée, des souvenirs, de la réflexion...de ce qui caractérise l'homme et sa personnalité ! (9)

c) Notion de frontière

Un point important dans la xénotransplantation est l'idée de franchir une limite...avec une certaine notion d'interdit...trois types de frontières sont concernées ici : la frontière entre le soi et le non-soi, celle entre mort et vivant, et enfin entre être humain et être animal : (9) (7)

Selon CCNE 1999 (Comité Consultatif National d'Ethique pour les sciences de la vie et de la santé), « Toute greffe brise la frontière habituellement inviolée entre le soi et le non-soi ». (7)

L'allogreffe à partir d'un donneur cadavérique a la particularité de franchir la démarcation entre la vie et la mort. Dans ce cas, un sentiment exprimé de façon récurrente dans les témoignages est la culpabilité. Le poids handicapant de devoir sa survie à la mort d'un autre être humain. Sous cet angle, la xénotransplantation apporte une solution à ce problème. Néanmoins, le sacrifice d'un animal élevé dans l'unique but de servir de prothèse peut également peser sur la conscience du patient greffé. Quant au sujet dont fait l'objet notre thèse, c'est également la limite entre l'homme et l'animal qui va être transgressée. (7)

Penchons-nous sur l'animal dans le chapitre qui suit.

2) LE DROIT DE L'ANIMAL

L'animal, déjà utilisé comme bioproduit de médicaments, est en passe de devenir bioproduit d'organes... La recherche en xénotransplantation est d'une certaine façon «à contre-courant» dans notre époque actuelle où l'on chérit l'animal de compagnie, où l'on reconsidère l'animal d'élevage et où l'on défend l'animal de laboratoire...

a) L'évolution du statut de l'animal

Au cours de l'évolution de l'homme, la position de l'animal face à l'homme a elle aussi évolué...A l'époque des chasseurs-cueilleurs, l'animal était restreint à une **valeur nutritive**, avec la sédentarisation de l'homme, l'animal a acquis une **valeur instrumentale**... Et au XXème siècle, en découvrant la « sensibilité » de l'animal, l'homme lui confère une **valeur morale**.

En effet, bien que le Droit actuel considère l'animal comme une chose et non une personne, la Constitution Européenne tend à qualifier juridiquement l'animal d'« être sensible ». (9)

b) La protection de l'animal de laboratoire

Il tend de plus en plus à être protégé des utilisations expérimentales abusives :

En 1959, les scientifiques biologistes britanniques William Russel et Rex Burch établissent «**La règle des 3 R**» :

« Remplacer, totalement ou partiellement, les animaux de laboratoire par des expériences qui n'en utilisent pas (R1).

Réduire autant que possible le nombre d'animaux qui restent nécessaires, grâce à de meilleurs protocoles expérimentaux ou à une utilisation plus judicieuse des résultats antérieurs (R2).

Raffiner les procédures expérimentales ainsi que les conditions physiques et sociales d'hébergement, afin de réduire autant que possible la souffrance infligée aux animaux de laboratoire» (R3).

Cette règle appliquée à la xénotransplantation équivaut à :

R1= Recourir à l'allogreffe et à d'autres alternatives dès que c'est possible. Ne pas banaliser l'acte de xéno greffe. (Les alternatives de la greffe seront évoquées dans la conclusion.)

R2= Prélèvement de plusieurs organes par animal, regrouper donc les interventions chirurgicales.

R3= Respect du bien-être physique et social de l'animal : Nourriture spécifique, espace de jeu, administration d'analgésie, recours à l'anesthésie, détermination d'une limite au-delà de laquelle l'euthanasie s'impose.

(9)

Notons au sujet des animaux transgéniques que l'altération de leur phénotype peut modifier leur aptitude à souffrir et leurs besoins.

Parlons de cette souffrance...

c) La notion de souffrance de l'animal

L'utilisation des animaux au sens large semble aujourd'hui admise sous réserve de minimiser les souffrances de l'animal.

Certains expérimentateurs ne concèdent pas toujours que l'animal peut souffrir, indiquant qu'il faut pour cela une conscience de soi.(1)

Dans le cas du primate non humain, le répertoire émotionnel de celui-ci suscite un intérêt particulier pour le bien être animal.(1)

Dans le cas du porc, cet animal ne soulève pas de nouvelles et grandes objections pour son usage en xénotransplantation étant donné son usage important dans le domaine de l'alimentation humaine...(1)

Cependant, l'élevage des porcs doit se faire dans des conditions d'hygiène drastique, relativement inconfortables pour l'animal. (12)

« Tandis que le débat de savoir si l'animal doit bénéficier des mêmes droits que l'homme reste controversé, force est de constater que l'utilisation d'organes de primates non humains face à ceux d'un humain retardé ou encéphalopathe a relancé le débat ».(1)

Il y a une multitude de positions différentes face au rapport bénéfice humain/ souffrance et sacrifice animal. (1)

3) L'OPINION PUBLIQUE

Des enquêtes ont été réalisées au sein de la population... Pour ou contre ? La xénotransplantation est-elle acceptée dans les mentalités... ou la majorité rassemble-t-elle les septiques ?

Un débat de société va-t-il bientôt émerger ?

Au cours de l'année 2000, à l'aube du 21ème siècle, les réactions du public sont contrastées et varient en fonction des pays :(1)

Tableau 5 : Enquête auprès du public anglais et français en 2000 quant à l'acceptation de la xénotransplantation (1)

Royaume-Uni	Étudiants de 11-18ans	55 % favorables
Royaume-Uni, Londres	hôpital	40 % favorables
France	(enquête par téléphone)	44 % favorables

En Australie et aux USA, la proportion d'individus en faveur de la pratique de xénogreffe est variable.

En 2002, il est relaté que l'idée de recourir à l'utilisation d'organes animaux au nom de la survie humaine semble globalement bien acceptée d'après les enquêtes menées auprès du grand public. (18)

4) LES CONSIDERATIONS RELIGIEUSES ET PHILOSOPHIQUES

a) Les considérations religieuses

1. La place de l'animal par rapport à l'homme

La frontière entre l'homme et l'animal varie selon les religions :

D'une part, selon le Christianisme, le Judaïsme et l'Islam, Dieu a créé l'homme à son image, le reste de la création ayant alors une fonction d'asservissement à l'homme.

D'autre part, le regard porté sur l'animal au travers de l'Hindouisme et du Bouddhisme est très différent. Hommes et animaux sont hiérarchiquement ordonnés mais non séparés par une frontière aussi nette que chez les religions monothéistes.

La perception de la xénotransplantation est donc nettement influencée par la religion. (1)

2. La xénotransplantation et les interdits religieux

Qu'en est-il de l'usage du porc ?

Dans l'Islam et le Judaïsme, cet animal est considéré comme impur (pas casher). Le seul interdit concernant le porc est de le manger. Il n'y pas de mentions bibliques ni d'arguments théologiques interdisant son usage dans la xénotransplantation.

Cependant une minorité s'y oppose en raison de cet état d' «impureté». (1)

b) Les considérations philosophiques

Concluons les réflexions de ce chapitre sur l'éthique par deux dernières questions :

Que penser du rapport entre la non-résignation de l'homme face à sa propre mort et le droit des animaux à la vie? (9)

Jusqu'où l'être humain peut et doit rester maître de sa destinée en utilisant les ressources d'espèces qui pourraient servir à sa survie? (1)

E) LE NOUVEL OBSTACLE RENCONTRE : OBSTACLE HEMATOLOGIQUE

Ces dernières années, les scientifiques ont mis le doigt sur un problème supplémentaire rencontré lors des xénotransplantations : *La dérégulation de la coagulation*.

La réponse de la coagulation lors de la xénotransplantation diffère selon le type d'organe, les systèmes vasculaires étant distincts. La xéno greffe rénale est davantage susceptible de déclencher une coagulopathie de consommation qu'une xéno greffe cardiaque.(58) En effet, Knosalla (médecin allemand spécialiste du cœur et de l'immunologie) et son équipe ont rapporté qu'il y a une hétérogénéité évidente entre l'endothélium du rein et celui du cœur.(31)

Après un rappel synthétique du mécanisme de base de la coagulation, nous allons approcher les enjeux problématiques que représente le dysfonctionnement de la coagulation lors des xéno greffes.

1) RAPPEL DES MECANISMES DE LA COAGULATION

Quelques rappels ne sont en effet pas inutiles en matière de coagulation. Concentrons-nous ici sur les mécanismes d'initiation, de propagation et enfin de régulation de la coagulation.

a) Mécanisme d'initiation et de propagation de la coagulation

Une lésion de l'endothélium vasculaire va initier la coagulation. Le facteur déclenchant est le facteur tissulaire (TF).

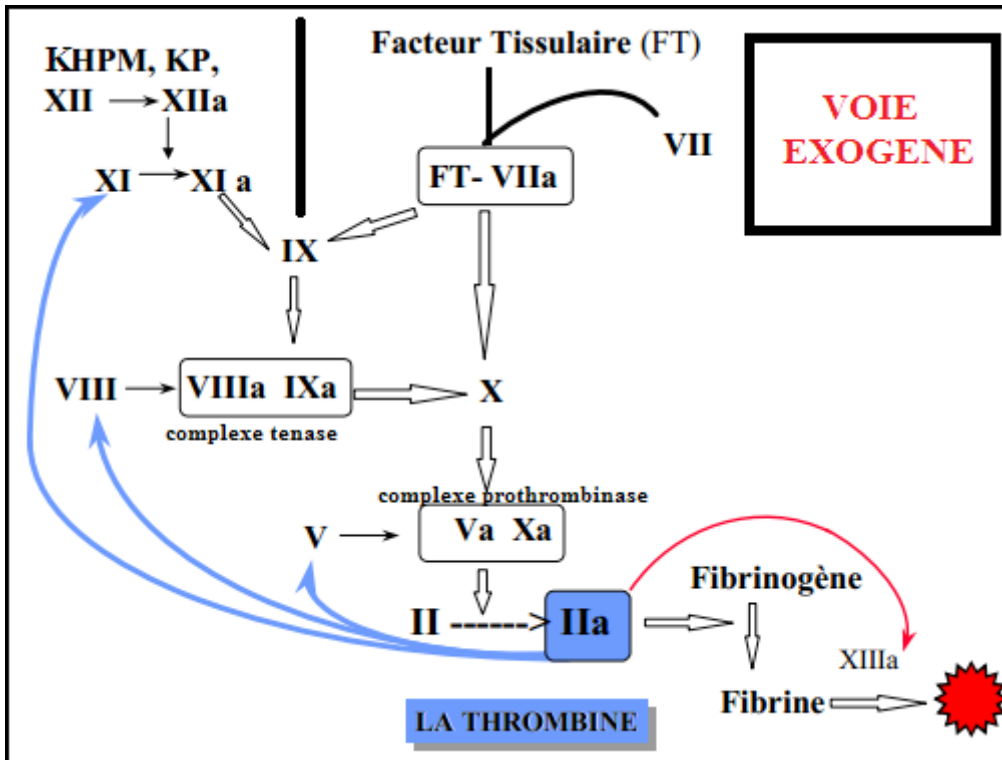
Dans le cas de la xéno greffe, l'activation endothéliale, suite à une lésion, engendre l'expression du facteur tissulaire, celui-ci activera le FVII et ce complexe activé sera à l'origine de l'initiation de la voie EXOGENE de l'activation de la coagulation.

La voie ENDOGENE est quant à elle stimulée par le contact avec une surface chargée négativement. Les facteurs à l'origine de son activation sont FXII, la prékallicréine (KP) et le Kininogène de Haut Poids Moléculaire (KHPM).

Il y aura par la suite formation du complexe tenase, puis du complexe prothrombinase qui, par cascade d'activation, entraîneront la production de thrombine, elle-même responsable de la transformation de fibrinogène en fibrine...à l'origine du caillot sanguin.

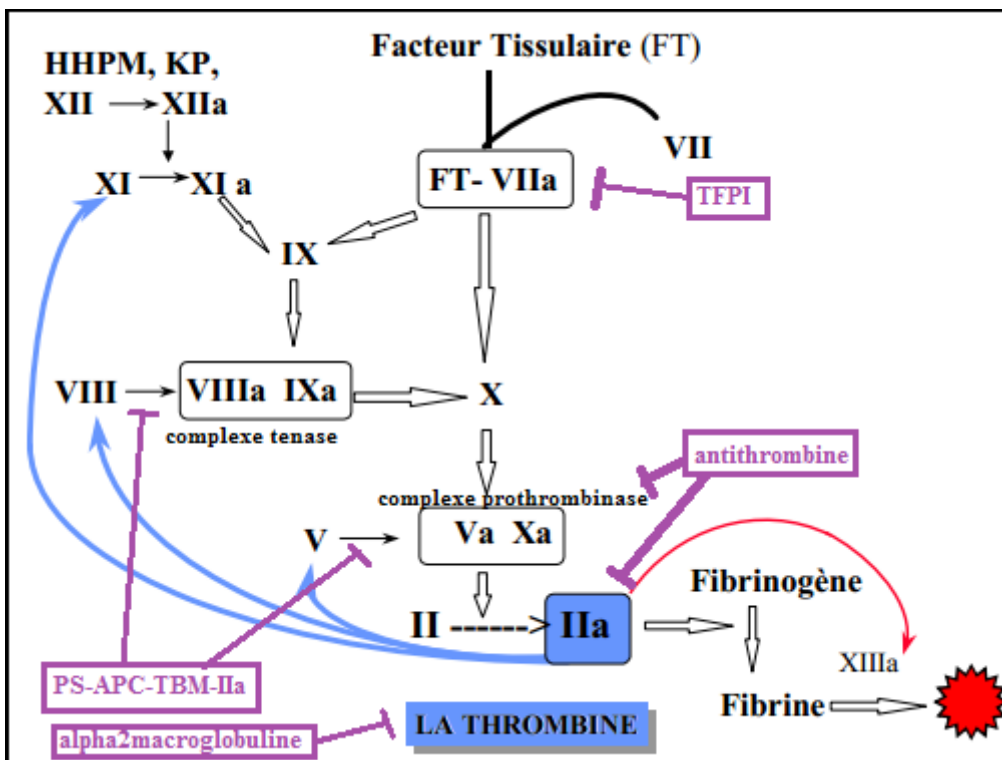
(6)

Schéma 12 : Mécanismes d'initiation et de propagation de la coagulation (64)



b) Voies de régulation de la coagulation

Schéma 13 : Les voies de régulation de la coagulation (64)



Quatre mécanismes de régulation sont observés sur le schéma 13:

1) L'inhibiteur du facteur tissulaire

Le mécanisme principal est le **TFPI α** (inhibiteur du facteur tissulaire)

On en distingue deux types : le TFPI α qui est circulant et le TFPI β qui est quant à lui membranaire.

Il possède deux domaines (de type kunitz) qui vont neutraliser le facteur Xa et le complexe TF-VIIa

Le TFPI α possède un troisième domaine qui va booster la protéine S pour inactiver Xa.

2) L'antithrombine III

L'**antithrombine** (ATIII) inhibe facteur Xa et la thrombine (IIa).

3) La voie de la protéine C activée

La **thrombomoduline** endothéliale (TBM) lie la thrombine et devient cofacteur de l'activation de la protéine C. La protéine C activée (APC), dont le cofacteur est la **protéine S** (PS), se charge d'inhiber les facteurs Va et VIIIa.

4) L' α 2Macroglobuline

Elle inhibe la thrombine.

(58)

2) LE PROBLEME DE DEREGULATION DE LA COAGULATION

a) Description de la microangiopathie thrombotique et de la coagulopathie de consommation

Le terme « dérégulation de la coagulation » englobe les troubles tels que la MAT et la CC :

- **La microangiopathie thrombotique (MAT)** est l'association d'une anémie hémolytique mécanique, d'une thrombopénie périphérique et d'une défaillance d'organes.

D'un point de vue biologique, on observe des schizocytes sur le frottis sanguin et le test de Coombs est négatif.

