

UTILISATION DES NOUVEAUX OUTILS DE BIOTECHNOLOGIE POUR LA XÉNOTRANSPLANTATION

USE OF NEW BIOTECHNOLOGY TOOLS FOR XENOTRANSPLANTATION

Par Geneviève JOLIVET⁽¹⁾

(Communication présentée le 3 Octobre 2019,
Manuscrit accepté le 9 Novembre 2019)

RÉSUMÉ

La xénotransplantation est une approche séduisante, tentée à de nombreuses reprises depuis plus d'un siècle, pour subvenir au manque d'organes ou de tissus humains pour les transplantations. Modifier génétiquement les tissus de donneurs de greffon de mammifères d'élevage, en particulier, est une des stratégies mises en œuvre afin de limiter le rejet par l'hôte. Cependant, un nombre considérable de gènes est impliqué dans les mécanismes de rejet. Ainsi, la production d'animaux génétiquement modifiés répondant aux critères nécessaires est très complexe. L'émergence d'outils performants de biotechnologie (comme l'outil CRISPR/Cas9) a redonné un nouveau souffle aux recherches dans ce domaine. Une abondante littérature existe qui fait le point sur les différentes approches et les tentatives en cours ou en prévision, utilisant soit des cellules et des tissus, soit des organes issus de ces animaux génétiquement modifiés.

Mots-clés : xénotransplantation, genome editing, crispr/cas9, éthique, activation du complément, retrovirus endogène.

ABSTRACT

Xenotransplantation is a seductive approach that has been tried many times for over a century in order to circumvent the lack of human organs or tissues for transplantation. Performing genetic alterations in the mammalian organs or tissues is one of the strategies implemented to limit rejection by the hosts. However, a considerable number of genes are involved in the mechanisms of tissue rejection and the production of genetically modified animals meeting the necessary criteria is rather complex. The emergence of powerful biotechnology tools (such as the CRISPR / Cas9 system) has opened new avenues to research in this area. An abundant literature exists which reviews the different approaches and current or planned attempts, using either cells and tissues, or organs from genetically modified animals.

Keywords: xenotransplantation, genome editing, crispr/cas9, ethics, complement activation, endogenous retrovirus.

INTRODUCTION

La transplantation d'organes est la seule issue possible pour assurer la survie de nombreux patients. Malheureusement, le nombre d'organes pouvant être transplantés est très inférieur aux besoins. Ainsi, en moyenne, sur la population mondiale, moins du tiers des patients en attente de greffe seront ainsi opérés et pourront être sauvés. Ces chiffres sont très variables selon les

pays, allant de plus de 35 par million d'habitants en Espagne, à moins de 0,6 donneurs en Chine, les variations étant parfois consécutives à des pratiques religieuses et traditionnelles difficiles à contourner (Pan *et al*, 2019). Cette pénurie d'organes entraîne parfois des trafics d'organes humains totalement inadmissibles. La xénotransplantation qui consiste à transplanter chez l'humain

(1) UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350, Jouy en Josas, France.
Courriel : genevieve.jolivet@inra.fr

des organes prélevés chez des animaux pourrait apporter des solutions significatives. Cependant, la xénotransplantation se heurte au problème majeur du rejet du greffon par l'hôte. De plus, il est nécessaire de transplanter un organe sain dépourvu d'agent pathogènes transmissibles. La stratégie qui consiste à utiliser des greffons issus d'animaux génétiquement modifiés capables d'être tolérés par l'hôte est à l'heure actuelle très sérieusement envisagée et de nombreuses expérimentations sur les animaux ont été entreprises dès qu'il a été possible de produire de tels animaux génétiquement modifiés.

