

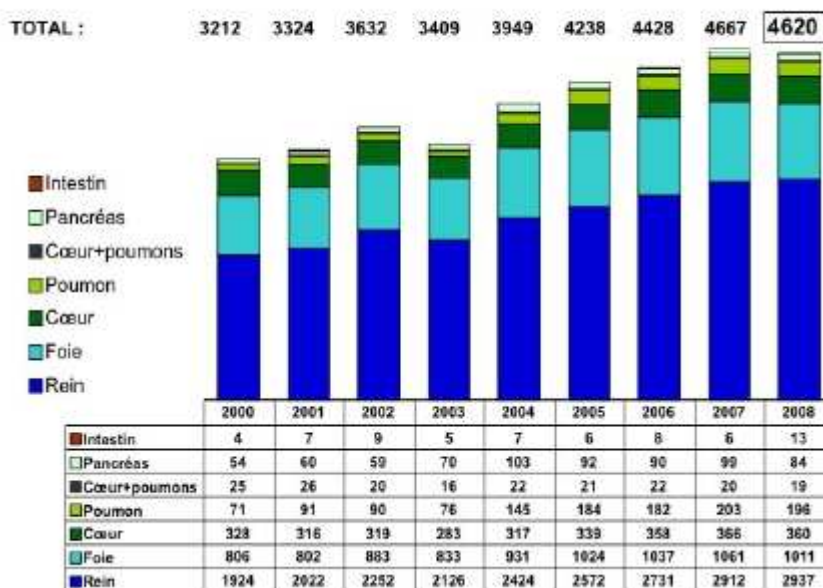
B Les animaux donneurs d'organes

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

.B.1. Introduction : pourquoi la xénogreffe ?

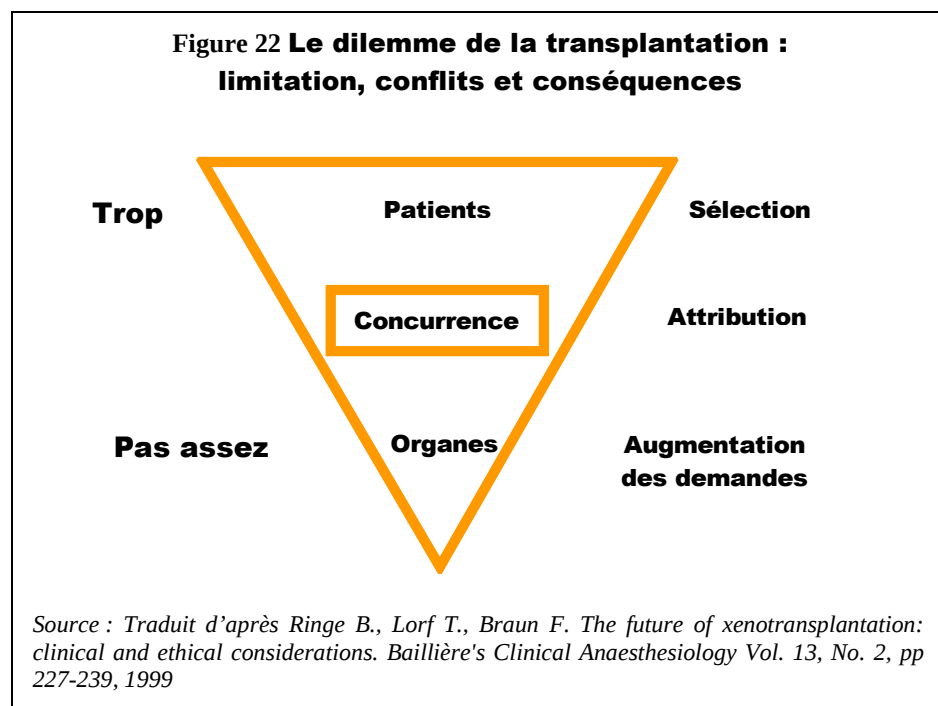
La transplantation de cellules, tissus, organes d'une espèce à une autre, connaît un regain d'intérêt depuis une vingtaine d'années. Appelée xénogreffe, cette transplantation fait l'objet de nombreuses recherches depuis les progrès encourageant des années 1990 sur les greffes d'organes humains (**allogreffe**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