Il existe deux formes de MAT : le PTT (Purpura Thrombotique thrombocytopénique) et SHU (Syndrome hémolytique et urémique) (72)

Le PTT et le SHU sont responsables d'une occlusion thrombotique microvasculaire de divers organes, dont les reins. (73)

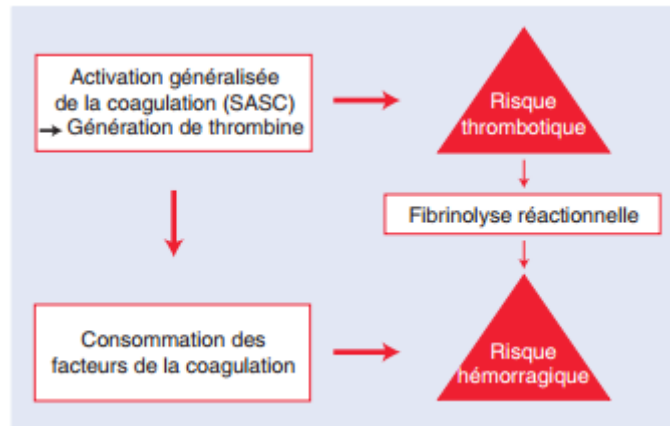
Les tests de coagulation, tels que le temps de prothrombine, les D-dimères et le fibrinogène, sont en général normaux dans les MAT. (73)

- Quant à **la coagulopathie de consommation (CC)**, il s'agit, suite à l'apparition de thrombose consécutive à l'activation de la coagulation, d'un syndrome dynamique au cours duquel la consommation des facteurs de coagulation n'est pas compensée par le foie (siège de la synthèse des facteurs 2,5,7 et fibrinogène) ou la moelle (lieu de la synthèse des plaquettes). Ce déséquilibre engendre un syndrome hémorragique, le sang étant devenu totalement

incoagulable. (65) (72)

Cet état de déséquilibre est illustré sur ce schéma :

Schéma 14 : Approche physiopathologique de la CC (74)



La traduction biologique de la CC est observée dans les deux tableaux qui suivent :

Tableau 10 : Bilan biologique de la CC (74)

<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> Dépistage } </div>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Témoins de la consommation excessive de plaquettes : - thrombopénie ■ Témoins de la consommation excessive de facteurs de la coagulation : - ↘ fibrinogène plasmatique (< 1 g) - ↗ tests de coagulation (TCA, TQ) - ↘ facteurs de la coagulation (FV, FVIII ...)
	<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> Confirmation } </div> <ul style="list-style-type: none"> ■ Témoins de la fibrinolyse : - ↗ PDF (produits de dégradation fibrinogène + fibrine) - ↗ Complexes solubles - ↗ D-dimères (produits de la dégradation de la fibrine)

Tableau 10bis : Bilan biologique de la CC (74)

Activation de la coagulation	F1+2 de la prothrombine ↑ Fibrinopeptide A ↑ Complexes thrombine-antithrombine ↑ D-dimères ↑
Activation de la fibrinolyse	D-dimères ↑ Facteurs de dégradation du fibrinogène ↑ Complexes plasmine-antiplasmine ↑
Consommation des inhibiteurs	Antithrombine ↓ Protéine C et/ou protéine S ↓ α2 antiplasmine ↓ Complexes plasmine-antiplasmine ↑
Défaillance d'organe	LDH ↑ Créatinine plasmatique ↑ pH ↓ PaO ₂ ↓

b) Mécanisme de la microangiopathie thrombotique et de la coagulopathie de consommation

Le dérèglement de la coagulation implique d'une part l'activation du greffon, qui peut être liée à l'AHXR, et d'autre part à des changements procoagulants circulatoires, non liés à la réponse immunitaire humorale.

En effet, sur l'endothélium porcin, les antigènes gal fixent les AC anti-gal en présence du complément. Tandis que les Ag non Gal se lient aux AC sans l'intervention du complément.

Cette fixation d'AC active les cellules endothéliales porcines, avec trois conséquences :

- 1) L'expression de facteur tissulaire qui engendre la synthèse de thrombine, entraînant ainsi l'activation plaquettaire.
- 2) Le ligand FvW se lie aux récepteurs plaquettaires et active ainsi les plaquettes.
- 3) La perte de l'expression de CD39 (catalyse de ADP en AMP) et de CD73.

Il est important de noter que ces trois voies d'activation des plaquettes par l'endothélium porcin se font indépendamment de la réponse immunitaire humorale.

En effet, le développement de la CC n'est pas corrélée à la sévérité de la réponse humorale .

De plus, l'examen histologique du greffon montre des caractéristiques minimales de blessure immunitaire observée lors de AHXR typique.

(54)

c) Causes de la dérégulation de la coagulation

Deux sources de problème sont d'une part des molécules incompatibles entre le porc et l'homme, et d'autre part la préexistence d'anticorps anti non gal.

1. Des incompatibilités moléculaires entre le porc et l'homme

- La thrombomoduline (TBM) porcine lie la thrombine humaine mais c'est un pauvre cofacteur de la protéine C activée humaine : 1 à 10 % d'efficacité d'activation par rapport à la TBM humaine. Ce qui engendre un cercle vicieux d'inflammation et de coagulation dans la xénotransplantation.

- Le Facteur von Willebrand du porc se lie de façon aberrante avec la glycoprotéine Ib de l'homme. Vont se former spontanément des agrégats de plaquettes humaines.

- Le TFPI (inhibiteur du facteur tissulaire) porcin n'inhibe pas efficacement le facteur Xa de l'homme.

(58)

2. Des anticorps préexistants anti non gal

Des échantillons humains ont un niveau élevé d'AC anti non gal (IgG) préexistants qui activent les cellules endothéliales aortiques porcines (PAEC), entraînant l'expression du facteur tissulaire indépendamment du complément. (54) In vitro, on observe que les AC anti non gal engendrent des changements procoagulants au niveau des cellules endothéliales porcines, même en l'absence de complément.

Il existe une grande variabilité inter-individuelle, le dépistage sera aussi important en

xénotransplantation qu'il ne l'est déjà en allotransplantation.
(58)

Après avoir soulevé les enjeux problématiques de la réussite de la xénogreffe, il est maintenant temps d'en étudier les solutions.

PARTIE 2 : LES SOLUTIONS

D) LES STRATEGIES

Cette partie va porter sur les quatre voies principales des stratégies mises en œuvre pour approcher la phase clinique de la xéno greffe de porc chez l'homme. La première voie sera axée sur l'immunologie et les expériences et hypothèses pour contrer le rejet du greffon. La seconde portera sur la sécurité sanitaire liée au risque viral que représente la xéno transplantation. La troisième s'intéressera aux réponses possibles en matière d'éthique et de réglementation. Enfin, le dernier chapitre de cette partie évoquera les solutions contre la dérégulation de la coagulation.

A) LES STRATEGIES ANTI-REJET

L'idéal est d'additionner plusieurs de ces méthodes préventives afin d'optimiser la lutte contre le rejet.

Il y a deux manières d'aborder le problème, d'une part, la modification du donneur, et d'autre part, la modification du receveur. D'où l'intérêt d'être libéré du caractère d'urgence rencontré en allogreffe.

Pour obtenir les informations qui vont suivre, les chercheurs ont effectué des expériences sur le **modèle porc à babouin**.

Malheureusement, de nombreux points sont encore au stade d'hypothèse. De nombreuses questions sont encore sans réponse.

1) MODIFIER LE DONNEUR

Voilà trente ans que la **transgénèse animale** a vu le jour... En 1982, R.D.Palmiter et R.L.Brinster et leurs collègues obtenaient des souris transgéniques exprimant le gène d'hormone de croissance de rat jusqu'à en devenir géantes.(55) La transgénèse animale représente le principal progrès en matière de xéno transplantation étant donné qu'elle permet de détourner le problème majeur du rejet hyperaigu. C'est donc une avancée très positive pour la xéno greffe.

Malheureusement, l'évolution dans ce domaine de recherche est lente à cause de la complexité des phénomènes biologiques et physiologiques, à cause du coût élevé que représentent les modifications génétiques, et enfin à cause de la difficulté de la mise en œuvre et des techniques de la transgénèse. De plus, les gènes candidats vraiment dignes d'intérêt scientifique ne sont pas fréquents. (32)

Dans ce chapitre sur la transgénèse animale, après l'avoir tout d'abord définie, nous nous pencherons sur les études qui précèdent son application. Ensuite nous aborderons les domaines dans lesquels elle peut être utilisée, ainsi que ses différentes méthodes.

a) La définition de la transgénèse animale

La transgénèse animale est née dans les années 1980. Elle a aujourd'hui plus de trente ans.

Comment définir la transgénèse ?

Elle consiste en l'ajout, le remplacement ou l'inactivation de gène cible au sein d'un génome. Ce gène comporte des séquences lui permettant son insertion et son expression au sein de la cellule hôte.

Il y a d'une part la transgénèse ADDITIVE qui consiste à additionner une séquence d'ADN exogène, dit transgène. Et d'autre part, la transgénèse CIBLEE qui se définit par la modification de séquences déjà présentes chez l'organisme hôte.

Ces modifications génétiques sont définitives. (32)

Un animal transgénétique peut se définir comme étant un animal porteur d'un gène étranger délibérément inséré dans son génome. (3)

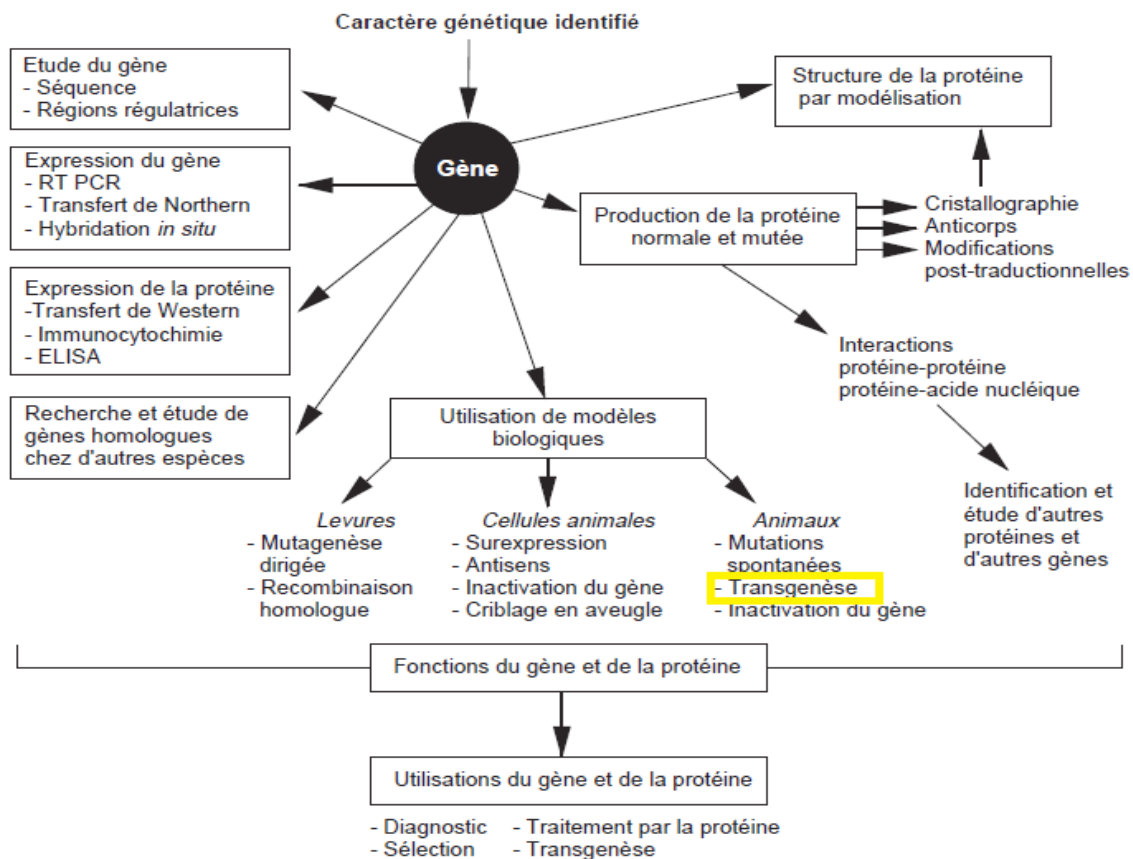
b) Les études préalables avant la transgénèse

La transgénèse entre dans le cadre d'une série d'étapes qui suivent l'identification d'un gène. (schéma 3).

En effet, avant d'utiliser un gène pour différentes applications, il faut avant tout étudier les effets de celui-ci.

Le schéma 3 illustre la position de la TRANSGENESE dans ce florilège de stratégies « post-gène », cette multitude d'études qu'engendre la découverte d'un nouveau gène :

Schéma 3 : Différents domaines d'étude après l'identification d'un gène (32)



Le but de la cartographie des génomes est de repérer et d'isoler des gènes intéressants et potentiellement transférables dans l'objectif d'améliorer génétiquement une population.

Pour cela, des marqueurs génétiques seront utilisés. On parle de micro-satellites. Ils donnent accès aux gènes responsables des effets souhaités.

Les études qui suivent sont indispensables pour justifier le recours pertinent à la transgénèse. Effectivement, la plupart des gènes exercent plusieurs fonctions dans l'organisme, elles-mêmes contrôlées par plusieurs autres gènes. Les gènes interagissent entre eux.

Tel transgène ne peut être utile que s'il est surexprimé dans tel tissu ou à tel moment de la vie d'un animal. Ou encore, le vecteur transféré peut contenir des gènes aux effets indésirables...Voilà pourquoi l'étude des effets d'un gène est une étape non facultative, même si c'est long et complexe. (32)

Les animaux transgéniques sont porteurs de transgènes qui sont exprimés dans tous les tissus. Dans certains cas, l'expression de ces transgènes dans certains tissus peut être source d'effets indésirables. Ainsi, chez la souris, et aujourd'hui aussi chez le porc, il est possible que le promoteur soit inductible, ou tissu-spécifique.(53)

Emettons une remarque : une alternative à la transgénèse est une sélection plus fine des animaux au sein d'une espèce pour établir des lignées améliorées. Par exemple, chez le porc, sélectionner les porcs porteurs du gène GH sera plus efficace que de recourir à la transgénèse de ce gène d'hormone de croissance. (32)

c) Les domaines d'application de la transgénèse animale

1. La transgénèse dans le cadre de la xénotransplantation

Dans le cadre de cette thèse, c'est l'application de la transgénèse du porc à la xénotransplantation qui nous intéresse :

Le porc transgénique obtenu comporte l'ADN codant pour la molécule d'intérêt. L'expression du transgène est stable, permanente et transmise à la descendance.

En croisant des lignées transgéniques, on produit des porcs multitransgéniques pouvant ainsi cumuler plusieurs avantages.

L'expérimentation animale réalisée jusqu'à présent a prouvé qu'une manipulation génétique peut évincer le rejet hyperaigu. (19)

Quelques exemples :

Trois idées intéressantes sont celle de supprimer la présence de l'épitope gal du porc, celle d'inhiber le complément humain, et celle d'induire une tolérance immunitaire.

a. La suppression de l'épitope Gal du porc

Quatre possibilités pour y parvenir sont :

→ La création de porc galKO (Knock-Out), c'est-à-dire de porcs dont les deux allèles de l'alpha1,3galactosyltransférase ont été invalidés. On parle d'invalidation génique de l'enzyme responsable de la glycosylation gal alpha1-3gal.

→ Une autre possibilité est d'augmenter l'expression de la H-transférase (la alpha1,2fucosylTransférase). Cette enzyme entre en concurrence avec la galactosylTransférase et réduit de 70% l'expression de Gal. Cela permettrait de transformer l'épitope Gal en substance H, non immunogène chez l'homme . (6)

→ Une alternative est la surexpression de la galactosidase, enzyme qui clive les résidus galactosylés terminaux des chaînes polysaccharidiques. (6)

→ Il serait aussi judicieux de choisir un gène qui coderait une enzyme qui remplacerait les antigènes Gal par des antigènes du groupe sanguin O de l'homme.(17)

b. L'inhibition du complément humain

David White (de l'université de Cambridge, ancien directeur de recherche de Imutran/Novartis en Angleterre, actuellement chercheur à l'université de western Ontario aux USA) a réalisé un travail concernant l'obtention de porcs transgéniques par l'introduction d'un gène humain dans un embryon de porc. Le résultat est l'observation de la présence sur la paroi interne des vaisseaux porcins de protéines qui inhibent le facteur D de la voie alterne du complément chez l'homme. (17)

L'enjeu est d'exprimer à la surface des cellules endothéliales du greffon porcine des protéines régulatrices du complément humain : hCD35, hCD46, hCD55, CD59 (31)

Ces protéines inhibent le complément autologue et sont spécifiques d'espèce. (61)

Les travaux de David White portent sur le développement d'une colonie de porcs transgéniques porteurs du gène humain DAF (Decay accelerating factor) et l'observation de la neutralisation du système du complément malgré la fixation des XNA sur Gal. (10)

Après la xénotransplantation d'un organe de porc GalT-KO, le complément est activé par la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Le système complément est un signe du AHXR. Plusieurs protéines régulent le complément à plusieurs niveaux de la cascade. Il est donc préférable d'exprimer plusieurs gènes des protéines régulatrices du complément humain plutôt qu'un seul.(31)

c. L'induction de tolérance

Le but est de préparer le greffon pour qu'il ne soit pas reconnu comme étranger.