LE PORC, UNE ESPÈCE DE CHOIX POUR LA XÉNOGREFFE

Dans cette stratégie, l'espèce animale donneuse d'organe doit répondre à divers critères : 1. pouvoir être génétiquement modifiée pour que le greffon soit toléré par l'hôte, 2. posséder des organes d'une taille compatible avec la taille humaine. Les primates sont éliminés de ce choix essentiellement pour des raisons éthiques. Le porc est en revanche un excellent candidat. En effet, la taille des organes est proche de la taille des organes humains et la physiologie du porc est proche de celle de l'humain en ce qui concerne de nombreuses fonctions. Enfin, la production de porcs génétiquement modifiés est non seulement possible mais aussi particulièrement efficace. Dans les années 90 cette production se faisait par addition de gène(s) (transgénèse additive) *via* la microinjection d'une solution d'ADN dans un des pronoyaux du zygote unicellulaire de porc (**Figure 1**). Cette manipulation était cependant assez difficile, le repérage des pronoyaux étant souvent impossible dans le cytoplasme du zygote, souvent très opaque chez cette espèce. Il fallait alors procéder à la centrifugation du zygote pour condenser les inclusions cytoplasmiques, ce qui permettait de révéler la position des pronoyaux et de pratiquer l'injection. La poursuite du développement de cet embryon était bien évidemment très compromise par toutes ces opérations. Un nombre important de travaux a été alors entrepris pour produire des porcs génétiquement modifiés pouvant donner des greffons (voir la revue de Carrington *et al*, 1997 et les citations incluses). La stratégie consistait à réduire voire supprimer la réponse immunitaire de l'hôte. Pour cela, il avait été montré que la sur-expression par le greffon de porc de protéines humaines connues pour leur activité inhibitrice de la réponse immunitaire permettait de limiter l'apparition du phénomène de rejet. Il s'agissait de protéines membranaires régulatrices de l'activation du complément comme CD35, CD46, CD55 ou DAF (decay accelerating factor), CD59, HRF.

LE CLONAGE SOMATIQUE PAR TRANSFERT DE NOYAU CHEZ LE PORC : UNE AVANCÉE SIGNIFICATIVE POUR LA PRODUCTION DE GREFFONS GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS

Depuis la fin des années 90, avec l'essor du clonage par transfert de noyau de cellules somatiques, l'introduction de modifications

ciblées dans le génome est devenue possible chez diverses espèces d'élevage chez lesquelles aucune cellule souche pluripotente ne pouvait être utilisée à cet effet (**Figure 2**). Chez le porc, la production d'animaux génétiquement modifiés par transfert de noyaux de cellules somatiques, elles-mêmes soumises à une modification génétique ciblée et sélectionnées pour la présence de cette modification est particulièrement efficace. C'est vraisemblablement une des raisons pour laquelle le porc est devenu une espèce de choix pour la production d'organes comme greffons potentiels pour l'humain. Grâce à ce nouvel outil, il devenait possible d'introduire un décalage du cadre de lecture dans la séquence du gène choisi et de provoquer ainsi l'arrêt de l'expression de ce gène. C'est à ce moment-là que de nouvelles stratégies ont été déployées dans le cadre de la xénotransplantation. Supprimer certains antigènes de surface était donc possible en supprimant l'expression d'enzymes responsables de la synthèse de ces antigènes. Une des premières cibles a été la suppression de l'antigène α 1,3-galactose, présent à la surface de toutes les cellules chez la plupart des mammifères mais pas chez les primates. L'expression du gène de l'enzyme responsable de la synthèse de cet antigène (gène GGTA1 pour α -1,3-galactosyltransferase) a donc été supprimée chez le porc et de nombreux essais de xénotransplantation ont alors été effectués à partir de greffons en provenance de porcs KO pour ce gène. Après de nombreux essais, des avancées notoires et spectaculaires ont été obtenues mais, dans l'ensemble,

