

Existe-t-il une place pour la thérapie génique en transplantation d'organes ?

P. GIANELLO

GIANELLO P. – Existe-t-il une place pour la thérapie génique en transplantation d'organes ?
Ann Chir, 1997, 51, n° 6, 593-604.

RÉSUMÉ : Les objectifs majeurs de la recherche en transplantation d'organes sont de pallier le manque d'organes, de diminuer les effets secondaires de l'immuno-suppression chronique et d'améliorer la survie des greffons à moyen et long terme. La xénotransplantation et l'induction d'une tolérance spécifique et permanente à une allogreffe représentent donc deux grands axes de recherche qui pourraient solutionner en partie les problèmes de la transplantation d'organes. Le but de cet article est d'évaluer le rôle que la thérapie génique pourrait jouer dans le développement de la xénotransplantation et de l'induction de la tolérance à une allogreffe. Une revue des différents vecteurs de gènes disponibles aujourd'hui ainsi que des voies d'administration de ces vecteurs spécifiques à la transplantation est réalisée. La place de la thérapie génique est ensuite évaluée dans le contexte de l'allo et la xénotransplantation. En allotransplantation, la transfection de certains gènes d'intérêt au niveau de l'organe à greffer avant l'implantation ou au niveau du système immunitaire du receveur est envisagée. La transfection au niveau de l'organe à greffer de gènes codant pour des cytokines immuno-modulantes (TGF- β , IL-4, IL-10), pour des molécules qui bloquent le second signal (CTLA4-Ig) ou des molécules qui sont responsables de l'apoptose (Fas/FasL) est abordée. Au niveau du système immunitaire du receveur, l'intérêt de la thérapie génique réside dans la transfection au niveau des cellules médullaires du receveur de gènes codant pour des molécules du système majeur d'histocompatibilité (HLA-DR, DQ). En xénotransplantation, la thérapie génique jouera certainement un rôle majeur dans le développement de porcs transgéniques qui exprimeront à la surface de l'endothélium de leur organes certaines molécules humaines qui régulent l'activité du complément (CD55, CD59) ou qui modifient l'expression des xéno-antigènes glycosylés (α -galactosyl) reconnus par les anticorps préformés.

MOTS-CLÉS : Transplantation. – Génétique.

Laboratoire de Chirurgie Expérimentale, Université Catholique de Louvain en Woluwe, avenue Hippocrate, 55, B-1200 BRUXELLES (Belgique).

GIANELLO P. – Is there any place for gene therapy in organ transplantation? (*In French*).
Ann Chir, 1997, 51, n° 6, 593-604.

SUMMARY : The major research objectives in organ transplantation are to palliate the lack of organs, to decrease the adverse effects of chronic immunosuppression and to improve medium-term and long-term graft survival. Xenotransplantation and induction of a permanent and specific tolerance to an allograft therefore represent two main lines of research which could partly resolve the problems of organ transplantation. The objective of this article is to evaluate the possible role of gene therapy in the development of xenotransplantation and induction of allograft tolerance. They review the various gene vectors currently available as well as the routes of administration of these vectors specific to transplantation. The place of gene therapy is then evaluated in the context of allo- and xenotransplantation. In allotransplantation, transfection of certain genes of interest into the transplant organ before implantation or into the recipient's immune system is considered. Transfection into the transplant organ of genes coding for immunomodulating cytokines (TGF- β , IL-4, IL-10, etc.), molecules which block the second signal (CTLA4-Ig) or molecules responsible for apoptosis (Fas/FasL) is discussed. The value of gene therapy in the recipient's immune system consists of transfection onto the recipient's bone marrow cells of genes coding for major histocompatibility system molecules (HLA-DR, DQ, etc.). In xenotransplantation, gene therapy will certainly play a major role in the development of transgenic pigs expressing, on the surface endothelium of their organs, certain human molecules which regulate the activity of complement (CD55, CD59, etc.) or which modify the expression of glycosylated xenoantigens (α -galactosyl) recognized by preformed antibodies.

KEY-WORDS : Transplantation. – Genetics.

Manuscrit reçu à la Rédaction le 26 juin 1996.

Accepté par les Comités de Lecture et de Rédaction le 14 avril 1997, après modifications.