Pour y parvenir, l'astuce est de provoquer l'expression de gènes protecteurs tels que les molécules bcl2, bcl-xl,A2O, HO-1 humains. Ceux-ci devraient fournir des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires. (31)

2. Autres domaines d'application de la transgénèse

Le schéma 4 cite plusieurs sphères dans lesquelles la transgénèse est également applicable :

a. Les études biomédicales

La transgénèse peut permettre des études fondamentales et l'obtention de modèles pour des **études médicales** et pharmaceutiques. (32)

b. La synthèse protéique

Elle rendra également possible la **production de protéines** (médicaments, protéines ayant un intérêt dans les domaines médical et vétérinaire, protéines recombinantes dans le lait animal, modification des composants naturels du lait,...) (32)

La sélection génétique trouvera un intérêt certain dans :

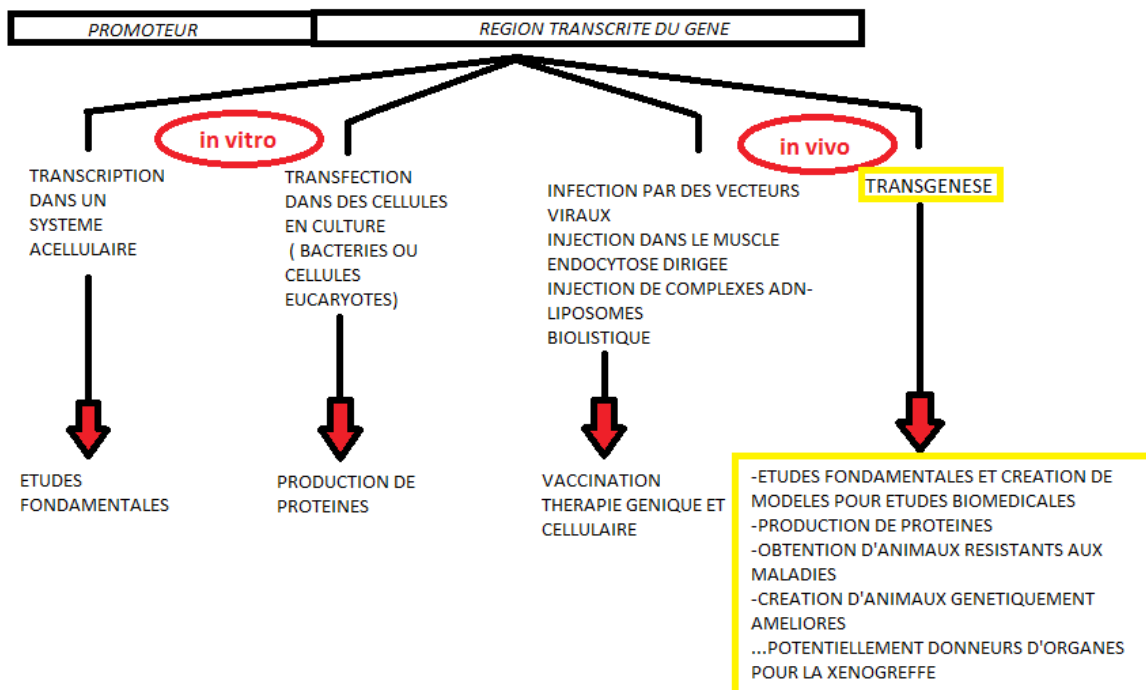
c. La lutte contre les maladies :

On a recours à l'obtention d'animaux résistants aux maladies par vaccination génétique, ou production de vaccins en modifiant les gènes de microorganismes pathogènes. (32)

d. L'agronomie

Il est question de l'amélioration qualitative et quantitative des produits animaux, de l'amélioration génétique de leurs performances **agronomiques**. (Par exemple, des porcs aux USA expriment le gène de facteur de croissance de l'insuline (IGF1) spécifiquement dans le muscle, grâce à ce même gène IGF1 des moutons néo-zélandais produisent 5 % supplémentaires de laine) (32)

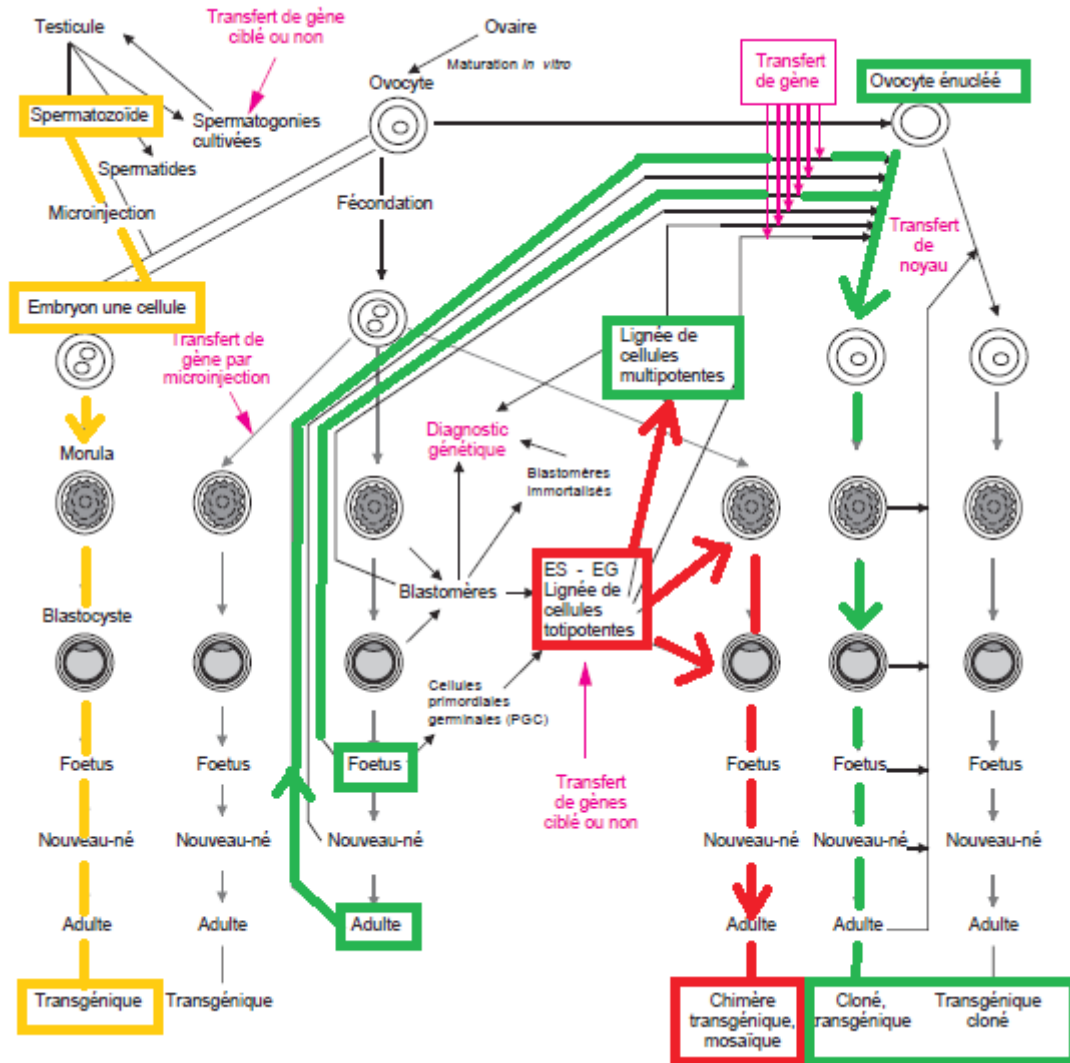
Schéma 4 : Les domaines d'application de la transgénèse (32)



d) Les différentes techniques actuelles de transgénèse animale

Le schéma 5 illustre globalement les différentes voies que peut prendre la mise en œuvre de la transgénèse animale.

Schéma 5 : Schéma récapitulatif des différentes techniques d'obtention d'un animal transgénique. (32)



Les principales étapes de la transgénèse animale sont les suivantes :

- 1) La modification du génome : transfert de gène par différentes techniques
- 2) La culture in vitro de l'embryon jusqu'au stade blastocyste, afin de réduire le nombre de mères porteuses, il est possible d'identifier et de sélectionner les blastocystes en culture.
- 3) Le placement du blastocyste dans l'utérus de femelles adoptives jusqu'au terme de la gestation.
- 4) La démonstration que le transgène a été incorporé, sélection de la progéniture qui exprime le transgène.
- 5) Le clonage afin de créer une lignée d'animaux transgéniques.

(53)

Notons que l'embryon est un passage obligé pour obtenir une lignée d'animaux transgéniques. Effectivement, seules les plantes sont capables de se régénérer à partir d'une cellule somatique uniquement. (55)

Dans mon travail, mon attention portera sur la première et la dernière étape de la transgénèse animale : le transfert de gène et le clonage.

Attardons-nous tout d'abord sur l'étape numéro 1, à savoir le TRANSFERT DE GENE.

1. LE TRANSFERT DE GENE

Il n'existe pas de méthode universelle pour le transfert de gène, chaque technique doit être adaptée à l'espèce en jeu. (55)

Plusieurs possibilités se présentent : La microinjection pronucléaire, le sperm mediated gene transfer, la transgénèse à médiation virale, le transfert nucléaire de cellules somatiques, le génie enzymatique et la transfection de cellules via des vecteurs de SiRNA. (53)

Nous aborderons pour ces six méthodes, le principe dans les grandes lignes, les avantages et inconvénients, quelques exemples d'application chez l'animal, et enfin d'éventuelles alternatives à la technique.

Par rapport au schéma 5, notons que la microinjection est possible dans les gamètes mâles, dans les embryons (dans les pronuclei des embryons au stade une cellule), dans des cellules embryonnaires ou adultes (dont le noyau sera transféré dans un ovocyte énucléé.

1) Microinjection pronucléaire :

a. Le principe

Il s'agit ici de la technique de Gordon (John W. Gordon, Docteur de l'université de Yale, USA, pionnier dans les transferts de gènes chez les mammifères (56)) élaborée en 1981 : le principe est la microinjection directe du gène dans le pronucleus mâle d'un embryon au stade une cellule.

Comme le montre le schéma 6, une solution d'ADN est injectée dans un œuf fécondé, à l'aide d'une micropipette sous contrôle microscopique, au niveau du pronucleus mâle. Le pronucleus mâle est un des deux noyaux fournis par les cellules sexuelles mâle et femelle juste avant la fusion. Rappelons qu'ensuite, on implantera cet embryon dans l'utérus d'une femelle mère porteuse. Il s'y développera jusqu'au terme de la gestation.

Les résultats obtenus ont les pourcentages suivants : 10 à 30% des descendants possèdent le transgène dans le génome de leurs gamètes.(55)

b. Inconvénient

Alors qu'en 1998 cette méthode était la plus utilisée, elle est aujourd'hui rarement utilisée car la mise en œuvre est délicate et coûteuse. (53)

c. Les applications

Voici quelques exemples d'application :

L'équipe du Docteur Rob Klose (chercheur du département biochimie de l'Université

d'Oxford (80)) l'a utilisée pour exprimer le $TNF\alpha$ chez des porcs.

Martin (de San Francisco) et ses collaborateurs s'en sont servi pour l'expression de la molécule inhibitrice de cellules T : CTLA4-Ig (53)

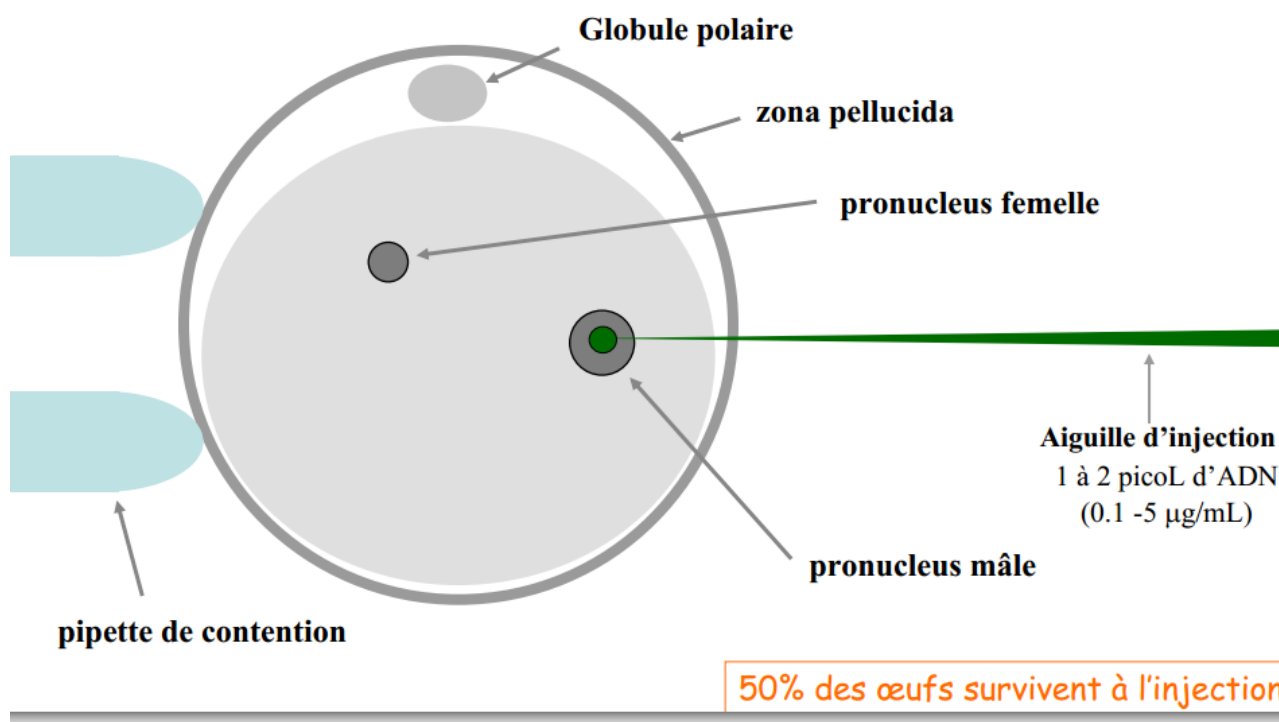
Les chercheurs ont pu observer une réussite chez le porc, mais également chez la souris, le lapin, le mouton, la chèvre, la vache, les oiseaux, les poissons et les invertébrés.

Une fois encore, les problèmes techniques sont espèce-dépendants. (55)

Le schéma suivant illustre cette méthode de microinjection :

Schéma 6 : Microinjection pronucléaire (57)

Récupération d'ovocytes fécondés, avant la fusion nucléaire → 0,5 jpc



2) sperm mediated gene transfer

a. Le principe

Pour l'addition de gènes, une autre idée est d'utiliser les gamètes comme véhicules de gène. On parle alors de SMGT : sperm mediated gene transfert.

La micro-injection d'ADN dans le cytoplasme des gamètes femelles, les ovocytes, est un échec. En revanche, les gamètes mâles, les spermatozoïdes sont capables de se lier et d'internaliser les molécules d'ADN exogènes.

Le matériel génétique va donc être introduit dans le sperme utilisé pour l'insémination. Pour cela, les spermatozoïdes vont être incubés dans une solution d'ADN. Après le succès d'incubation de gènes couplés à 3 protéines fluorescentes (verte, bleue et rouge) avec des spermatozoïdes, on procède à l'insémination pour l'obtention de porcs multitransgéniques. S'en suit la fécondation. L'embryon est ensuite mené à terme. (53)

b. Les avantages et inconvénients

- Les avantages de cette méthode sont un rendement élevé, un faible coût, une certaine facilité d'utilisation, et une absence de manipulation d'embryons. (53)

- Les inconvénients sont des possibilités d'insertion aléatoire, de réarrangement du transgène, et la controverse de l'expression du transgène à long terme, mutagenèse d'insertion. Il n'y a que chez le mouton que l'on n'observe pas de remaniement de transgènes. (53)

En effet des essais chez différents animaux (le porc... l'oursin, la souris, le rat, le lapin, la vache, la truie, la carpe, le poisson zèbre et le poulet) ont montré que le spermatozoïde n'est pas un véhicule idéal pour le transfert de gènes. Son ADN est fortement condensé et ne se réplique pas, donc le transgène ne peut pas s'intégrer. De plus, il est probablement doté d'un mécanisme de protection détruisant toute séquence d'ADN étranger.

c. Les alternatives

- Une alternative à cette méthode serait donc de recourir à des précurseurs de spermatozoïdes, les spermatocytes, pour véhiculer le transgène. On cultive les spermatogonies d'une souris, on transfère le gène (par transfection classique ou par recombinaison homologe). On les réimplante dans les testicules d'une autre souris et elles y achèvent leur maturation.

- Une seconde alternative est la transfection de cellules souches précurseurs de spermatozoïdes directement in situ dans le testicule (essai sur le porc et la souris). (55)

3) Transgénèse à médiation virale

Une troisième méthode s'offre à nous : celle de la transgénèse à médiation virale. Egalement appelée infection rétro-virale, transduction de cellules.

a. Le principe

Le principe est simple : Des vecteurs viraux contenant le transgène sont mis en contact avec de jeunes embryons.

Le procédé est le suivant :

Le transgène est cloné entre les séquences LTR (Long Terminal Repeat) d'un vecteur viral. Ensuite, le plasmide est transfecté dans une lignée cellulaire d'encapsidation exprimant la protéine rétrovirale. L'étape qui suit est la transcription du plasmide : l'ARN produit est encapsidé et le virus est sécrété dans le milieu. Après l'incubation du zygote avec le virus, la transcription réverse de l'ARN viral a lieu. L'ADN double brin obtenu va s'intégrer dans le génome. Enfin, comme pour les autres techniques, les zygotes infectés sont transférés dans l'utérus de mères porteuses. (57)

b. Avantages et inconvénients pour le lentivirus

- Il y a d'une part, le transfert de gène lentiviral : Des lentivirus infectent une culture de cellules somatiques.