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



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

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



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

.B.2. Historique

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

Tableau 12 Histoire clinique de la xénotransplantation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B.3.2 Risque infectieux lié au porc

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

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

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

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

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

Les risques infectieux potentiels des xénotransplantations comprennent :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

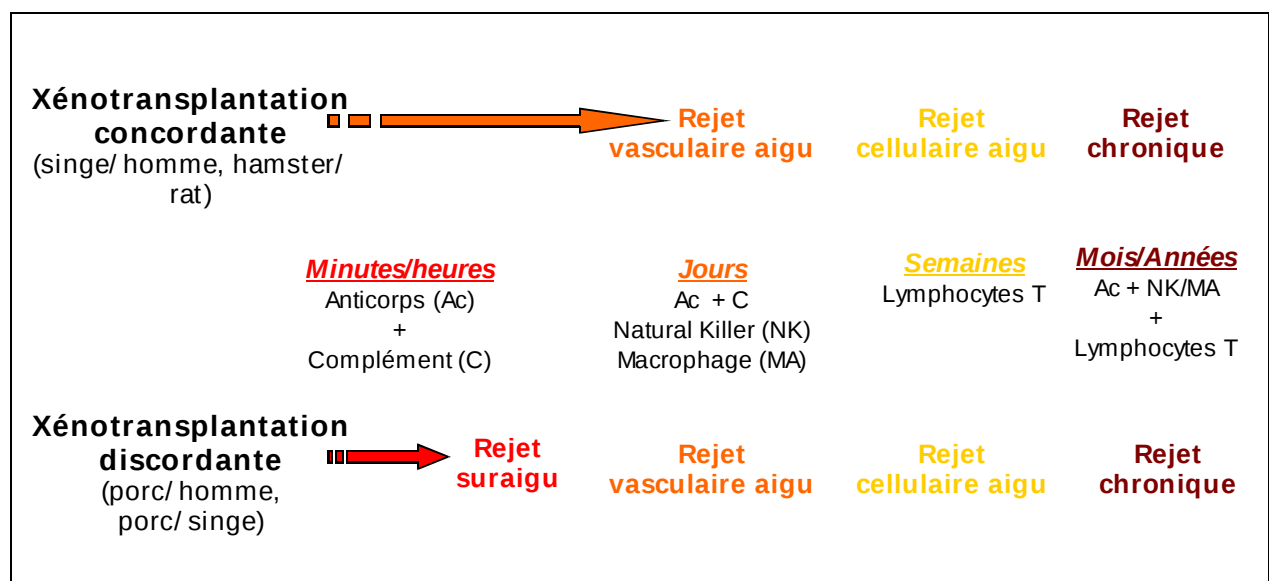
Il y a deux types de réponses immunitaires mises en jeu dans ces réactions de rejet :