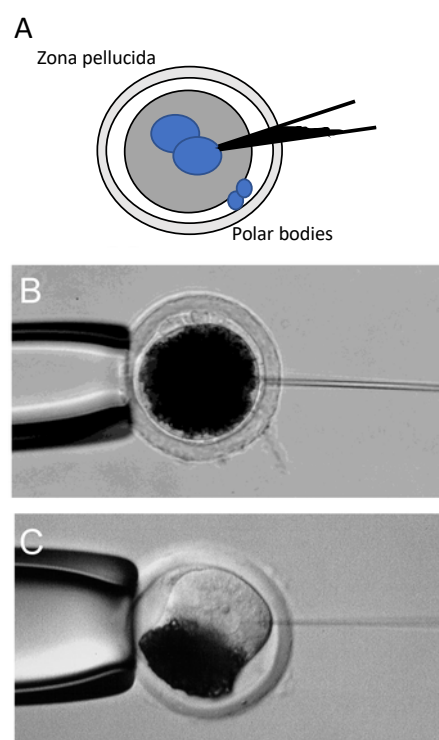
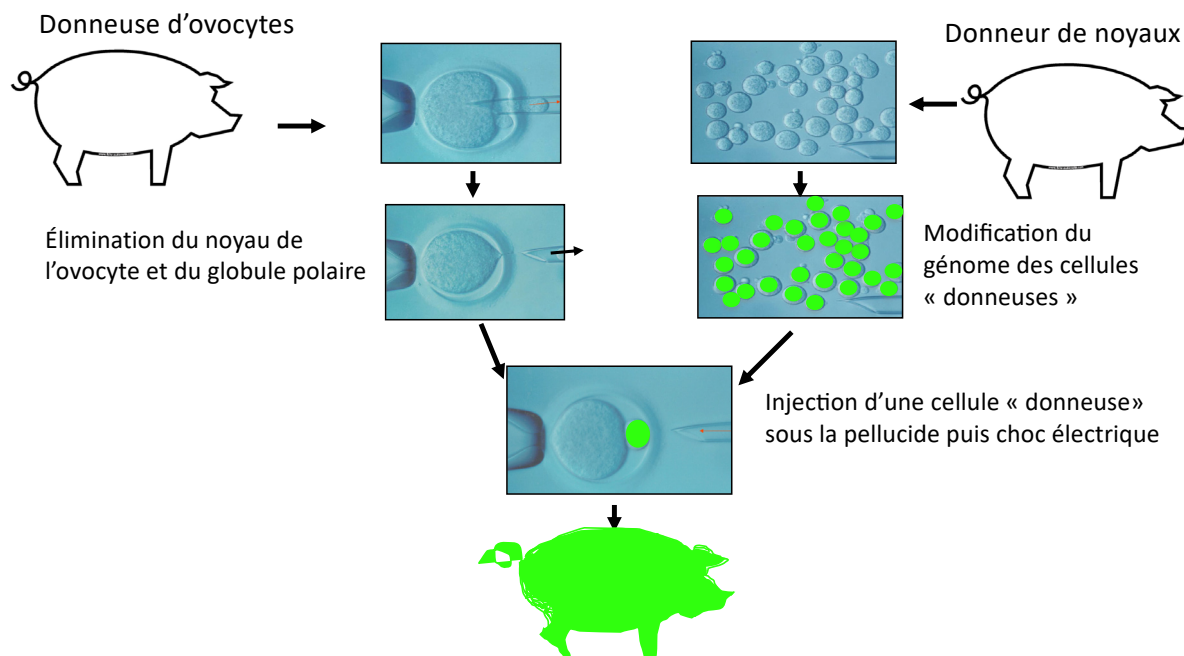


Figure 1 : Microinjection dans l'embryon unicellulaire de porc. A) schéma de la méthode d'injection classique dans le zygote unicellulaire avant la fusion des 2 pronoyaux. B) photographie du champ microscopique pour montrer l'opacité du cytoplasme de zygote porcin. C) après centrifugation du zygote, les inclusions cytoplasmiques sont concentrées dans un espace réduit du cytoplasme dévoilant ainsi la position des deux pronoyaux. D'après Hammer *et al.* (1995) et Garrels *et al.* (2011).

Modification du génome par le biais du clonage par transfert de noyau de cellule somatique



Très efficace chez le porc, les bovins...mais peu chez les autres espèces!



Figure 2 : Modification du génome par le biais du clonage par transfert de noyau de cellule somatique. Les ovocytes prélevés sur une femelle «donneuse» sont énucléés. Le cytoplasme reçoit alors le noyau d'une cellule «donneuse». Si cette cellule a été génétiquement modifiée, la modification génétique est automatiquement transmise à tous les animaux nés de cette manipulation.

les résultats n'étaient pas suffisants. Il était évident qu'il fallait cumuler toutes les stratégies, c'est-à-dire éliminer les antigènes de surface (en considérant d'autres antigènes que l' α -1,3-galactose) et sur-exprimer des protéines régulatrices de l'activation du complément (Cozzi *et al*, 2006).