L'avantage est une grande efficacité.(53) En revanche, il n'y a pas d'applications cliniques étant donné les risques tels que l'activation des oncogènes, la mutagenèse d'insertion et le silence des séquences lentivirus.(53)

c. L'alternative et ses applications

- D'autre part, un autre virus peut être utilisé : le AAV : virus adéno-associé.

Un exemple d'application : Le chercheur Rogers et son équipe ont obtenu, via la technique de AAV, un porc knock-out pour CFTR. (gène codant pour une protéine canal chlore sur épithélium).

Notons que cette technique d'utilisation de virus comme vecteur de transgène est idéale chez l'oiseau, chez lequel la microinjection est difficilement réalisable.

4) Transfert nucléaire de cellules somatiques

a. Le principe

Le principe de cette méthode comprend différentes étapes :

1/ La première étape

Elle consiste à prélever et maintenir en culture des blastomères, c'est-à-dire les cellules de la masse interne d'un embryon précoce, au stade blastocyste. Ces cellules peuvent être des cellules de carcinome embryonnaire (EC) , des cellules embryonnaires souches (ES) , des cellules primordiales germinales (PGC) ou enfin des cellules embryonnaires germinales (EG) elles-mêmes issues des PGC. Le point commun de toutes ces cellules est d'avoir gardé leur totipotence, c'est-à-dire leur capacité à pouvoir participer au développement d'un embryon au même stade et à générer tous types de cellules.

Afin de maintenir la totipotence, la culture doit être effectuée sur une monocouche de fibroblastes embryonnaires. (25)

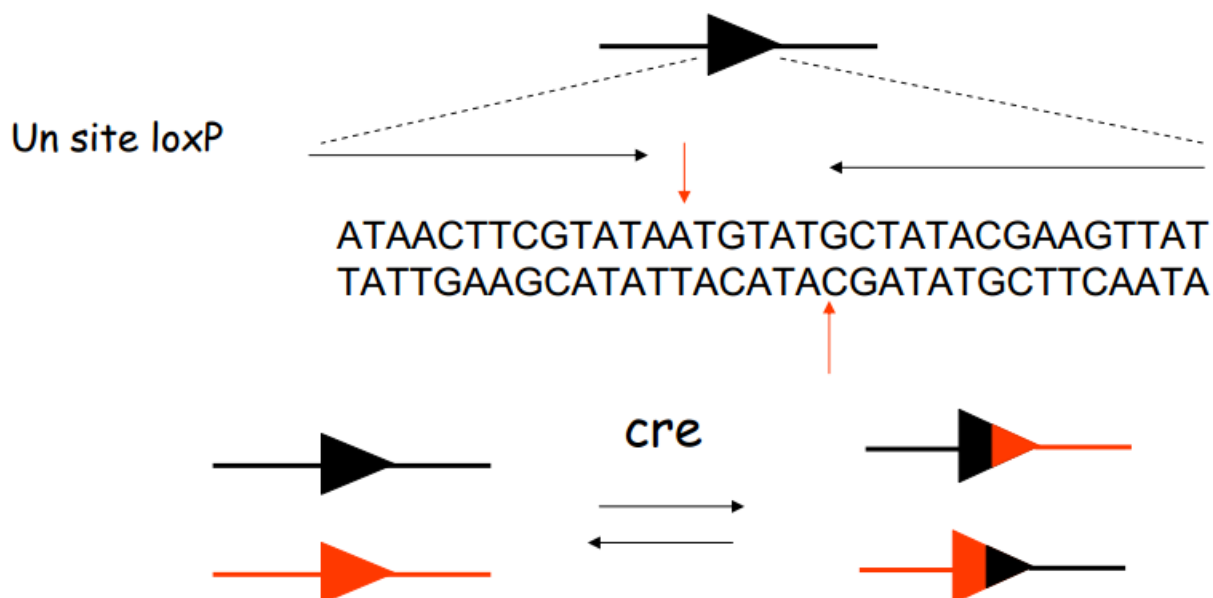
2/ La seconde étape

Elle comprend la modification du génome.

Il s'agit d'introduire délibérément un transgène dans une cellule, on parle de « transfection ». Cela implique l'ouverture de pores transitoires au travers de la membrane cellulaire. Cela est réalisé par divers moyens : l'électroporation, la méthode chimique de phosphate de calcium, la production de liposomes cationiques qui déchargeront leur contenu dans la cellule après fusion membranaire, etc..

Le remplacement de gène est réalisé par recombinaison homologue. Le terme adéquat est « système cre-lox ». Ainsi que le figure le schéma 7, l'ADN sera recombiné entre deux sites loxP. Les sites loxP sont des séquences spécifiques de 34 paires de bases, ce sont des sites reconnus par les recombinases. L'enzyme cre-recombinase (cre) reconnaît ces sites et les apparie. L'expression de cette enzyme peut être ubiquitaire, inductible (cre on-off) ou spécifique d'un tissu. La délivrance de la cre-recombinase se fait par injection in utéro, ou par vecteurs viraux, ou par croisement avec des lignées activatrices. Ces sites loxP sont issus d'un phage bactérien. La recombinaison homologue est un processus inné de réparation d'ADN cellulaire. On en déduit que la recombinaison homologue ne peut avoir lieu que dans des cellules en division. (25)

Schéma 7 : Recombinaison homologue (57)



Légende :

A, T, C et G représentent les nucléosides -désoxy - Adénosine, Thymidine, Cytidine et Guanosine.

Cre est l'enzyme cre-recombinase.

3/ La troisième étape

Enfin, la dernière étape se résume par la réinsertion des cellules au matériel génétique modifié dans un autre embryon précoce. Etant donné que cet autre embryon est ainsi colonisé par des cellules de deux types, l'animal obtenu sera mosaïque. Le transgène ne sera donc présent que dans une partie des cellules. Après introduction de cet embryon dans l'utérus d'une mère porteuse, il se développera jusqu'au terme de la gestation aboutissant ainsi à la naissance d'un animal chimérique. (25)

Il est important de préciser que pour que la mutation génétique se transmette à la descendance de l'animal, l'idéal est que les cellules modifiées et introduites participent à la formation des gamètes.

b. Les inconvénients

L'inconvénient principal de cette technique est la durée de vie limitée des cellules somatiques et un manque de technologie des cellules embryonnaires souches.

c. Les applications

Quant à l'application de cette méthode chez les animaux, SCNT fonctionne mieux chez le porc que chez d'autres grands animaux.(53) Elle est particulièrement réussie chez le porc miniature. En pratique, les scientifiques vont appliquer le transfert nucléaire chez l'embryon

de porcs miniatures et le transférer dans l'utérus de truies commerciales. Longtemps obtenues uniquement chez la souris, les ES et les EG ont récemment été obtenues chez le porc. Le remplacement précis de gène par recombinaison homologue est une opération de routine chez la souris depuis les années 1990. (25)

5) Génie enzymatique :

Cette méthode est basée sur l'existence de transposons, de petits gènes sauteurs, des segments d'ADN capables de se déplacer d'un ADN à un autre par l'action d'enzyme transposases.

6) Transfection de cellules via des vecteurs de SiRNA

Les siRNA sont de petits ARN interférents.

La dégradation des ARNm (par endonucléase) a pour conséquence une réduction de la traduction et donc une quantité de protéines traduites diminuée de 95% (= importante knock-down).

Cette approche est très pratique lorsque le gène cible a plusieurs copies dans l'ADN. C'est le cas du PERV. (53)

Enfin, après avoir étudié la première étape, celle du transfert de gène, penchons-nous sur la dernière étape de la transgénèse animale: le CLONAGE :

2) LE CLONAGE

Le clonage s'effectue par Transfert Nucléaire de Cellules Somatiques (point numéro 4 vu précédemment)

a. Le principe

Le principe est le suivant :

Les scientifiques transfèrent un gène dans le noyau de cellules somatiques. Ces cellules peuvent être embryonnaires, foetales ou adultes, en pratique, des fibroblastes foetaux.(25) Il s'agit de cellules multipotentes, c'est-à-dire de cellules embryonnaires partiellement différenciées suite à leur perte de totipotence après plusieurs semaines de culture.

Il est aussi possible d'utiliser de cellules multipotentes maintenues à l'état de quiescence en retirant le sérum de leur milieu de culture.

Il s'agira ensuite de transférer ce noyau dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé, un ovocyte dont on aura donc retiré au préalable le matériel génétique. Cette opération permet d'obtenir un œuf reconstitué avec un ADN choisi. L'étape suivante est de stimuler la division cellulaire en traitant l'embryon par des produits chimiques ou avec du courant électrique. On laisse quelques semaines pour la croissance en culture jusqu'au stade blastocyste, à ce stade a lieu la sélection des cellules dans lesquelles la modification génétique s'est produite. Les blastocystes sélectionnés sont placés dans l'utérus hôte de femelles adoptives et se développent jusqu'au terme de la grossesse. Ainsi est obtenu l'animal cloné. (32)

b. Le point négatif

L'inconvénient majeur réside dans la capacité des cellules à engendrer des clones après seulement plusieurs semaines de culture, le temps nécessaire pour sélectionner les cellules dans lesquelles a eu lieu la modification génétique. (25)

c. L'application

Cette technique de clonage a été appliquée avec succès chez le porc (mais également chez le lapin, le mouton et divers ruminants domestiques.)

En 1996, a eu lieu le premier clonage de mammifère à partir d'une cellule spécialisée : la brebis Dolly. (78)

Intéressons-nous à présent à la seconde façon d'aborder les stratégies anti-rejet : la modification du receveur :

2) MODIFIER LE RECEVEUR

Plusieurs idées ont été expérimentées, débouchant sur des résultats globalement satisfaisants . De nombreux chercheurs se sont penchés sur plusieurs manières de préparer l'homme à la xénogreffe : différents protocoles d'immunosuppression, la splénectomie, différentes techniques pour inactiver le complément du receveur, l'élimination des XNA, et enfin l'induction d'une immuno-tolérance...

a) L'immunosuppression

1. Tableau des immunosuppresseurs

Je vous renvoie à l'Annexe 1 : Y figure la liste des différents médicaments, avec leur DCI, leur mécanisme d'action et la classe médicamenteuse à laquelle ils appartiennent.

2. Les phases de l'immunothérapie

On distingue la phase d'induction de celle de maintien :

- L'induction est l'injection de fortes doses d'IS pendant l'intervention et quelques jours après. C'est contre le rejet aigu.
 - Le maintien est l'inhibition du SI ciblée et durable, dans le but de contrer le rejet chronique.
- (19)

3. Les effets indésirables

Les effets indésirables majeurs des IS peuvent être directs ou indirects :

- Les effets directs sont les infections et les cancers (de la peau et des leucémies majoritairement).
- Ceux indirects désignent une augmentation des risques d'hypertension artérielle, d'insuffisance rénale, de diabète et d'ostéoporose. (19)

La recherche vise à élaborer des immunosuppresseurs à action spécifique, inhibant uniquement les réactions de rejet, afin d'éviter les infections bactériennes et les mycoses conséquentes aux immunosuppresseurs. Différents anticorps ont été développés et testés cliniquement. Leur efficacité a été prouvée en ce qui concerne le rejet aigu, mais pas encore le rejet chronique.(19)

4. La recherche

Plusieurs travaux expérimentaux ont été réalisés dans le but d'optimiser les protocoles d'immunosuppression.

Voyons quelques travaux expérimentaux réalisés à leur sujet et les conclusions qui en ont été extraites : (33)

Expérience 1 :

En 2004, des études comparatives ont été effectuées sur des modèles porcs-à-babouins, avec quatre protocoles d'immunosuppression :

Tableau 6 : Etude expérimentale de la survie du greffon selon 4 protocoles (33) d'immunosuppression

<u>groupe</u>	<u>Nombre de babouins</u>	<u>Immunosuppresseurs utilisés</u>	<u>Durée moyenne de la survie de la greffe</u>
Groupe A	n=10	GAS 914+ cyclophosphamide+ ciclosporine+ mofétil+ corticoïdes	7jours
Groupe B	n=3	GAS 914+ cyclophosphamide+ ciclosporine+ FTY 720+ stéroïdes	8jours
Groupe C	n=3	GAS 914+ basiliximab+ ciclosporine+ mofétil+ corticoïdes	8jours
Groupe D	n=4	GAS 914+ basiliximab+ FTY 720+ everolimus+ stéroïdes	9jours

Légende :

GAS 914 est une polylysine contenant des épitopes alphaGal, dans le but de piéger les anticorps anti-gal.

FTY 720 (Fingolimod) est un modulateur du récepteur de la sphingosine monophosphate. Il favorise la rétention lymphocytaire dans le thymus et les ganglions lymphatiques.

Basiliximab, ciclosporine et corticoïdes : voir l'Annexe 1.

Conclusion 1 :

On peut conclure de ces travaux que :

- Les durées de survie des xéno greffes ne dépendent pas significativement du protocole d'immunosuppression.
- L'échec de ces greffes est dû à un rejet humoral aigu qui n'a pas été surmonté par les immunosuppresseurs utilisés.

- Il est donc nécessaire de développer de nouveaux protocoles d'immunosuppression.

Expérience 2 :

Les nouveaux **Immunosuppresseurs** étudiés ici sont antiCD3RIT (immunotoxine recombinante) et LoCD2.

En 2012, deux traitements d'induction ont été comparés : D'une part les anticorps monoclonaux anti CD3 et d'autre part les anticorps monoclonaux anti CD2.(38)

→ antiCD3-RIT : Cette immunotoxine recombinante est composée par le couplage du site de fixation d'une toxine diphtérique à l'anti-CD3 de singe. Elle induit une profonde déplétion des LcT. → LoCD2 est un AC monoclonal de rat anti CD2 humain. CD2 est un récepteur présent sur tous les LcT et sur la plupart des NK. CD2 joue un rôle dans l'activation des LcT. Ainsi, LoCD2 entraîne une déplétion lymphocytaire T par ADCC et inhibe l'activation lymphocytaire T par modulation de la molécule CD2. (62)

Tableau 7 : Comparaison expérimentale de deux traitements d'induction (38)

<u>Nombre de babouins</u>	<u>IS</u>	<u>Fonction rénale</u> (<u>histologie</u> et <u>créatinine sérique</u>)	<u>Déplétion des LcT</u> (<u>par cytométrie de flux</u>)
N = 4	antiCD3-RIT	Greffe fonctionnelle (mort par pneumonie ou Insuffisance cardiaque)	150-250 cellules T /microlitre
N = 2	LoCD2-TK AC anti CD2 humain	Rejet de la greffe après deux semaines	>300 cellules T /microlitre

Conclusion 2 :

On conclut que le premier est beaucoup plus efficace que le second. Les résultats de l'anti-CD3 RIT de cette étude sont plutôt encourageants. Cependant, cette innovation comprend des effets indésirables tels qu'une élévation des transaminases et l'incidence d'infections-post-induction. Une enquête plus approfondie est donc nécessaire. Actuellement, on cherche à augmenter la demi-vie in vitro dans le but de minimiser les effets secondaires et d'optimiser la déplétion des cellules T.

Il reste aussi à étudier la posologie optimale, la durée de traitement ainsi que la bioactivité. (38)

Notons aussi l'utilisation d'un nouvel anticorps antilymphocytaire monoclonal dirigé contre le CD40L ou le CD154 présent sur le LcT. (10)

b) La splénectomie

Le terme splénectomie se réfère à l'ablation chirurgicale de la rate.

La rate fait partie intégrante du système immunitaire : c'est un organe lymphoïde secondaire, comme le sont également les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses tels que les plaques de Peyer.

Elle est constituée de la pulpe rouge, indispensable dans la régulation de la formation et de la

destruction des globules rouges, et de la pulpe blanche, lieu de rencontre entre les antigènes et les lymphocytes matures mais encore naïfs. Elle joue donc un rôle primordial dans l'immunité adaptative. La gaine lymphoïde péri-artérielle est riche en LcT, tandis que les corpuscules de malpighi amassent essentiellement des LcB.

(75)

La rate n'étant pas indispensable à la vie, on peut donc la soustraire... Mais la splénectomie expose à des risques d'infection plus importants car la rate joue un rôle dans l'épuration sanguine des germes, particulièrement les pneumocoques et méningocoques... Il est donc recommandé de se vacciner et de subir une antibiothérapie préventive prolongée. (79)

c) L'élimination des xénoanticorps

Plusieurs moyens sont disponibles pour réduire le taux d'anticorps naturels xénoréactifs dans le sang du receveur : La plasmaphérèse, l'immuno-aphérèse, l'immuno-adsorption, l'administration d'antigènes solubles ou enfin l'administration d'anticorps anti-immunoglobuline M.