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

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

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

Figure 23 Obstacles immunologiques de la xénotransplantation



B.4.1 Le rejet suraigu

Obstacles

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

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

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

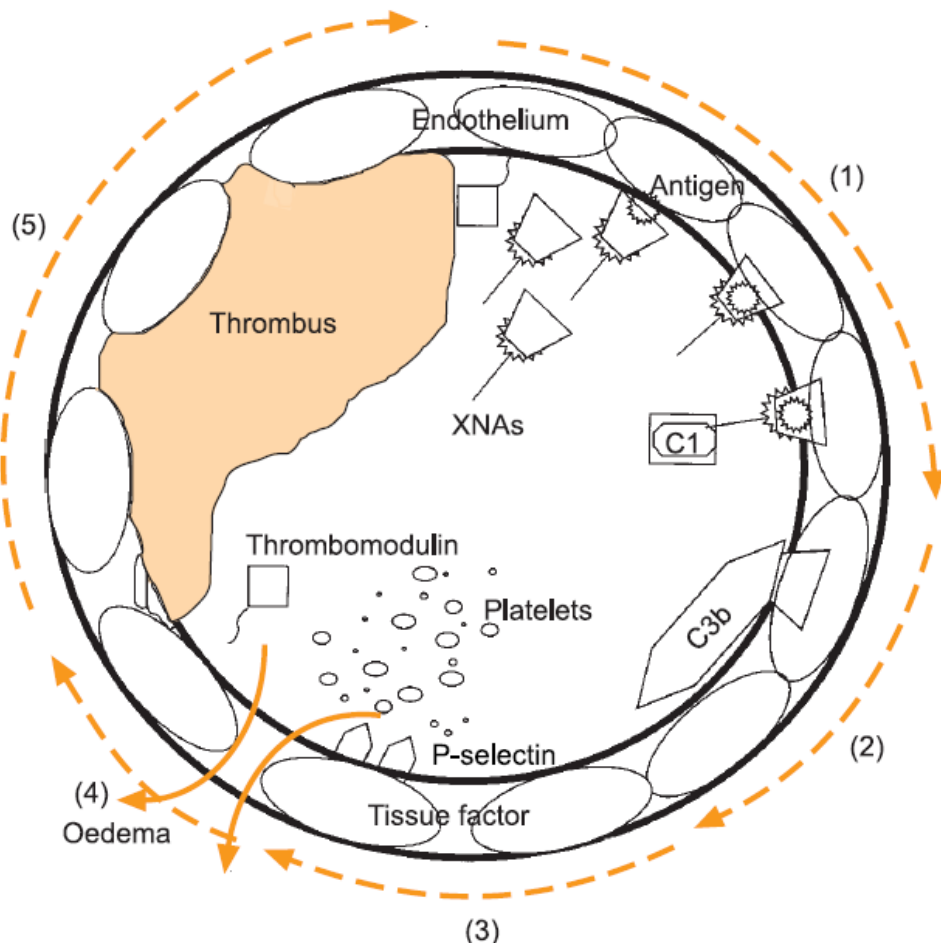
Primates	Homme	Absence d'épitopes Gal Présence d'anticorps anti-Gal Inactivation de l'α (1-3) GT
	Grands singes Chimpanzé et Bonobo 5 MA Gorille 7 MA Orang-outan 19 MA Gibbon 20 MA	
	Singes du Vieux Continent (Catarhiniens) 20-30 MA Macaque, Babouin	
	Singes du Nouveau Monde (Platyrhiniens) 30-40 MA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

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

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

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

Figure 24 Physiopathologie du rejet suraigu



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

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

Prévention

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

Modifications chez le receveur :

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

Modifications chez le donneur grâce aux techniques de transgénèse :

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

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

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

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

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



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

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



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

B.4.2 Rejet vasculaire aigu

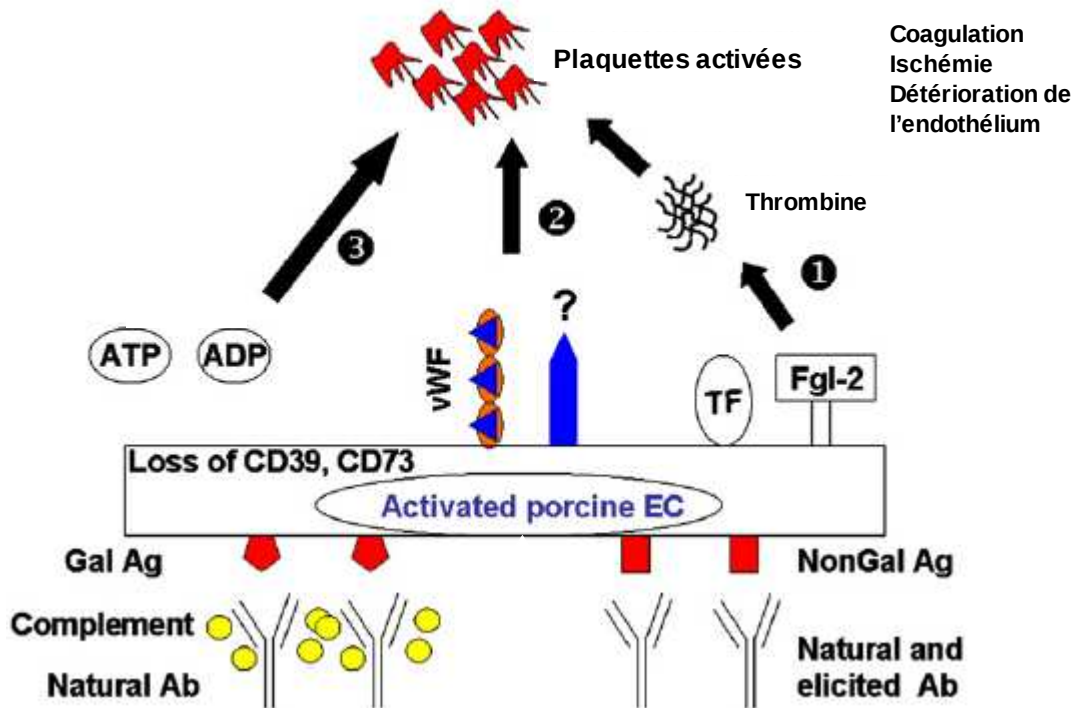
Si le rejet suraigu est évité, la greffe subit un rejet retardé : le rejet vasculaire aigu, au bout de quelques jours à quelques semaines. On parle de rejet vasculaire parce que les premiers anticorps formés par le receveur sont dirigés contre les cellules endothéliales (Fig.26). Les mécanismes immunitaires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