LES APPORTS DES TECHNIQUES DE « GENOME EDITING »

Jusqu'à la fin de l'année 2006 les manipulations du génome du porc étaient possibles par les techniques classiques de transgénèse mais elles restaient extrêmement lourdes. C'est à partir des années 2007, avec la mise en œuvre des technologies de «*genome editing*», que les expérimentations ont fait un véritable bond en avant. L'utilisation d'endonucléases, produites «à façon» et capables de cibler un site unique du génome en produisant une coupure unique dans ce génome a permis d'augmenter l'efficacité de la recombinaison homologe, mécanisme à la base de la production d'animaux génétiquement KO pour un gène donné. Ainsi, les cellules «donneuses» du schéma de production de porc cloné et génétiquement modifié sont obtenues beaucoup plus facilement ; l'efficacité du clonage est alors nettement améliorée car l'efficacité de modification du génome des cellules est très

significativement augmentée ; simultanément toutes les durées de manipulation des cellules donneuses sont réduites ce qui contribue à augmenter le pourcentage de réussite du clonage. Le système le plus efficace est celui mettant en œuvre la protéine Cas9 couplée à un petit ARN nommé ARN guide. Ce complexe Cas9/gRNA se lie à la séquence choisie dans le génome et la protéine Cas9 clive la molécule d'ADN à ce niveau ; le système de réparation du génome de la cellule se met en route et cet enchaînement de clivages et réparations ne s'arrête que lorsque la réparation induit une erreur (insertion ou délétion de nucléotides), provoquant ainsi un défaut dans la séquence avec pour conséquence l'arrêt à ce point du fonctionnement normal du gène ciblé. La revue de Cowan et ses collaborateurs (Cowan *et al* 2019) décrit une explosion de modèles dédiés à la xénotransplantation essentiellement, mais pas uniquement, chez le porc.

LA XÉNOTRANSPLANTATION ET LA TRANSMISSION DE VIRUS ENDOGÈNES : UN PROBLÈME SANITAIRE MAJEUR

Ces nouvelles technologies ont également permis de proposer une solution pour résoudre le problème sanitaire lié à la xénotransplantation et la transmission possible d'agents patho-



gènes par le greffon (Cowan *et al*, 2019). Chez le porc, le génome est envahi d'un nombre important de copies de rétrovirus endogènes (PERVs), ces virus étant susceptibles d'infecter l'humain en cas de xéno greffe. Des stratégies d'élimination systématique du virus ont été mises en place, qui consistent à cibler, par le système CRISPR/Cas9, toutes les copies de rétrovirus intégrées dans les cellules donneuses du schéma de clonage. Plus précisément, c'est le gène de la reverse transcriptase virale qui est ciblé, supprimant ainsi toute possibilité de répllication du virus. A l'heure actuelle, la faisabilité de cette stratégie a été démontrée dans des cellules porcines en culture et l'analyse de porcs qui seraient *PERV* - est en cours. Aucune xéno greffe à partir de ces animaux n'a encore été décrite (Fishman 2018).

LES STRATÉGIES DU FUTUR ?

En 2017, une équipe japonaise a montré qu'il était possible de produire chez un rat un pancréas possédant le génome de souris (**Figure 3**) ; ce pancréas greffé chez une souris est resté fonctionnel pendant plus d'un an sans que la souris soit soumise à un traitement immunosuppresseur (Yamaguchi *et al*, 2017). Récemment, cette équipe a obtenu l'autorisation de l'état japonais de produire des chimères souris-homme, avec transfert dans des souris receveuses et développement jusqu'à 14,5 jours de gestation (Nature, 2019, doi: 10.1038/d41586-019-02275-3). L'équipe projette de

produire des chimères rat-homme, puis porc-homme avec arrêt de la manipulation pendant la vie foetale, le but étant de montrer la faisabilité et l'efficacité de la stratégie. L'article de Garry and Garry (Garry & Garry 2019) récapitule cette stratégie et en donne un schéma intégrant l'humain (**Figure 4**).

LES QUESTIONS DE SÉCURITÉ ET LES QUESTIONS ÉTHIQUES

La simplicité apparente, la facilité d'utilisation et l'efficacité de ces technologies ne doivent pas faire oublier les composantes de sécurité et de bien fondé moral. La note éditée dans Nature (Ledford, 2019) propose un ensemble de questions et réflexions dans ce domaine. La sécurité des techniques de «genome editing» est liée au caractère hasardeux de toute manipulation telles que le «*off-targeting*» ou effets indésirables sur des régions non ciblées du génome ; mais quel est le risque lié à l'utilisation d'organes issus d'animaux ? quelle durée pour les tests expérimentaux ? Le point final est donné à la question suivante : le monde, la population, chaque individu, est-il prêt à assumer toutes les conséquences de ces technologies ? Il est nécessaire que la Société soit mise au courant des avancées proposées par les scientifiques pour qu'un débat et une réflexion soient engagés sans masquer les différents aspects positifs et négatifs et sans obscurantisme ou opinions préconçues.