1. La plasmaphérèse (15)

Appelée aussi « échange plasmatique », la plasmaphérèse consiste à séparer le plasma des cellules du patient par filtration ou centrifugation. Les cellules sont réinjectées, et le plasma ainsi retiré est remplacé par une perfusion d'albumine humaine ou de plasma frais congelé. (80)

Aujourd'hui, cette technique a été abandonnée car elle élimine toutes les protéines, notamment les facteurs de la coagulation, ce qui engendrait des complications chirurgicales. (6)

2. L'immuno-aphérèse

Cette méthode, plus fiable, consiste en l'utilisation de colonnes d'affinité anti-Ig. Les Ig G et/ou M sont ainsi éliminées, entraînant des risques infectieux. (6)

3. L'immuno-adsorption (15)

L'immuno-adsorption extracorporelle fait intervenir une colonne contenant une protéine A hautement purifiée, isolée du staphylocoque doré, liée à une matrice de silice. Le plasma rentrera en contact avec cette colonne et les complexes immuns présents dans le plasma du patient seront fixés par cette protéine A, les anticorps sont ainsi éliminés du plasma qui sera ensuite retransfusé au malade. (67)

4. L'administration d'antigènes solubles

Les antigènes seront administrés sous la forme d'oligosaccharides synthétiques (polymères gal). (15)

L'injection intraveineuse de l'antigène Gal soluble nécessite cependant des quantités très importantes de sucres synthétiques, dont la disponibilité fait défaut.

Une alternative est alors l'utilisation de protéines de porc purifiées, de peptides mimétiques. (6)

5. L'administration d'anticorps anti Immunoglobine M

Malgré ces cinq idées ingénieuses, deux problèmes persistent :

- Premièrement, la production de ces XNA est telle que leur taux revient à la normale en seulement quelques jours suivant leur élimination. Cette déplétion n'est donc que temporaire, un rebond étant observé après seulement quelques jours.
- Deuxièmement, nous sommes confrontés également à la réponse immune secondaire correspondant à la production de nouveaux AC **non**-Gal, dirigés contre des protéines situées à la surface des cellules porcines. Supprimer les AC anti-Gal est donc malheureusement insuffisant.

(6)

L'addition des trois méthodes que nous venons de citer va nous conduire au terme « accomodation ». Cet état, que je définirai, peut être rencontré en allotransplantation mais aussi en xénotransplantation.

L'ACCOMODATION

En allogreffe

En Allotransplantation, selon les travaux de Guy Alexandre (Chirurgien de l'université catholique de Louvain, spécialisé dans les transplantations rénales), « préparer » le receveur consiste en :

- Les IS
- L'ablation de la rate
- L'élimination des AC naturels anti-ABO

(17)

Suite à cette « préparation » et à la greffe, le taux d'AC naturels anti-ABO revient à un seuil élevé mais il n'y a pas de fixation de ces AC sur les antigènes étrangers du greffon. On parle alors d'ACCOMMODATION.

Cet état d'accommodation a été observé dans le cadre d'allogreffe de rein ABO-incompatible : L'élimination des AC anti-donneur pouvait amener au maintien de la greffe, même après le retour des AC par la suite. L'origine de ce concept serait une modification des AC, des Ag ou des propriétés de l'endothélium. (6)

En xénotgreffe

Fritz Bach est à l'origine du terme « accommodation ». Ce phénomène est le suivant :

Suite à une élimination des AC réactifs et à un traitement anti-rejet, le taux d'AC va doucement réaugmenter. Pour une raison inexpliquée, les antigènes présents sur l'endothélium du greffon ne vont pas entraîner de réaction de rejet, malgré un taux d'AC et un taux de complément tout à fait normaux. Le phénomène d'accommodation s'explique par l'hypothèse que le greffon se défend lui-même contre le rejet, notamment en surexprimant des gènes protecteurs anti-apoptotiques tels que bcl2, bcl-xl, A20, HO1(hème oxygénase 1) qui vont inhiber la réaction inflammatoire liée à l'activation endothéliale et qui vont inhiber le phénomène d'apoptose. (18) Les mécanismes mis en jeu sont encore flous. (15)

Les travaux de Anthony Dorling (Médecin londonien, spécialiste en Néphrologie et maître de conférence en Immunologie (81)) ont aussi émis l'hypothèse selon laquelle le greffon est capable de survivre malgré la présence des anticorps et du complément. Cette protection

serait due aux Ig G xénoréactives. (18)

La stabilité de ce phénomène a déjà été observée sur plus d'une dizaine d'années en allotransplantation.

Malheureusement, cet état a rarement été rencontré en xénotransplantation.

d) L'inactivation des protéines du complément

L'objectif est d'inactiver ou d'éliminer temporairement les protéines du complément.

Via des études expérimentales, on a pu observer qu'un organe porcine greffé lorsque le SI humain est déprimé peut s'adapter et être TOLERE lorsque les AC et les protéines du complément sont à nouveau à une concentration normale. Le greffon fonctionne alors en dépit du SI. (17)

Une méthode consistait à administrer au **receveur** des inhibiteurs du complément :

L'interruption de la cascade du complément s'obtient par l'administration de venin de cobra (il épuise C3), un inhibiteur de C1, des AC anti-C5... L'inconvénient est que cela prive l'individu d'un complément fonctionnel, et de plus, le venin de cobra est toxique.

L'autre idée, meilleure de surcroît, est de préparer le **donneur** afin qu'il exprime lui-même des protéines régulatrices du complément humain telles que CD46, CD55, CD59,... Pour cela, je vous renvoie au chapitre traitant de la régulation du complément.

e) L'induction de l'immunotolérance

L'arrivée des porcs transgéniques galT-KO a permis de surmonter le problème du rejet hyperaigu. Cependant, dans les modèles de transplantation porc-à-primate non humain, on observe des réponses de lymphocytes T anti-donneur. Ces réponses sont plus sévères que celles allogéniques.

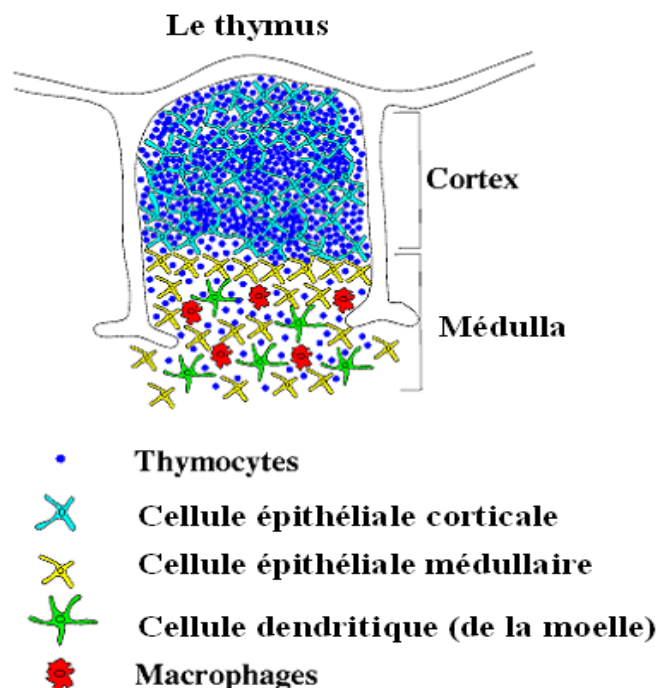
Les niveaux élevés d'immunosuppresseurs étant mortels, les spécialistes se penchent sur une nouvelle méthode : l'induction de l'immunotolérance xénogénique, dite « xénotolérance ». Cette tentative consiste à engendrer une reconnaissance spécifique du greffon comme du SOI. Le but est de développer la tolérance des lymphocytes T.

Mais avant de développer davantage cette idée, il est bon de procéder en premier lieu à quelques rappels concernant les bases du développement de la tolérance immunitaire :

1. Rappels de la tolérance immunitaire

La propriété fondamentale du système immunitaire est de reconnaître le soi et le non-soi.

Le thymus, représenté grossièrement sur le schéma 8, est le siège du développement des cellules T.



a) Maturation des progéniteurs lymphoïdes

Les lymphoïdes de la lignée des cellules souches CFU-L, issus du foie et ensuite de la moelle osseuse, vont acquérir progressivement des récepteurs de surface. Comme l'évoque le schéma 10, plus bas, le thymocyte double négatif deviendra double positif suite à l'acquisition des récepteurs CD4 ET CD8.

Ils vont ensuite subir une sélection drastique. 95% des thymocytes échouent aux épreuves de sélection (positive et négative) et mourront par apoptose dans le thymus avant d'atteindre la maturité. (51) (52)

b) La sélection positive

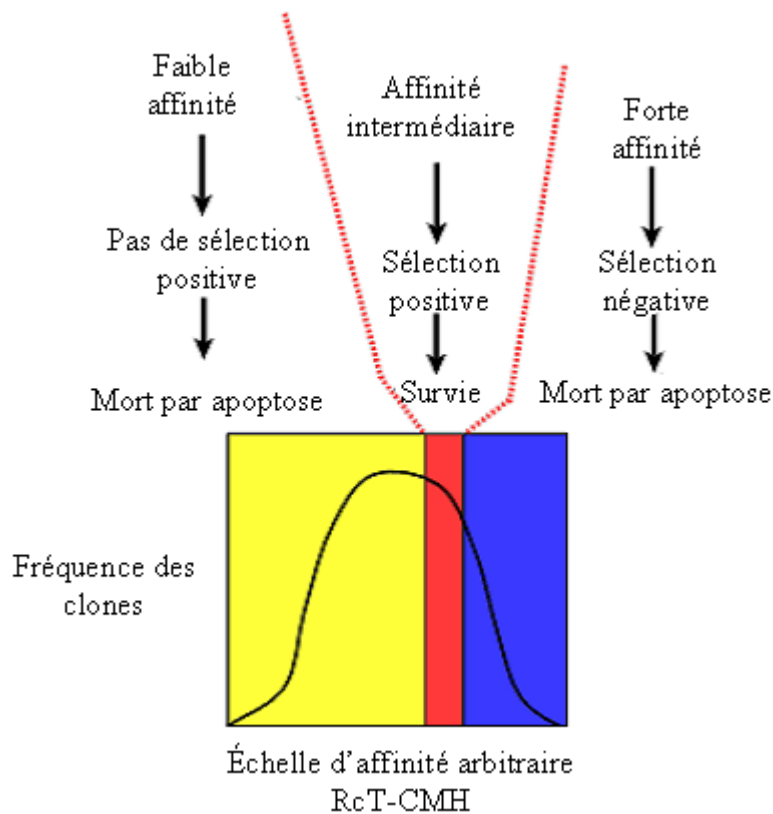
Tout d'abord, la SELECTION POSITIVE. Elle a lieu au niveau des cellules épithéliales du cortex. Les cellules T dont les récepteurs se lient peu fortement au CMH seront sélectionnées positivement. Celles dont le récepteur T se lie trop fort ou pas du tout seront éliminées par apoptose. A ce stade, les cellules expriment le CD4 et le CD8. (51) (52)

c) La sélection négative

Ensuite, au niveau de la médulla, à la surface des cellules dendritiques et des macrophages, aura lieu la SELECTION NEGATIVE. Les cellules T réagissant fortement avec les CMH présentant un peptide du Soi meurent. Il y a d'une part les lymphocytes T CD4+, auxiliaires, et d'autre part les lymphocytes T CD8+, cytotoxiques. Il s'agit maintenant de cellules immunocompétentes. (51) (52)

Tel que le représente le schéma 9, les deux types de sélection dépendent du degré d'affinité et de la force de liaison entre le récepteur du LcT et le Complexe majeur d'Histocompatibilité :

Schéma 9 : Fréquence des clones lymphocytaires en fonction de leur affinité pour le CMH (52)



d) La migration en périphérie

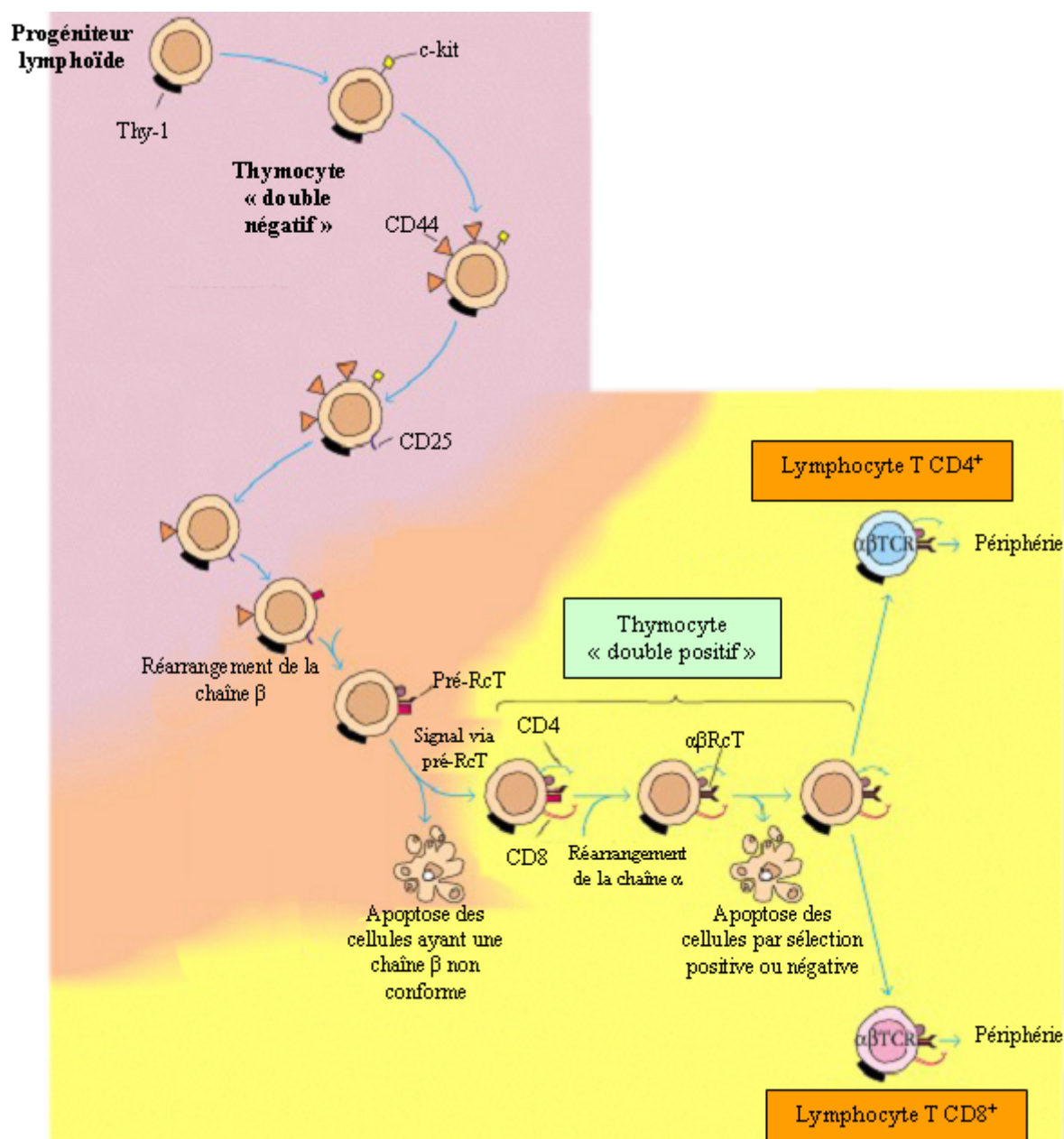
Ces lymphocytes matures, mais encore naïfs, vont migrer alors vers les organes lymphoïdes secondaires en périphérie tel que le suggère le schéma 10. C'est en périphérie qu'ils exerceront leur rôle dans l'immunité à médiation cellulaire. Les organes lymphoïdes secondaires regroupent la rate, les ganglions lymphatiques, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses tels que les plaques de Peyer.

Suite à une éventuelle présentation d'antigène par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), le LcT CD4⁺ se spécialisera soit en Lc CD4⁺Th1 qui aide les LcTCD8, les NK et les macrophages, soit en Lc TCD4⁺Th2 qui aide les LcB.

(51) (52)

Le schéma 10 illustre l'évolution de la maturation des précurseurs des lymphocytes T jusqu'à leur différenciation en cellule T CD8⁺ ou T CD4⁺ :

Schéma 10 : Les étapes de la maturation d'un lymphocyte (52)



e) La reconnaissance de l'antigène

Alors que les lymphocytes B et les anticorps reconnaissent directement l'antigène sous sa forme native, une cellule présentatrice d'antigène va présenter l'antigène au lymphocyte T. L'interaction entre les deux cellules va se faire via des molécules de stimulation et des molécules d'adhérence. (Je vous renvoie au schéma 11 page 36)

2. La définition et les caractéristiques de l'immunotolérance:

La méthode consiste à préparer le greffon ou le système immunitaire du receveur afin que le greffon ne soit plus considéré comme un corps étranger. (19) On entend par le terme « immunotolérance » une tolérance immunitaire induite chez le receveur suite à l'obtention d'un système immunitaire hybride.