INTRODUCTION

Depuis la découverte de la ciclosporine, la transplantation d'organes connaît un essor prodigieux et se présente aujourd'hui comme le traitement de choix parfois même le seul traitement de nombreuses maladies chroniques et aiguës. Les excellents résultats obtenus par la transplantation ont naturellement conduit à l'élargissement des indications médicales de greffes d'organes et étendu la limite d'âge pour les receveurs, ce qui entraîne actuellement un manque crucial d'organes difficile à surmonter. Cette situation est d'autant plus alarmante qu'en 1995, au sein d'Eurotransplant (regroupant le Benelux, l'Allemagne et l'Autriche), 13,6 %, et 9,4 % des patients en attente respectivement d'un cœur et d'un foie sont décédés avant de bénéficier d'une greffe. En plus du manque de donneurs d'organes, la survie à long terme des organes greffés représente le deuxième problème important à considérer en transplantation. En effet, si les résultats à 1 et à 5 ans sont excellents, les résultats à long terme sont encore insuffisants. A titre d'exemple, si la survie d'un greffon rénal est aujourd'hui de 95 % à un an et de 85 % à 5 ans, il apparaît qu'à 10 et 20 ans, la survie du greffon tombe respectivement à 40 et 30 % [1], pourcentage insuffisant si l'on tient compte du fait que beaucoup de patients en attente d'une greffe sont des enfants ou des adultes jeunes. Cette survie insuffisante trouve son origine dans le fait que le traitement immuno-suppresseur chronique utilisé actuellement chez tous les patients greffés ne permet pas de prévenir le rejet chronique qui est responsable d'une grande partie des pertes de greffons à long terme et que de plus, cette immuno-suppression induit elle-même des effets secondaires qui engendrent à long terme une morbidité et une mortalité importante.

Les objectifs majeurs de la recherche clinique, appliquée et fondamentale en transplantation d'organes sont dès lors (1) de pallier au manque d'organes – et il semble que la xénotransplantation (greffe entre espèces différentes) pourrait représenter une des solutions à ce problème – et (2) de diminuer les effets secondaires de l'immuno-suppression chronique soit en augmentant sa spécificité, soit en l'utilisant de manière transitoire dans le but d'induire une tolérance spécifique à l'organe greffé. Si les recherches dans le domaine du rejet chronique stagnent par manque de modèles expérimentaux, celles qui s'attachent à induire la tolérance spécifique et permanente d'une allogreffe progressent favorablement grâce à une meilleure connaissance de l'immunobiologie. L'utilisation de protocoles capables d'assurer cette tolérance spécifique et permanente pourrait ainsi changer la face de la transplantation clinique.

La thérapie génique pourrait jouer un rôle majeur dans le développement des techniques d'induction de la tolérance à une greffe allo ou xénogénique.

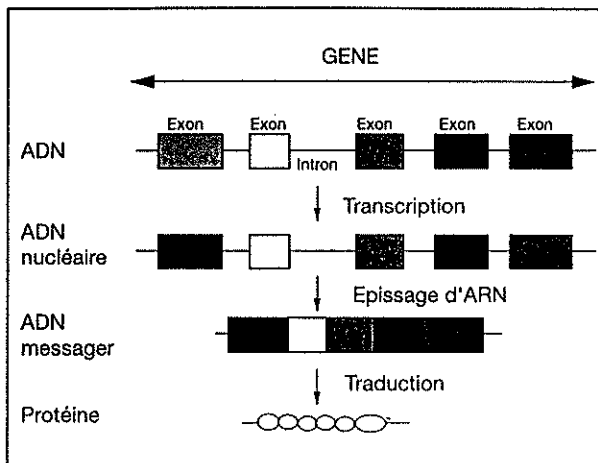


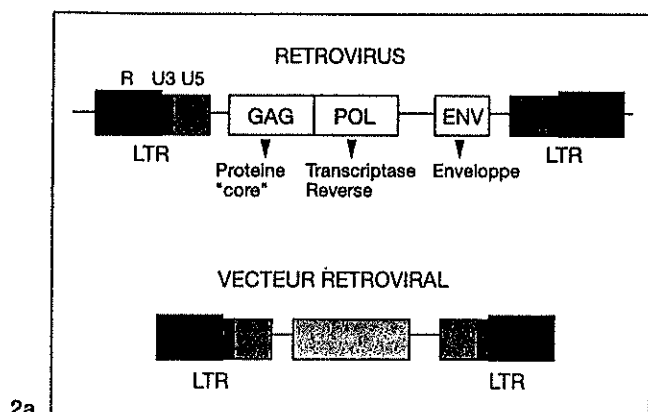
Fig. 1. – Synthèse d'une protéine suite à des phénomènes de transcription, d'épissage de l'ARN et de traduction de l'ADN.

Fig. 1. – Synthesis of a protein following phenomena of transcription, RNA splicing and DNA translation.