Le rejet vasculaire aigu mène à des thromboses vasculaires avec extravasation sanguine, œdème interstitiel et nécrose.

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

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

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



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

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

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

Ag: antigène, Ab: anticorps

Source : Lin C.C., Cooper D.K.C., Dorling A. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transplant Immunology* 21 (2002) 75-80.

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

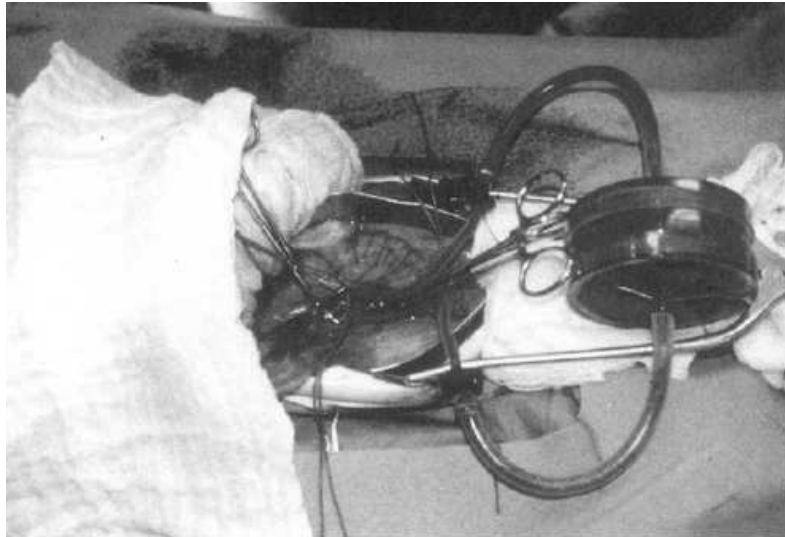
- CD39 (ecto-ADPase) : cible les plaquettes et possède une activité anti-inflammatoire
- la thrombomoduline : exprimée sur les cellules endothéliales, nécessaire à la génération de la protéine C qui est anticoagulante.
- le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) : nécessaire à la génération de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