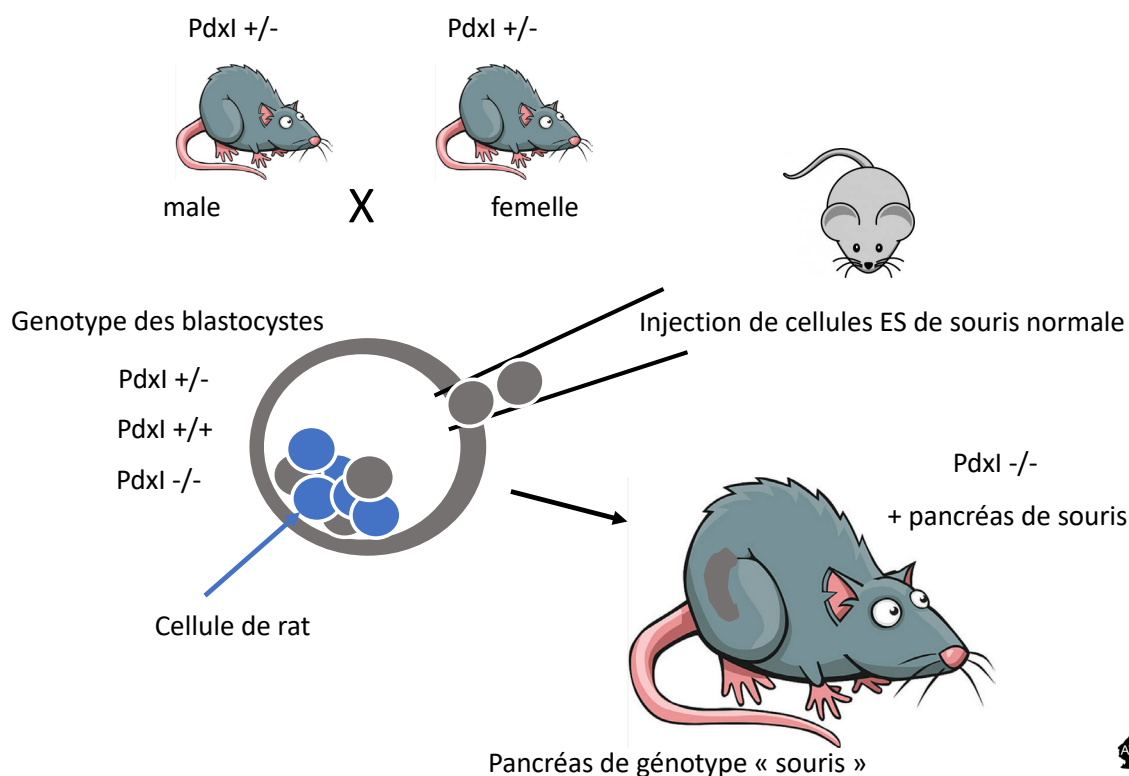


Figure 3 : Production de pancréas de souris par un rat. Des blastocystes de rat mutants hétérozygotes pour le gène *Pdx1* responsable de la différenciation du pancréas reçoivent par injection des cellules pluripotentes ES de souris, puis sont transférés dans les voies génitales d'une souris receveuse. Le génotype des rats est analysé quelques jours après leur naissance. Les rats *Pdx1* -/- qui survivent sont ceux chez qui les cellules ES de souris ont permis la différenciation d'un pancréas fonctionnel ; le génome de ce pancréas est celui de la souris donneuse de cellules ES.