C'est David Sachs (Professeur de Harvard Medical school de Boston) qui est à l'origine de ce concept. Il a réalisé de nombreux travaux basés sur cette idée. (10)

a. Les greffes concordantes :

Dans le cas des greffes concordantes, l'induction de tolérance est obtenue par la *greffe de cellules souches de la moelle osseuse* du donneur. Le principe est le suivant : Des cellules souches du donneur sont introduites par injection dans la moelle osseuse du receveur. Ainsi deux types de cellules vont coexister. Cette situation va aboutir à un état d'équilibre entre les deux populations : la tolérance est réciproque. (10) Par le processus de l'hématopoïèse, des cellules de toutes lignées hématopoïétiques vont naître, notamment des cellules progénitrices lymphoïdes. Les progéniteurs des lymphocytes T vont se déplacer vers le thymus, siège de la sélection négative. Ainsi les lymphocytes T réactifs ayant reconnu le « soi » y subiront l'apoptose. L'idée de génie repose sur le fait que les cellules de l'animal ne seront pas reconnues par l'homme comme étrangères. Cette technique est appelée « chimérisme hématopoïétique ». (6)

Cependant, des complications sont observées, telles que des troubles thrombotiques et infectieux. (8)

Des expériences ont été effectuées sur des souris : Des souris Gal⁻ (knock-out) sont greffées avec de la moelle osseuse de souris Gal⁺. Suite à cette opération, les souris GalKO ne développent plus d'anticorps anti gal. (23)

b. Les greffes discordantes :

Les greffes discordantes désignent le modèle porc-à-homme, ou porc-à-babouin, c'est ce type de greffe qui nous intéresse dans notre thèse. Dans ce cas, l'état de tolérance spécifique va être induite chez le receveur par la *greffe de « thymokidney »*, terme anglais désignant un mélange thymus-rein.

3. Le protocole de greffe de thymus-rein

Cette stratégie innovante est sujette à de nombreuses études expérimentales depuis dix ans.

L'astuce est de co-transplanter un rein avec un tissu thymique vascularisé. Soit on transfère un lobe thymique vascularisé isolé (implants omentales) (48), soit on prépare en plus un tissu composite « thymus-rein » (implantation autologue chez le donneur de tissu thymique sous capsule rénale). (47)

D'une part, le porc transgénique sera GalT-KO et exprimera hDAF (pour diminuer l'activation du complément) (47)

D'autre part, le babouin receveur subira, avant la transplantation, une thymectomie, l'épuisement des cellules T, une splénectomie, l'immunoabsorption extracorporelle des XNA et l'administration d'immunosuppresseurs. (47) (48)

Notons également que plusieurs travaux mentionnent aussi l'idée de procéder à une irradiation corporelle du babouin avant la xéno greffe. (17)

4. Les essais et résultats :

On a déjà signalé la réussite de l'induction de tolérance dans le modèle allogénique chez des porcs miniatures, ainsi que dans le modèle xénogénique discordant porc-à-rongeur... Depuis 2003, les chercheurs travaillent sur le modèle porc-à-babouin.

Voici les records de durée de survie obtenus :

- En 2003 : survie des animaux jusqu'à 30 jours (47)
- En 2009 : survie des animaux jusqu'à >50 jours (46)
- En 2012 : survie des animaux jusqu'à >80 jours (40) (56)

Lorsqu'il est couplé avec d'autres stratégies anti-rejet, la transplantation de lobe thymique vascularisé peut prolonger la survie de la xéno greffe. (48)

5. Quelques observations :

Ces commentaires portent sur l'étude des indicateurs de rejet, de la reconstitution des lymphocytes et des réponses lymphocytaires, ainsi que du taux des XNA :

- Un début de thymopoïèse dans le tissu thymique porcine est observé chez le babouin, avec synthèse de thymocytes immatures. (46)
- On ne note pas de signes pathologiques de rejet : pas de signes d'infiltration cellulaire, ni de dépôts d'IgG(46), le niveau de créatinine est normal ou très légèrement augmenté. (40)
- Après l'arrêt des immunosuppresseurs, il y aura le retour des lymphocytes T normaux, mais avec absence de réponse cellulaire spécifique du donneur dans les tests MLR (réponses lymphocytaires mixtes). (48)
- Le taux des AC anti Gal reste stable. (47)
- On conserve des alloréponses normales. (47)
- Alors que l'on observe un AHXR et ACXR chez les babouins n'ayant pas bénéficié de la greffe de thymus : Les signes sont une infiltration cellulaire, des dépôts d'IgG, une MAT, la mort des cellules endothéliales, une hémorragie interstitielle focale, une activation procoagulante, l'augmentation des Facteur tissulaire et Facteur von Willebrand,...

6. La conclusion :

La présence de l'épithélium thymique viable du donneur permet de développer chez le receveur une tolérance des cellules T spécifiques du donneur. Cette piste est très encourageante.

B) LES IDEES CONTRE LE RISQUE VIRAL

Le risque zéro ne pouvant pas être garanti(14), les chercheurs cherchent le protocole de prophylaxie idéale pour éviter les transmissions virales lors d'une xéno greffe du porc à l'homme .

L'EFG (Etablissement Français des Greffes) a mis en place un comité d'experts chargé de préparer des recommandations. La loi du 12/07/1998 encadre l'utilisation des xéno greffes. (1)

La première voie consiste à préparer le donneur, la seconde voie comprend les solutions de prévention applicables au receveur.

1) La préparation du donneur

Commençons par l'animal **donneur**. L'approvisionnement de greffons propres est la clef d'une bonne prophylaxie. (14)

- La base est d'utiliser le porc comme donneur à la place du singe, le primate étant plus apte à transmettre des maladies à l'homme.

- Le dépistage obligatoire de l'animal donneur est une seconde idée. Il porte sur la tuberculose, les principales zoonoses (bactériennes et mycosiques) et les viroses spécifiques du porc (voir plus haut, dans le chapitre « obstacle viral ») (14)

Le problème est le suivant : ces dépistages n'empêcheront pas l'émergence potentielle de virus nouveaux. (14)

- Ensuite, certains spécialistes ont proposé le traitement systématique des élevages par des antiviraux tels que aciclovir, ganciclovir, zidovudine. Mais les inconvénients d'une telle méthode préventive seraient son manque d'efficacité, ainsi que la sélection de souches résistantes à ces antiviraux. (14)

- Le plus important est de générer des troupeaux « germ free ». Cet objectif est assuré par l'élevage de lignées de porcs dans un environnement stérile. Le but étant de créer des porcs EOPS(7), c'est-à-dire des porcs exempts d'organismes pathogènes stricts. La ferme de Ploufragan en Bretagne maîtrise déjà ce type d'élevage. Il en est de même pour la société britannique Imutran qui produit des porcs transgéniques. (12) Une idée est de donner un agrément aux centres d'élevage. (1)

- Enfin, la technique du knock-out (étudiée dans le chapitre sur la transgénèse animale plus haut). (23)

Le principe consiste, d'une part, à identifier, grâce à la biologie moléculaire, les séquences provirales dangereuses dissimulées dans l'ADN porcine, et d'autre part, à les éliminer des troupeaux reproducteurs.(17) (7)

La technologie siRNA permet d'invalider 90% de l'expression des PERV... L'équipe de Hannover IXA 2007 y a travaillé. (23)

2) La protection du receveur

Deuxièmement, la prévention passe aussi par la protection du **receveur**, l'homme :

- Une première idée est d'isoler temporairement le patient greffé en quarantaine. (1)

- Une seconde solution préventive serait l'interdiction d'avoir des relations sexuelles pendant un an ou plus. (1)

- On pourrait également vacciner tous les receveurs contre les maladies virales connues. (23)

- Le plan principal consiste au suiti régulier et à long terme des personnes greffées.(12) et (14)

Ce contrôle rapproché s'effectue en trois temps :

* Avant la transplantation :

Le patient subit des sérologies des VIH 1 et 2, HTLV (virus T-Lymphotrope humain) 1 et 2, hépatites virales A, B, C et D, CMV (cytomégalovirus), HSV(herpes simplex virus) 1 et 2 et toxoplasmose. (14)

* Lors de la transplantation :

On effectue sur le patient des cultures bactériennes et virales du sang, des urines et de la gorge du receveur. Un sérum prélevé à ce moment sera conservé à 20°, en vue de pouvoir éventuellement déceler une séroconversion vis-à-vis d'un (ou plusieurs) agent(s) pathogène(s). (14)

* Après la transplantation :

Le patient greffé sera placé sous surveillance microbiologique et virologique par cultures, amplification génique et diverses sérologies (aux jours 7, 14, 28, puis aux mois 2, 6, 9 et 12, puis tous les 6mois)... Ces contrôles périodiques seraient susceptibles de durer la vie entière. (14)

On cherche actuellement à élaborer et perfectionner des méthodes de détection de xénozooses. (19)

3) Les procédures administratives

Trois remarques importantes sont à noter sur ce sujet :

Premièrement, si d'habitude le sujet peut toujours se retirer d'une situation expérimentale qui lui est proposée, ce n'est pas le cas dans l'éventualité d'une xénotransplantation où le malade, compte tenu de ce risque infectieux, ne peut pas volontairement sortir d'une procédure qu'il a acceptée. (1)

Deuxièmement, il s'agit de recueillir également le consentement éclairé de l'entourage du receveur. En effet, la famille, le personnel et les autres contacts de la personne greffée seront aussi la cible de surveillance clinique, voire biologique. (12)

Enfin, un registre national des xénozooses devra être mis en place. (14)

C) LES SOLUTIONS CONCERNANT LES PROBLEMES ETHIQUES

La majorité de la communauté des virologistes réclame un moratoire pour les essais cliniques de xénotransplantation.(14) (16) Il y a en effet un dilemme lors du passage du «savoir » au « faire ». (16)

Le débat prend des dimensions internationales :

- En France :

La France est le premier pays à avoir encadrer l'accès aux transplantations par la loi du 1/07/1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme à des fins thérapeutiques tels que les cellules, les tissus et les organes animaux. (7)

Comme toute recherche biomédicale, les xéno greffes sont soumises à une autorisation préalable délivrée par l'AFSSPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) . (12)

- En Suisse :

La décision du gouvernement helvétique de limiter strictement tout essai clinique, mais de ne pas l'interdire, correspond aux principes proposés par l'Académie suisse des sciences médicales. (10)

- En Angleterre :

En 1995, l'équipe de David White a annoncé son intention de procéder à des xéno greffes d'organes et de tissus de porcs transgéniques, sans cependant l'effectuer. (1)

Les autorités britanniques ont opté en 1997 pour un moratoire jusqu'à ce que les risques viraux soient mieux cernés. En effet, la crise provoquée en Angleterre par l'affaire de la maladie de la vache folle (Creutzfeldt-jakob, ESB) a fait basculer le débat du côté de la prudence.(14) (16)

Dans un même temps, le gouvernement britannique a créé une instance spécifique, appelée XIRA (Xénotransplantation Interim Regulatory Authority) chargée de suivre les recherches dans le domaine. C'est le Ministre de la Santé qui, en s'appuyant sur les avis de la XIRA, autorisera ou non, au cas par cas, les essais cliniques. (12)

- Aux USA :

L'équipe de Thomas Starzl, après l'échec en 1992 de la greffe d'un foie de babouin chez l'homme, plaide pour un moratoire, le temps d'amasser de nouvelles connaissances scientifiques. (1)

En janvier 1998, à Bethesda Maryland , il y a l'organisation d'un colloque :

Le scientifique Fritz Bach préconise un moratoire de toutes les formes de xénotransplantation clinique (11), via un article publié cette année-là dans la revue *Nature Medicine*.(1) Cela a créé la surprise car il est un des pionniers en matière de recherche dans la xénotransplantation et était encore très optimiste en 1994. (14)

Après une vague d'engouement pour la xénotransplantation,1998 est donc l'année du rappel à la Prudence.

En revanche, la FDA (Food and Drug administration), aux Etats-Unis, refuse d'envisager un moratoire, mais prévoit des règles plus strictes.(16) (12)

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

En mai 2004, l'OMS a adopté la résolution WHA 57.18 où elle autorise les xéno greffes que s'il y a un système de contrôle efficace par des autorités nationales de santé.

L'OMS demande aux Etats membres de dresser un inventaire des essais cliniques de xénotransplantation qui ont eu lieu sur leur territoire. Egalement, elle encourage les Etats membres à établir des normes de réglementation en ce qui concerne l'élevage des animaux EOPS, l'approbation des essais cliniques et les modalités de consentement et d'information du patient.

Un site internet « www.humanxenotransplant.org » a été élaboré par l'OMS, en collaboration avec l'Association internationale de xénotransplantation et les Hôpitaux Universitaires de Genève. Le but de ce site est de collecter les informations sur toute pratique de xénotransplantation chez l'homme ainsi que le pays dans lequel elle a eu lieu. (8)

Un ouvrage intitulé « Guides de bonne pratique en xénotransplantation » promis en 1998 n'est encore paru...tant le sujet est complexe. (14)

Qu'en est-t-il aujourd'hui ? Les scientifiques, via le projet xenome dont je parlerai plus bas, amassent un maximum de données nécessaires pour progresser vers la phase clinique initiale de la xénotransplantation chez l'homme. Actuellement, nous en sommes aux essais de greffes d'organes de porc sur le primate non-humain. (3)

D) STRATEGIES POUR LUTTER CONTRE LA DEREGULATION DE LA COAGULATION.

- GT-KO et l'expression induite des protéines régulatrices du complément humain confèrent une protection contre la réponse immunitaire humorale, mais NE RESOLVENT PAS LE PROBLEME DE LA DEREGULATION DE LA COAGULATION.

De même que la réalisation d'une transplantation thymus-rein, précédée de l'épuisement des ACantiGal et accompagnée d'une thérapie immunosuppressive, augmentera certes la survie de la greffe, mais n'empêchera pas le développement d'une MAT glomérulaire. Le bénéficiaire d'un organe de porc GT-KO et/ou transgénique pour les protéines régulatrices du complément humain peut développer une CC, et ce même si le greffon reste fonctionnel.

Il est donc nécessaire de recourir à de nouvelles idées.

Il y a deux façons de remédier à la dérégulation de la coagulation : On peut additionner l'apport de nouvelles modifications génétiques (du donneur) à des traitements anticoagulants (du receveur).

(54)

1) Autres modifications génétiques du DONNEUR

L'une des stratégies est de créer des porcs transgéniques pour des gènes anticoagulants et anti-thrombotiques. En Avril 2011, rien n'avait encore été rigoureusement testé.

- D'une part, on modifie le donneur en provoquant l'expression de gènes codant pour des molécules agissant à différentes étapes de l'activation de la coagulation et des plaquettes(6) , via les techniques de transgénèse animale évoquées plus haut.

a) CD39 :

CD39 est une ectonucléotidase qui convertit l'ADP en AMP, elle a une action antiplaquettaire.

(54) (57)

b) Thrombomoduline humaine

Le but est de favoriser la production de protéine C activée et d'augmenter ainsi l'inhibition de l'activité des complexes tenase et prothrombinase. Son action est aussi anti-inflammatoire.

(57)

c) TFPI :

Il bloque partiellement la transcription du facteur tissulaire (relayée par les AC anti non Gal dans le cadre de la xénogreffe) et contrôle ainsi l'initiation de la coagulation dépendante du facteur tissulaire. (57)

- D'autre part, on peut aussi modifier le donneur en inhibant l'expression de gènes responsables de la synthèse de facteur von willebrand ou encore de fibrinogène de type 2.

Une autre idée serait de sélectionner des porcs souffrant de la maladie de willebrand de type 3 et présentant donc un déficit en FvW(6).

2) Traitements systémiques anticoagulants du RECEVEUR

Les anticoagulants classiques tels que l'héparine, la warfarine et l'aspirine se sont révélés inefficaces dans le cadre de la dérégulation de la coagulation des xéno greffes. Aucun impact sur la survie du greffon n'a été observé.

Trois classes médicamenteuses présentent un intérêt : Les statines, la protéine C activée exogène et les anti-agrégants plaquettaires.

a) Les statines

Les statines ont un effet de régulation négative de l'expression du facteur tissulaire.

Les statines, inhibiteurs de l'HydroxyMéthylGlutaryl CoA réductase, surtout reconnues comme réducteurs de la synthèse du cholestérol, ont aussi des fonctions d'immuno-régulation, d'anti-inflammation et d'anti-coagulation (par inhibition de l'expression du facteur tissulaire) (54)

b) La protéine C activée exogène

En revanche, l'effet protecteur sera moindre que lorsque l'APC est endogène. De plus, il y a un risque d'augmentation des saignements.

c) Les agents inhibant l'agrégation plaquettaire

Le clopidogrel PLAVIX exerce un antagonisme (par fixation irréversible par deux ponts disulfures) des récepteurs à l'ADP de type P2Y12 des plaquettes, empêchant ainsi leur agrégation.

L'éptifibatide INTEGRILIN est un antagoniste réversible des récepteurs gpIIb/IIIa des plaquettes, empêchant la liaison du FvW et du fibrinogène et donc l'agrégation.