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

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

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

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



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

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

B.4.3 Le rejet cellulaire

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

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

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

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

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

B.4.4 Rejet chronique

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

B.4.5 Induction de la tolérance au greffon

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

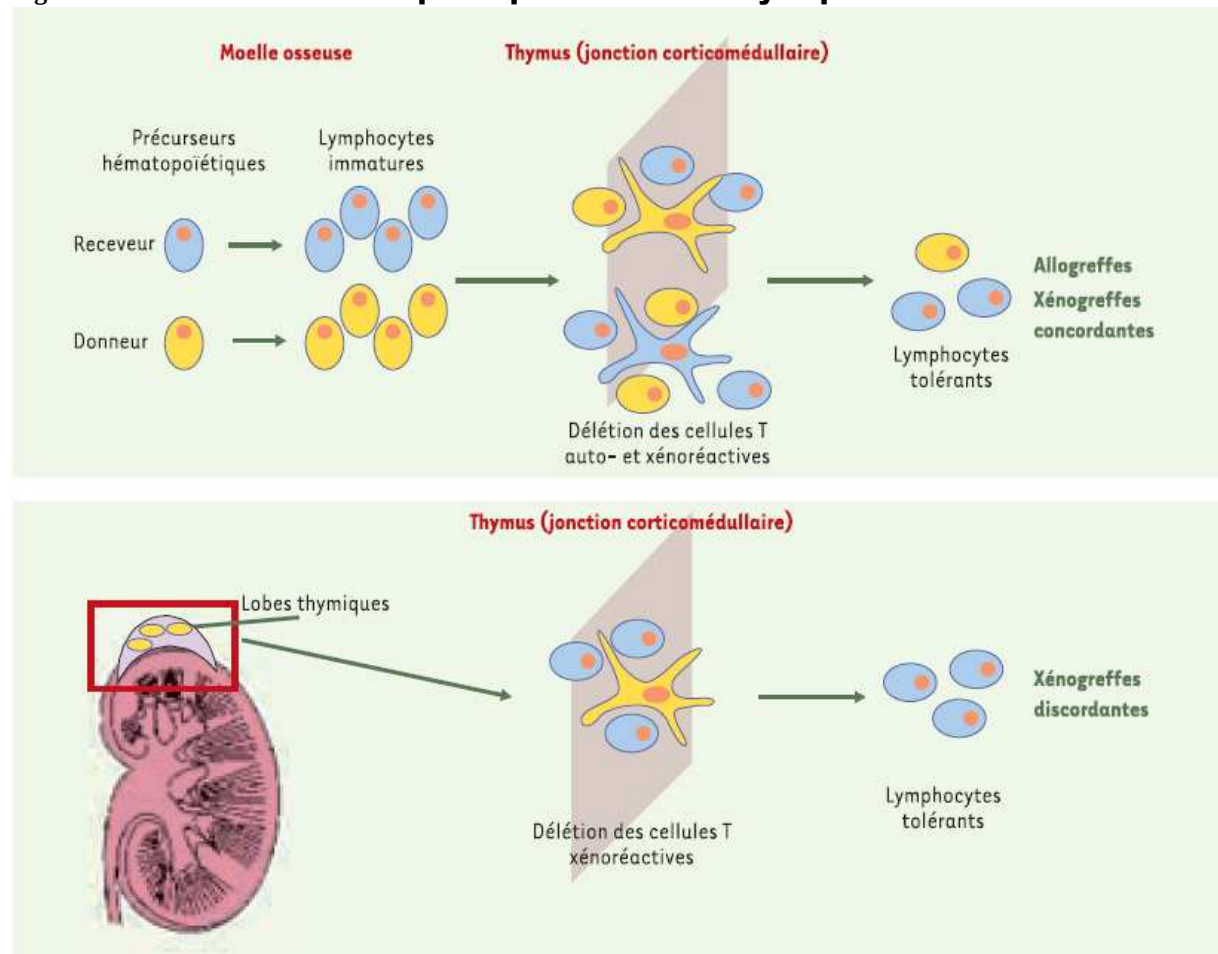
Création d'un chimérisme [47,173,242] Fig.27