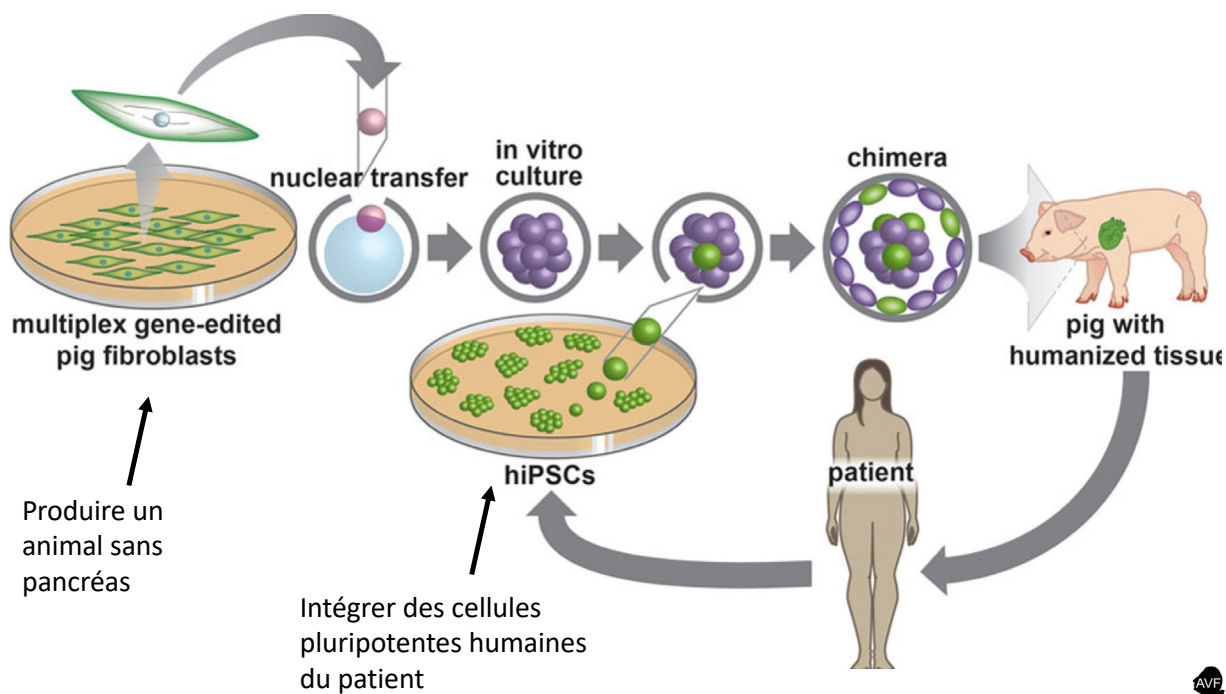


Figure 4 : Production d'organes humains par un porc. Dans le schéma proposé le pancréas est l'organe choisi. Le schéma démarre par la production d'un blastocyste de porc génétiquement modifié. Pour cela, des fibroblastes de porc sont modifiés par genome editing pour supprimer le fonctionnement d'un gène indispensable au développement du pancréas. Un blastocyste est constitué par transfert de noyau de ces fibroblastes déficients dans un ovocyte énucléé de porc. Après mise en culture, les blastocystes reçoivent par injection des cellules pluripotentes humaines dérivées du patient en attente de greffe de pancréas. Les embryons ainsi produits sont transférés chez une truie receveuse. Les petits qui naissent de cette manipulation et qui survivent sans traitement sont ceux chez lesquels les cellules pluripotentes ont permis la reconstitution d'un pancréas fonctionnel. Schémas d'après Garry et Garry (2019).

BIBLIOGRAPHIE

- Carrington CA, Richards AC, van den Bogaerde J, Tucker AW, Whit DJG. Complement activation : Its consequences, and blockade by gene transfer. *World J Surg* 1997; 21:907-912.
- Cowan PJ, Hawthorne WJ, Nottle MB. Xenogeneic transplantation and tolerance in the era of CRISPR-Cas9. *Curr Opin Organ Transplant* 2019; 24:5-11.
- Cozzi E, Bosio E, Seveso M, Vadori M, Ancona E. Xenotransplantation-current status and future perspectives. *Br Med Bull* 2006; 24:99-114.
- Fishman JA. Infectious disease risks in xenotransplantation. *Am J Transplant* 2018; 18:1857-1864.
- Garrels W, Mátés L, Holler S, Dalda A, Taylor U, Petersen B *et al.* Germline transgenic pigs by sleeping beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig Genome. *PLoS One* 2011; E23573.
- Garry DJ & Garry MG. Interspecies chimeras and the generation of humanized organs. *Circulation Research*. 2019; DOI:10.1161/CIRCRESAHA.118.314189.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall R, Bolt DJ, Ebert KM *et al.* Production of transgenic rabbits, sheeps and pigs by microinjection. *Nature* 1995; 315: 680-683.
- Pan D, Liu T, Lei T, Zhu H, Wang Y, Deng S. Progress in multiple genetically modified minipigs for xenotransplantation in China. *Xenotransplantation* 2019; 26:e12492.
- Yamaguchi T, Sato H, Kato-Ito M, Goto T, Hara H, Sanbo M *et al.* Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 2017; 542:191-196.