Ces deux médicaments ont fait preuve d'efficacité dans des études menées dans le cadre de xénotransplantation.

(58) (54)

A également été envisagée l'administration d'apyrase ou d'antagonistes de gpIIb/IIIa en association avec un inhibiteur du complément. (6)

Concluons en disant que la littérature suggère que la coagulopathie de consommation est moins fréquente et/ou intensive lorsqu'une thérapie immunosuppressive est administrée, bien que le mécanisme exact de cet effet reste incertain. (31)

Il en ressort que l'inhibition de la thrombose pourrait, en association avec d'autres stratégies, prolonger la survie des xéno greffes. (6)

II) LE PROJET XENOME

La xéno greffe et ses tentatives expérimentales ont vu le jour au 17ème siècle et ont évolué depuis...Mais le temps de la xénotransplantation est loin d'être révolu : Ce début de 21ème siècle a été riche en nouvelles découvertes dont je compte vous faire part dans cette dernière partie.

Nous aborderons ici ce qui a marqué cette dernière décennie, un sujet au cœur de l'actualité : le projet Xenome.

Il s'agit d'un projet au cœur de l'actualité. Définissons-le et citons ses acteurs internationaux ainsi que ses objectifs principaux.

A) LA DEFINITION

Dans le but de générer les données nécessaires à la progression de la xénotransplantation vers sa phase clinique initiale, un projet est né : le projet XENOME. Il est intégré dans le sixième programme-cadre européen.

Le financement de ce projet a été approuvé par la commission européenne en Octobre 2006, jusqu'en 2012. Le budget atteint les 10millions d'euros. (4)

Les principaux domaines scientifiques de recherche comprennent l'immunologie, le génie génétique, la physiologie. En outre, la sécurité, l'éthique et la réglementation font également partie du programme.

Le projet XENOME entre donc dans le cadre d'un programme de recherches pluridisciplinaires. Vont rentrer en jeu des biologistes moléculaires, des spécialistes du clonage, des virologues, des chirurgiens et même des éthiciens. (4)

B) LES PARTENAIRES

Généralement, les projets financés par l'Union Européenne impliquent une petite vingtaine de partenaires . Ceux-ci s'engagent à collaborer ensemble sur un travail s'étalant sur environ 5ans.

Dans notre cas, le Projet XENOME est pris en charge dans 22 institutions académiques de 11 pays européens (4)

Nantes, en France, et Louvain, en Belgique, abritent les unités spécialisées dans la greffe du rein. (4)

L'Italie est le siège de la production des porcs génétiquement modifiés.

Pour atteindre ses objectifs, les acteurs de ce projet ont eu recours à des techniques biomoléculaires de pointe, ainsi que des modèles in vivo. (4)

Tableau 9 : Les pays et laboratoires partenaires du projet XENOME (3)

<u>PAYS</u>	<u>LABORATOIRES</u>
ITALIE	Azienda Ospedaliera di Padova AVANTEA srl Consorzio per la Ricerca sul trapianto d'Organi Università Cattolica S.C. Milano Università di Padova Università di Milano-Bicocca
PORTUGAL	Biomédical law centre Fundação Calouste Gulbenkian
FRANCE	Commissariat à l'énergie atomique Institution de Transplantation et de Recherche en Transplantation(université de Nantes)
BELGIQUE	Université Catholique de Louvain
ALLEMAGNE	Friedrich-Loeffler Institut, federal Research Institute for Animal Health GATC Biotech AG Hannover Medical School
SUEDE	Corline Systems AB
ROYAUMES-UNIS	Glasgow Caledonian University University College London
REPUBLIQUE TCHEQUE	Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic
PAYS-BAS	Leiden University Medical Centre
AUTRICHE	Medical University of Vienna
ESPAGNE	Universidad del Pais Vasco

C) LES MISSIONS

L'objectif principal est de déterminer si la xéno greffe est réalisable sur l'homme...
Dans ce but, les différents partenaires vont s'appliquer à mettre en œuvre quatre idées :

1) Création d'un porc « super-engineered »

Tout d'abord, il s'agira de créer un porc « super-engineered ». On entend par ce terme un porc au génotype entièrement créé et choisi. Il s'agit également de fournir des preuves expérimentales de l'efficacité de celui-ci quant à la survie à long terme des organes de porcs greffés chez le primate non-humain. (3)

2) Nouveaux agents pharmaceutiques d'immunosuppression

Ensuite, une seconde idée est de tester de nouveaux agents pharmaceutiques d'immunosuppression. (3)

3) Un cadre d'innocuité

Troisièmement, il sera stratégique de mettre en place un puissant cadre d'innocuité : Cette assurance de sécurité est nécessaire pour l'évolution de la xéno transplantation vers le stade d'essai clinique.

Ce projet comprend : L'élevage d'un troupeau de « porcs-sources propres », l'inactivation des séquences PERV du génome (Rôle de GATC* en Allemagne. La position génomique de PERV est localisée grâce à la méthode de LAM-PCR**). Egalement les études in vivo à long terme sur les primates greffés ainsi que le développement de techniques pour un diagnostic précoce de l'infection. (3)

* GATC est le leader européen des prestataires de service de séquençage d'ADN et de bioinformatique.

** LAM-PCR signifie en anglais Linear Amplification Mediated Polymerase Chain Reaction... Il s'agit d'une méthode de biologie moléculaire destinée à rechercher des sites d'intégration de vecteurs d'intégration afin d'identifier leur position dans le génome. Ces vecteurs peuvent être viraux. (68)

4) Ethique et réglementation

Et enfin, fournir un cadre éthique et réglementaire solide se révèle également intéressant. (3)

CONCLUSION

Face à la pénurie d'organes, motivation principale et moteur majeur des recherches sur la xéno greffe, nous nous confrontons à deux interrogations : La première étant « La mise en application clinique de la xénotransplantation est-elle susceptible d'engendrer une diminution du dons d'organes humains, aggravant ainsi la pénurie ? » La seconde est celle-ci : « Au delà des greffes, allogénique et xénogénique, quelles-sont les alternatives face au problème d'insuffisance d'organes sévère ? »

Qu'en est-t-il donc des répercussions que pourrait avoir la xéno greffe sur l'allogreffe ?

Tout d'abord, la réussite potentielle de la xénotransplantation représente un risque de désinvestissement du don d'organes humains. En effet, l'allogreffe est fondée sur la pratique du don. Or, dans le cadre de la xéno greffe, le partage des organes humains sera remplacé par un commerce d'organes animaux.(1) Le public se sentira moins concerné par la cause.(12)

De plus, une seconde menace nous guette : Les xénotransplants étant considérés comme des organes de second choix, se pose alors le problème de la sélection de ceux qui auront droit à des organes humains sensés être de meilleure qualité. (19)

Autre problème, à travers de mauvaises campagnes publicitaires, la xéno greffe pourrait avoir un effet répulsif pour toutes les transplantations en général. (1)

Enfin, nous avons étudié les nombreux avantages qu'offre la xéno greffe face à l'allogreffe...mais supposons que la réussite de la xéno greffe se révèle dans les prochaines décennies être bel et bien une utopie, qu'en est-t-il des alternatives aux greffes ?

Plusieurs voies différentes sont envisageables: Aborder différemment le don d'organes, s'attaquer de manière préventive aux causes de l'insuffisance d'organes au lieu de se concentrer sur les dégâts causés par celle-ci, créer des organes artificiels, ou encore élaborer des stratégies impliquant des cellules souches.

1) L'AMELIORATION DU DON D'ORGANES (3) (16)

Plusieurs idées s'offrent à nous pour augmenter le nombre de dons d'organes:

- Tout d'abord, l'élaboration de nouveaux règlements juridiques concernant le don d'organe.

La solution dite du « consentement présumé » permet de prélever des organes d'êtres humains en état de mort cérébrale, pour autant que leurs proches de s'y opposent pas expressément. (12)

Une Loi entrée en application en Belgique en 1987 stipule que « Toute personne n'ayant pas exprimé, de son vivant, un refus de céder ses organes devient un donneur potentiel en cas de mort accidentelle. ». (9)

- Deuxièmement, une meilleure formation du personnel soignant et des médecins : Les préparer au difficile entretien avec les proches d'un donneur potentiel.

- Ensuite, le lancement de campagnes de sensibilisation du public: Il s'agit de sensibiliser davantage le grand public à ces problèmes et renforcer sa confiance dans les institutions impliquées dans les greffes. (12)

- Enfin, la récompense financière de la disposition au don est aussi une idée. (19)

2) LE TRAITEMENT DES CAUSES DE LA DEFAILLANCE DES ORGANES

Il s'agit ici d'entreprendre des études pour mettre au point des traitements qui s'attaqueraient à la racine du mal. (12)

Prenons l'exemple de l'insuffisance rénale:

Les deux causes principales sont le diabète et l'hypertension artérielle. Mais d'autres maladies peuvent aussi être responsables d'insuffisance rénale chronique : Les glomérulonéphrites primaires, les calculs rénaux, le lupus érythémateux systémique, la maladie polykystique des reins, le syndrome d'Alport, le syndrome hémolytique urémique, le syndrome néphrotique de l'enfant et enfin la tumeur de Wilms. Les drogues et les infections bactériennes sont encore des éléments déclencheurs. (69)

L'idéal serait de limiter l'évolution de ces pathologies.

3) LES ORGANES ARTIFICIELS (3) (16)

Les premiers prototypes d'organes artificiels ont déjà vu le jour, mais il reste à trouver de meilleures solutions concernant le choix des matériaux appropriés et l'apport en énergie.. (12)

En 1999, a eu lieu la première assistance cardiaque mécanique. Depuis, des travaux sont en cours pour proposer des foies, des poumons et des pancréas artificiels. (9)

4) L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES

Prenons l'exemple de la greffe de moelle osseuse: Elle consiste en un transfert de cellules souches sanguines. (9)

Il s'agit de développer des technologies d'ingénierie tissulaire basée sur l'utilisation de cellules souches.

(Cependant les données actuelles indiquent que la xénotransplantation pourrait fournir une solution beaucoup plus tôt que la recherche sur les cellules souches)

(3) (9) (16)

Pour conclure, une ultime remarque : Je dirais que le mot-clé de cette thèse est « hypothèse ». En effet, il faut reconnaître que la xénotgreffe en est toujours au stade de la recherche, que le subjonctif est souvent utilisé... Et on ne peut nier que de nombreuses questions dans ce travail sont encore aujourd'hui sans réponses.

ANNEXE 1 – LES IMMUNOSUPPRESSEURS-

Sources : Dorosz 2010

<u>CLASSE et MECANISME D'ACTION</u>			<u>DCI</u>	<u>NOM COMMERCIAL</u>
<u>1) ↓effets des cytokines</u>	<u>1) ↓IL2</u>	<u>1) inhibe synthèse IL2</u>	Ciclosporine A	NEORAL
			tacrolimus	PROGRAF
		<u>2) inhibe mTOR</u>	sirolimus	RAPAMUNE
			évérolimus	CERTICAN
		<u>3) glucocorticoïde</u>		
	<u>2) ↓IL1</u>		anakinra	KINERET
	<u>3) ↓TNFα</u>	<u>Inhibe TNFα</u>	infliximab	REMICADE
			adalimumab	HUMIRA
			etanercept	ENBREL
<u>2) inhibe synthèse ADN</u>	<u>1) alkylants</u>		Cyclophosphamide	ENDOXAN
			chlorambucil	CHLORAMINOPHENE
	<u>2) antimétabolites</u>		azathioprine	IMUREL
			mycophénolate	CELLCEPT
			leflunomide	ARAVA
<u>3) AC anti-lymphocytaires</u>	<u>1) monoclonaux</u>	<u>IL2</u>	basiliximab	SIMULECT
			daclizumab	ZENAPAX
		<u>Anti CD3</u>	Muromonab	ORTHOCLONE OKT3
	<u>2) polyclonaux</u>		lymphoglobuline	
			thymoglobuline	
<u>4) autres</u>			efalizumab	RAPTIVA

ANNEXE 2
LES PRINCIPAUX CHERCHEURS
ACTEURS DANS LES EXPERIENCES RECENTES
SUR LE MODELE PORC-A-PRIMATE

L'annexe 2 suivante répertorie les différents travaux expérimentaux des chercheurs effectués de janvier 2009 à octobre 2010 :

Protocoles utilisés et résultats observés par des chercheurs entre janvier 2009 et octobre 2010 (31)

<u>CHERCHEURS</u>	<u>PORCS UTILISES</u>	<u>OBSERVATIONS</u>
Groupe Australien (Peter Cowan de Melbourne)	GTKO/CD55/CD59/HT	- Amélioration de la survie du greffon - Retard, voire empêchement, de la CC
Emanuele Cozzi (du département de médecine et de chirurgie de l'université de Padoue, Italie) et S. Le Bas-Bernardet (dans le cadre du projet XENOME)	GTKO/CD55/CD59/CD39/HT	- Résultats similaires - Présence de cellules CD20+ infiltrant la majorité des greffons
Adam Greisemer (du Groupe de Boston, chirurgien diplômé de l'université de Columbia, recherche en Immunologie et Transplantation)	GTKO/thymokidney +test d'AC monoclonaux anti-CD20 + irradiation du corps entier	- Record de durée de survie : 83j grâce à l'induction de tolérance - Aucun signe d'infiltration cellulaire, ni de dépôt d'IgG - Perte du greffon causée par des niveaux élevés d'AC anti-no-gal cytotoxiques préformés
Burdorf	- GTKO -GTKO/CD55 - GTKO/CD46 épuisement des cellules T, ..	- Démonstration de l'intérêt de porcs transgéniques pour CRPh par rapport à GTKO seul. - Même observation que Greisemer quant aux AC anti non gal
Mohamed Ezzelarab (Professeur adjoint de recherche de l'université de Pittsburgh, Etats-Unis, Immunologie- Allogreffe- Xénotransplantation)	GTKO/venin de cobra* * épuisement de l'activité du complément	- Insuffisant pour empêcher AHXR et /ou CC

Lin	<ul style="list-style-type: none"> - GTKO - GTKO/CD46 	<ul style="list-style-type: none"> - Observation de CC. Etude du rôle du TF sur les plaquettes et les cellules mononucléées de la circulation. l'histopathologie du greffon montre une agrégation plaquettaire avec dépôt de fibrine , sans infiltration cellulaire ni réponse immunitaire humorale → il faudra donc prévenir l'activation plaquettaire
-----	---	--

Notons que tous ont travaillé sur des babouins, à l'exception de Cozzi qui a utilisé un singe cynomolgus.

(31)

LES LABORATOIRES DE RECHERCHE CONCERNES

Le chef de file mondial en matière de xénotransplantation est la société de biotechnologies IMUTRAN, localisée à Cambridge aux Royaumes-Unis, c'est une filiale du laboratoire suisse NOVARTIS.

Depuis l'acquisition de Imutran, Novartis a promis un milliard de dollars pour la recherche en xénotransplantation, en vue de posséder un marché annuel de 11 milliards en comptant les organes et les immunosuppresseurs associés.

Un second laboratoire qui travaille sur la transplantation d'organes de porc est le groupe américain BAXTER, lié à NEXTRAN.

Selon une estimation de la société de courtage américaine Salomon Brothers, le marché auquel s'adresse la xénotransplantation serait, vers 2020, d'environ 6 milliards de dollars.