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

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

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

Figure 27 Chimérisme hématopoïétique et délétion thymique



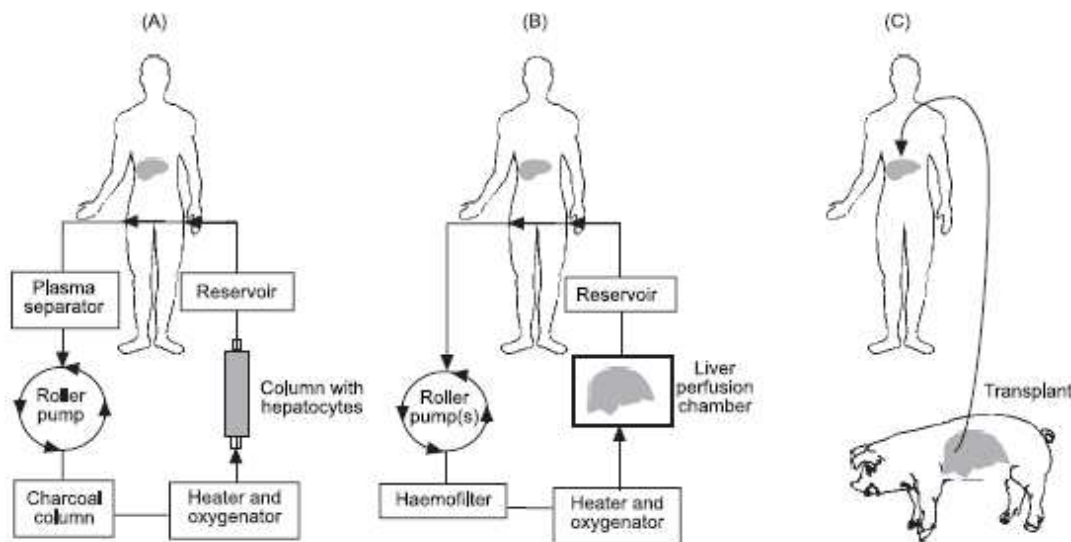
Chez les primates, une greffe de moelle osseuse du donneur, préalablement à la greffe, peut induire un chimérisme hématopoïétique et la création d'un environnement thymique permettant la délétion des cellules T alloréactives et xénoréactives. La greffe de fragments de thymus porcine sous la capsule rénale avant la greffe permet la re-création d'un thymus porcine vascularisé, qui opère cette délétion thymique sans chimérisme hématopoïétique (le jour de la greffe, c'est alors un « thymus-rein » qui est greffé).

Source : Seveno C., Fellous M., Ashton-Chess J., Soullillou J-P, Vanhove B. Les xénogreffes finiront-elles par être acceptées? Médecines/Sciences n° 3, vol. 21, mars 2005

.B.5. Techniques de xénotransplantation

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

Figure 28 Exemples de support ou remplacement xénogénique de la fonction du foie

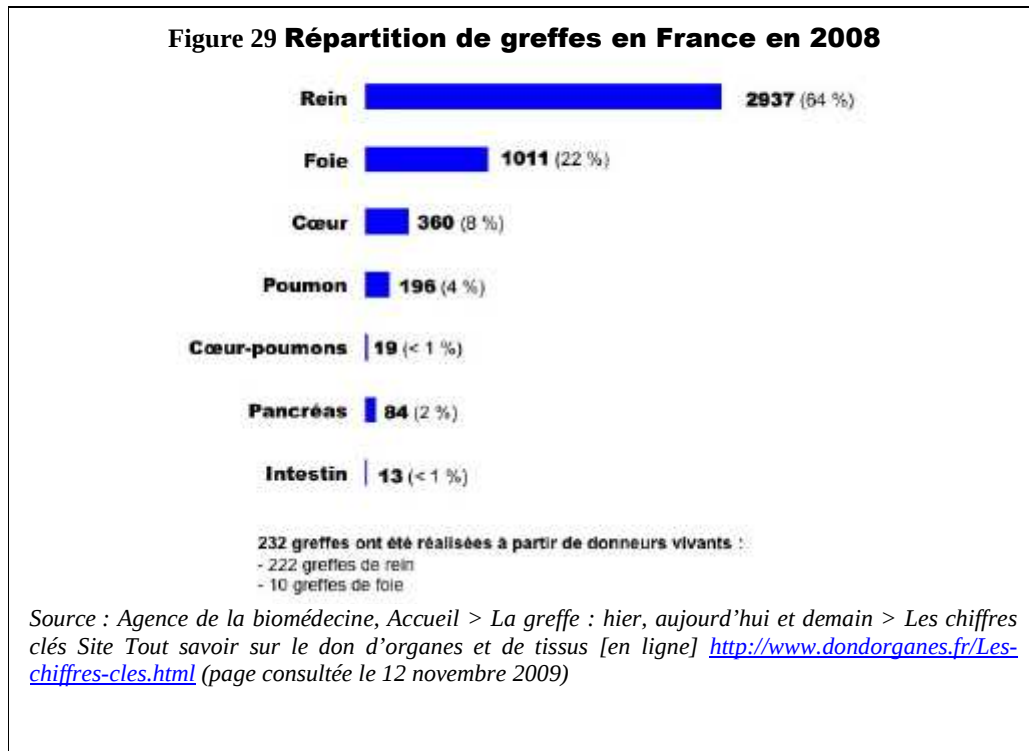


Pontage avec (A) un foie bioartificiel (hépatocytes porcins isolés) ou (B) un foie de porc par perfusion ex vivo en cas de déficience hépatique fulgurante (C) un foie de porc en remplacement permanent c'est-à-dire une transplantation, pour des patients ayant une déficience hépatique.

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

B.5.1 Xénotransplantation d'organes

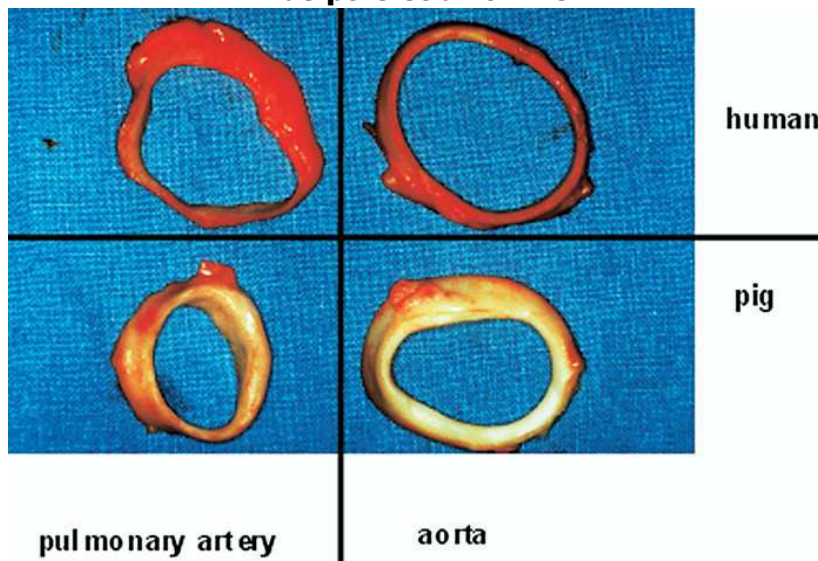
Comme le montre le graphique ci-dessous (Fig.29), les allogreffes humaines les plus pratiquées concernent le rein, le foie et le cœur. Les limites immunologiques des xéno greffes ayant été abordées, voici donc une revue des possibilités physiologiques et anatomiques de xénotransplantation de ces trois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



Xénotransplantation de cœur

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

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



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

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

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

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

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

Xénotransplantation de foie

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

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

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

Ces trois cas sont les seuls cas de xénotransplantation effectués depuis les années 1990.

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

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

Xénotransplantation de rein

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

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

Plusieurs hormones extrinsèques entrent en jeu :

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

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

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

Les hormones intrinsèques principales produites par le rein sont :

-la rénine : participe au contrôle de la pression sanguine

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^a Mean survival.

^b Longest survival among the groups.

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

B.5.2 Xénotransplantation de tissus et cellules

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

Transplantation de cellules médullaires surrénales

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

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

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

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

Xénotransplantation de cellules produisant un facteur de croissance neurotrophique

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

Xénotransplantation de neurones de porcs

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

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

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

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

Xénotransplantation d'îlots pancréatiques

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

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

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

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

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

Quelques essais chez l'homme sont rapportés :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B.5.3 Acceptation des xénogreffes

Acceptabilité de la xénogreffe

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1- Critères d'acceptabilité pour l'homme

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

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

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

3- Critères d'acceptabilité concernant la société :

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

4- Critères de sélection des patients :

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

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

Attitude du public

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

Australie

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

Canada

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

États-Unis

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

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

France

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

Allemagne

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

Suède

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

Royaume-Uni

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

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

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

.B.6. Bilan

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