(12)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) P.Delbé, *La xénogreffe est-elle une chimère ?*, Médecine thérapeutique, volume 6, numéro 6, 450-5, année 2000
- (2) C. Saint-Germain, *La porcification de la personne humaine. L'effacement médical de la frontière des espèces : le cas des xénogreffes*, Cahiers de recherche sociologique, p.99-117, année 2003
- (3) Xenome project, <http://www.xenome.eu/> (consulté le 24/01/2013)
- (4) Université catholique de Louvain, <https://uclouvain.be/261578.html> (consulté le 24/01/2013)
- (5) C.Séveno, M.Fellous, J.Ashton-Chess, JP Soullillou, B.Vanhove, *Les xénogreffes finiront-elles par être acceptées ?*, Médecine Sciences, volume 21, n°3, p.302-308, année 2005
- (6) A.Azimzadeh, C.Meyer, M.Audet, P.Wolf, *Le rejet de xénogreffe : acquis et perspectives*, Sang Thrombose Vaisseaux, volume 11, n°6, p.448-59, année 1999
- (7) Comité consultatif national d'éthique, avis n°61, année 1999
- (8) A.Sgroi, R.M.Baertschiger, P.Morel, L.H.Buhler, *La xénotransplantation, bientôt une réalité clinique?*, Revue Médicale suisse, n°3117, année 2007
- (9) E.Di Pietro, *La xénotransplantation : une solution ou des problèmes?*, Revue des questions scientifiques, 178(1) : p.91-112 , année 2007
- (10) L.H.Bühler, T.Berney, P.Majno, G.Mentha, P.Morel, *Xénotransplantation : solution au manque d'organes?*, Revue médicale suisse, n°2442
- (11) *Entretien avec Fritz Bach*, la Recherche, n°320, p.68, année 1999
- (12) *La xénogreffe sous toutes ses sutures*, La Recherche, Le Prix la recherche, année 2012
- (13) *Problèmes éthiques des transplantations d'organes*, déclaration de la Conférence épiscopale allemande et du Conseil de L'Eglise évangélique en Allemagne, La documentation catholique, n°2021, année 1991
- (14) C.Chastel, *Xénotransplantation et risque viral*, Virologie, volume 2, n°5, p.385-92, année 1998
- (15) C.Franssen, D.Lambrigts, S.Degesves, F.Coignoul, C.Bouillenne, M.Lamy, M.Meurisse, G.P.J.Alexandre, Revue médicale Liège, 53 :2 :p.77-102, année 1998
- (16) J.S., *La xénotransplantation fait des vagues*, Cahiers Agricultures, 7 :159-61, année 1998
- (17) R.Lanza, D.Cooper, W.Chick, *Les xénotransplantations*, Pour la science, n°239, année 1997
- (18) S.Coupel, G.Boulday, B.Charreau, *La xénotransplantation : une définition simple pour un pari biologique humain et animal*, Médecine thérapeutique, volume 8, n°5, p.293-300, année 2002
- (19) Office fédéral de la santé publique (OFSP), Confédération Suisse, <http://www.bag.admin.ch/index.html?lang=fr> (consulté le 20/01/2013)
- (20) T.Leroux, *Si la xénotransplantation m'était contée*, Lex Electronica, volume 10, n°2, année 2005
- (21) M.Eloit, *Il existe deux types de rétrovirus porcins endogènes(PERV)*, Virologie, volume 1, n°6, année 1997
- (22) J.L.Blond, V.Cheyne, F.Mallet, *Signification des rétrovirus endogènes humains*, Virologie, volume 5, n°2.91-111, année 2001
- (23) G.Blancho, *La xénotransplantation*, CHU de Nantes, http://spiral.univ-lyon1.fr/files_m/M6576/WEB/02-praticien_des_formation_continue/01-immunologie/02-strategies-immunosuppressives/xenotransplantation.pdf (consulté le 25/01/2013)
- (24) C.Denesvre, *Présence de rétrovirus endogènes porcins dans le plasma de porc et le facteur VIII porcin purifié*, Virologie, volume 5, n°4, année 2001

- (25) L-M.Houdebine, *Les premiers remplacements de gène chez le porc*, Cahiers Agricultures, volume 1, n°1, année 2002
- (26) M.Cascalho, BM.Ogle, JL.Platt, *Xenotransplantation and the future of renal replacement*, Journal of the American Society of Nephrology, 15(5): p.116-12, année 2004
- (27) PJ.O'Connell, *Thrombotic microangiopathy: the next big hurdle for xenotransplantation*, Journal of the American Society of Nephrology ;16(9): p.2529-30, année 2005
- (28) B.Samstein, JL.Platt, *Physiologic and immunologic Hurdles to xenotransplantation*, Journal of the American Society of Nephrology , 12(1): p.182-93, année 2001
- (29) LH.Toledo-Pereyra, F.Lopez-Neblina, *Xenotransplantation : a view to the past and an unrealized promise to the future*, Experimental and Clinical Transplantation;1(1):1-7, année 2003
- (30) A.Cox, R.Zhong, *Current advances in xenotransplantation*, Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, volume4, n°4, année 2005
- (31) B.Ekser, G.Kumar, M.Veroux, DK.Cooper, *Therapeutic issues in the treatment of vascularised xenotransplants using Gal-knockout donors in non human primates*, Current Opinion in Organ Transplantation, 16(2): p.222-30, année 2011
- (32) L-M. Houdebine, *La transgénèse animale et ses applications*, INRA Productions Animales, 11(1), 81-94, année 1998
- (33) González Martin M, J Buitron Garcia, Alonso Hernandez A, Centeno Cortes A, E lopez Pelaez, Vasquez Martul E, J Mosquera Reboredo, Requejo Isidro Je, Manez Mendiluce R, , Actas Urol Esp, 28(3) : 161-74, mars 2004
- (34) www.canalu.tv/video/universite_de_tous_les_savoirs/la_transgenese_et_ses_applications.855
- (35) Bruce A.Macher, Uri Galibi b, *The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc(alphaGal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance*, BBA(Biochimica and Biophysica Acta) sujets généraux, volume 1780, n°2, p.75-88, février 2008
- (36) Uri Galili, *The alpha-gal epitope(galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation*, Biochimie, volume 83, n°7, p.557-563, juillet 2001
- (37) S.Le Bas-Bernadet, X.Tillou, N.Poirier, N.Dilek, M.Chatelais, J.Devallière, B.Charreau, J.Hervouet, K.Renaudin, C.Crossan, L.Scobie, PJ.Cowan, AJF d'Apice, C.Galli, E.Cozzi, JP.Soulillou, B.Vanhove, *Xenotransplantation og galactosyl-transfêrase knockout, CD55, CD59, CD39, and fucosyl-transfêrase transgenic pig kidneys into baboons*, Transplantation Proceedings, volume 43, n°9, p.3426à3430, novembre 2011
- (38) H.Nishimura, J.Scalea, Z.Wang, A.Shimizu, S.Moran, B.Gillon, David H.Sachs, K.Yamada, *First experience with the use of a recombinant CD3 immunotoxin as induction therapy in pig-to-primate xenotransplantation: the effect of T-cell depletion on outcome*, Transplantation, 27;92(6): 641-647, septembre 2011
- (39) W.Ramackers, J.Klose, M.Winkler, *Xeno-kidney transplantation: from idea to reality*, transplantation, volume 44, issue 6, p.1773-1775, juillet-aout 2012
- (40) A.Shimizu, K.Yamada, Simon C.Robson, David H.Sachs; roberts B.Colvin, *Pathologic characteristic of transplanted kidney xenografts*, JASN (Journal Am Soc Nephrol), 23(2) : 225-235, Février 2012
- (41) A.Shimizu, K.Yamada, S.Yamamoto, John M.Lavelle, R.N.Barth, S.C.Robson, David H.Sachs, R.B.Colvin, *Thrombotic microangiopathic glomerulopathy in human decay accelerating factor-transgenic swine-to-baboon kidney xenografts*, JASN(Journal Am Soc nephrol)1, volume 16, n°9, 2732-2745, septembre 2005
- (42) B.Sprangers, M.Waer, AD.Billiau, *Xenotransplantation: where are we in 2008?*, Kidney International, 74, 14-21, année 2008
- (43) *Interaction of baboon anti-alpha galactosyl antibody with pig tissues*
- (44) B.Ekser, P.Rigotti, B.Griddelli, David KC Cooper, *Xenotransplantation of solid*

- organs in the pig-to-primate model*, Transplant Immunology, volume 21, n°2, p.87-92, juin 2009
- (45) G.L.Puga Yung, Y.Li, L.Borsig, A-L.Millard, M.B.Karpova, D.Zhou, J.D.Seebach, *Complete absence of the alphaGal xenoantigen and isoglobotrihexosylceramide in alpha1,3galactosyltransferase knock-out pigs*, NIHPA(national institutes of health publi access) *La xenotransplantation*, 19(3): 196-206, mai-juin 2012
- (46) A.D.Griesemer, A.Hirakata, A.Shimizu, S.Moran, A.Tena, H.Iwaki, Y.Ishikawa, P.Schule, J.S.arn, S.C.Robson, A.J.Fishman, M.Sykes, David H.Sachs, K.Yamada, *Results of gal-knockout porcine thymokidney xenografts*, *Am J Transplant*, 9(12), p.2669-2678, décembre 2009
- (47) R.N.Barth, S.Yamamoto, J.C.LaMattina, N.Kumagai, H.Kitamura, P.A.Vagefi, M.Awwad, R.B.Colvin, D.K.C. Cooper, M.Sykes, David H.Sachs, K.Yamada, *Xenogenic thymokidney and thymic tissue transplantation in pig-to-baboon model: Evidence for pig-specific T-cell anresponsiveness*, *Transplantation*, volume 75, n°10, p.1615-1624, mai 2003
- (48) S.Yamamoto, J.M.Lavelle, P.A.Vagefi, H.Arakawa, E.Samelson-Jones, S.Moran, K.Teranishi, C.Kamano, J.Fishman, M.Awwad, D.M.Neville, A.Shimizu, M.Sykes, David H.Sachs, K.Yamada, *Vascularized thymic lobe transplantation in a pig-to-baboon model: a novel strategy for xenogenic tolerance induction and T-cell reconstitution*, *Transplantation*, Volume 80, n°12, p.1783-1790, décembre 2005
- (49) C Lin Che, M.Ezzelarab, R.Shapiro, B.Ekser, C.long, H.Hara, G.Echeverri, C.Torres, H.Watanabe, D.Ayares, A.Dorling, D cooper KC, *Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation*, *Am Journal of Transplantation*, 10 (7), p.1556-1568, juillet 2010
- (50) D.Droz, D.Nochoy, L-H.Noel, D.Hendes, B.Nabarra, G.Hill, *Microangiopathie thrombotique: lésions rénales et extrarénales*, p.173- 184
- (51) <http://www.embryology.ch/francais/qblood/erlangung03.html> (consulté le 25 avril 2013)
- (52) <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/21784/ch04.html> (consulté le 25 avril 2013)
- (53) David H.Sachs, cesare Galli, *Genetic manipulations in pigs*, *Current opinion in organ transplantation*, 14(2), p.148-153, avril 2009
- (54) Chih Lin Che, KC David Cooper, Anthony Dorling, *Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate*, *Transplant immunology*, 21(2), p.75-80, juin 2009
- (55) *Transgénèse animale, les techniques de transfert de gènes chez les animaux*, rédigé par V.Thizeau, relu par L-M Houdebine, <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/transgen/html/transan.htm> (consulté le 30/04/13)
- (56) Dennis Jones, *Genetic engineering of a mouse*, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(2) : 117-124, juin 2011
- (57) <http://www.ufrsdv.u-bordeaux2.fr/cmsufrsdv/wp-content/uploads/2010/09/101020-Cours-BDA-M1-C-Baudet-1.pdf> (consulté le 01/05/13)
- (58) P.J.Cowan, S.C.Robson, Anthony J.F.d'Apice, *Controlling coagulation dysregulation in xenotransplantation*, *Current Opinion in Organ Transplantation*, 16 (2) : 214-221, avril 2011
- (59) <http://nephroblog.org/2012/08/14/que-se-passe-t-il-lors-dun-rejet/> (consulté le 5juin2013)
- (60) <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/?sequence=7> (consulté le 6 juin 2013)
- (61) J-P Dehoux, P.Gianello, *Xénotransplantation*, *Annales de Médecine vétérinaire*, 147, p.147-157, année 2003
- (62) Jacques Dantal, *Utilisation des anticorps monoclonaux en transplantation d'organes*, *Les anticorps monoclonaux en thérapeutique*, Volume 7, n°6, p.426-432, juillet 2001

- (63) T.S.Lee, L.Y.Chau, *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*, Nat.Med, 8(3): 240-6, mars 2002
- (64) <http://www.lescoursdentaires.com/physiologie-de-hemostase/> (consulté le 03/04/13)
- (65) [http://www.medecine.unilim.fr/formini/descreso/toulouse_mars_2008/Coagulopathie_de_consommation_et_coagulation_intra_vasculaire_disseminee\(P_Sie\).pdf](http://www.medecine.unilim.fr/formini/descreso/toulouse_mars_2008/Coagulopathie_de_consommation_et_coagulation_intra_vasculaire_disseminee(P_Sie).pdf) (consulté le 05/06/13)
- (66) B.Choufi, K. Lassoued, *Thymus et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques*, Hématologie, Volume 18, N°5, p.272-283, Septembre-Octobre 2012
- (67) http://www.aetna.com/cpb/medical/data/300_399/0355.html (consulté le 10/10/13)
- (68) <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2582> (consulté le 10/10/13)
- (69) <http://www.kidney.ca/page.aspx?pid=931> (consulté le 10/10/13)
- (70) C.Wagner, C.Ochmann, M.Schoels, T.Giese, S.Stegmaier, R.Richter, F.Hug, GM.Hänsch, *The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes*, Molecular Immunology, 43(6), p.643-51, février 2006
- (71) Janeway, Murphy, Travers, Walport, *Immunobiologie*, 3ème édition, de boeck. (consulté sur books.google.fr)
- (72) P.Coppo, C.Loirat, *Microangiopathies thrombotiques*, http://www.srlf.org/rc/org/srlf/htm/Article/2011/20110816-093227-791/src/htm_fullText/fr/20110812_Coppo_P_RFE_Thrombopenie_MAT.pdf (consulté le 3/6/13)
- (73) <http://www.biomedcentral.com/1471-2369/14/260>
Y.Sakamaki, K.Konishi, K. et M. Hayashi, A.Hashiguchi, E.Kubota, T.Saruta, H.Itoh, *Renal thrombotic microangiopathy in a patient with septic disseminated intravascular coagulation*, BMC.Nephrol., 27;14(1):360, Novembre 2013
- (74) <http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/B48-CIVD-EMC.pdf> (consulté le 2/12/13)
- (75) <http://www.cours-pharmacie.com/immunologie> (consulté le 10/06/13)
- (76) http://allergo.lyon.inserm.fr/M1_2009-2010/07-Immunoglobulines_M1_2009.pdf (consulté le 31/11/13)
- (77) <http://www.influenza.be/fr/content/grippe-aviaire> (consulté le 31/11/13)
- (78) <http://www2.cnrs.fr/journal/2953.htm> (consulté le 10/06/13)
- (79) http://spiral.univ-lyon1.fr/files_m/M2954/WEB/DOCS/JET8/JET-TF.pdf (consulté le 7/12/13)
- (80) <http://kloselab.co.uk/lab-members> (consulté le 7/12/13)
- (81) <http://www.kcl.ac.uk/medicine/research/divisions/timb/about/people/profiles/anthonydoring.aspx> (consulté le 7/12/13)
- (82) M.Cascalho, J.L.Platt, *Biological responses to xenotransplantation*, Nature Reviews Immunology, 1, 154-160, Novembre 2001
- (83) T.Fujita, M.Matsushita, Y.Endo, *Evolution of the lectine-Complement pathway and its role in innate immunity*, Immunol Rev, 198 : 185-202, avril 2004
- (84) PB.Yu, ZE.Holzknrecht, D.Bruno, W.Parker, JL.Platt, *Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies a role for IgM anti-gal*1-3Gal antibodies*, The Journal of Immunology, 157, p.5163-8, année 1996.

Université de Lille 2

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire **2013-2014**

**VANDERVAEREN
MELANIE**

Titre de la thèse :

Les xénogreffes d'organes de porc chez l'homme, une utopie ?

Mots-clés :

xénogreffe, porc transgénique, rejet immunologique, rétrovirus, transgénèse animale, immunosuppresseur, accommodation, immunotolérance, dérégulation de la coagulation

Résumé :

La première partie de la thèse porte tout d'abord sur les travaux réalisés le siècle dernier et les découvertes historiques apportées en matière de xénotransplantation.

Suit à cela une liste d'avantages que présente la potentielle réussite de la xénotransplantation par rapport à l'allogreffe. Enfin, j'argumente pourquoi le porc serait l'animal idéal pour le don d'organes.

Qu'est-ce qui entrave la réussite actuelle de la greffe xénogénique ? Principalement, le rejet. De trois types : suraigu, aigu et chronique. D'autres problèmes s'additionnent : les différences physiologiques entre l'homme et le porc, le danger viral menaçant le malade et la société, les interrogations éthiques, telles que l'identité de l'homme remise en cause, la défense des droits de l'animal, la place des religions... Enfin, un obstacle, plus récent, touche le domaine de l'hématologie : la dérégulation de la coagulation.

La seconde partie s'intéresse à un projet européen, nommé projet XENOME. Son objectif principal est d'apporter des solutions aux difficultés évoquées plus haut, afin d'aboutir à l'application clinique de la xénogreffe. Quelles sont ces solutions ? Des stratégies anti-rejet consistant en la modification du donneur et la préparation du receveur. On abordera les thèmes de la transgénèse animale, de l'immunotolérance, de l'accommodation... Ensuite, je liste les recommandations sanitaires de prévention virologique. J'aborde aussi la polémique des moratoires, avant de finir par des idées pour contrer la dérégulation de la coagulation.

En conclusion, si dans les prochaines décennies la xénotransplantation s'avère être bel et bien une utopie..quelles en seraient les alternatives ?

Membres du jury :

Président : Duriez Patrick, Professeur en Physiologie, à la faculté de Lille 2.

Assesseurs : Hermann Emmanuel, Docteur en Immunologie, à Lille.

Roger Nadine, Maître de conférence en Immunologie, à Lille.

Membres extérieurs: Gomez, Emmanuel, Docteur en Pharmacie

Bouyé, Sébastien, Praticien hospitalier, Spécialiste de
transplantation rénale , Service Urologie de l'Hôpital

Claude Huriez, CHU de Lille