BUT DE LA THÉRAPIE GÉNÉRIQUE

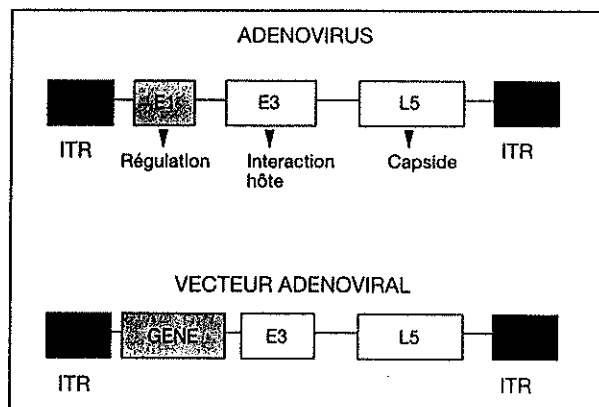
La thérapie génique a comme but essentiel de corriger un déficit génétique en remplaçant un gène manquant ou muté par un gène intact. C'est ainsi que dans le cas de la mucoviscidose, a été identifié le gène qui code pour une protéine régulatrice appelée CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), normalement responsable du transport d'ions Chlorés (Cl^-) à la surface de l'épithélium respiratoire. Cette protéine régulatrice est déficiente car le gène responsable de sa synthèse a subi une mutation irréversible [2-5]. Dans cette indication, la thérapie génique tente de corriger le déficit génétique par l'administration du gène «intact» de la CFTR dans l'organisme et en particulier au niveau du système respiratoire. Le but final de la thérapie génique est donc de transférer un gène pour assurer la production dans l'organisme d'une protéine, d'une enzyme ou d'un médiateur biologique qui aura l'effet biologique recherché (fig. 1).

Dans le contexte de la transplantation d'organes, le rôle de la thérapie génique serait plutôt d'ajouter un gène, soit au niveau de l'organe à greffer dans le but de prévenir le rejet, soit au niveau du système immunitaire du futur receveur dans le but d'induire une tolérance spécifique et définitive à l'allogreffe, soit encore, dans le cas des xénotreffes, d'introduire au niveau de l'embryon d'un animal un gène humain de manière à rendre les organes de cet animal plus acceptables par l'homme.



2a

Fig. 2. - a) Comparaison entre un vecteur rétroviral et le rétrovirus «sauvage». Les terminaisons LTR, essentielles à l'intégration du matériel génétique dans le génome de la cellule cible sont maintenues au niveau du vecteur alors que les séquences «GAG», permettant la synthèse de protéines structurales, «POL», responsable de la synthèse de l'enzyme «Transcriptase Reverse» et «ENV», responsable de la synthèse de l'enveloppe du virus ont été éliminées. Le gène à transfecter par le vecteur est inséré entre les terminaisons LTR. b) Comparaison entre un vecteur adénoviral et l'adénovirus «sauvage». La région E1 qui contrôle les autres gènes de l'adénovirus a été éliminée au niveau du vecteur adénoviral alors que les séquences E3 responsable de l'interaction du virus avec l'hôte et L5 responsable de la synthèse de la capside sont maintenues car ces séquences n'interviennent pas dans la réplication virale.



2b

Fig. 2. - a) Comparaison entre un vecteur rétroviral et le «wild» rétrovirus. The LTR terminations, essential to integration of the genetic material into the genome of the target cell, are maintained in the vector, while «GAG» sequences, allowing the synthesis of structural proteins, «POL» responsible for the synthesis of the «Reverse Transcriptase» enzyme, and «ENV», responsible for the synthesis of virus envelope have been eliminated. The gene to be transfected by the vector is inserted between the LTR terminations. b) Comparaison entre un adénoviral vecteur et le «wild» adénovirus. The E1 region, which controls the other genes of the adenovirus, has been eliminated from the adenoviral vector, while E3 sequences responsible for interaction of the virus with the host and L5 responsible for synthesis of the capsid have been maintained because these sequences are not involved in viral replication.

MÉCANISME

D'INTÉGRATION DU GÈNE, VECTEUR ET PROMOTEUR

L'intégration du gène qui nous intéresse au sein de la cellule, de l'organe ou de l'organisme dans son entier nécessite «un vecteur» capable de véhiculer le nouveau gène au niveau du noyau de la cellule cible. Naturellement, les virus possèdent tous les outils biologiques nécessaires à l'intégration de leur matériel génétique dans une cellule hôte et constituent de ce fait un vecteur idéal.

■ Vecteurs

Vecteur viral

Les virus s'attachent à la surface des cellules probablement grâce à une molécule d'adhésion de la famille des «intégrines». Une fois attaché à la membrane cellulaire, le virus injecte dans le cytoplasme de la cellule son matériel génétique qui lui permettra de se répli-

quer, de synthétiser son enveloppe ou de réguler certains de ses gènes. Suivant les types de virus, le matériel génétique est constitué d'ARN ou d'ADN et on distingue ainsi les vecteurs viraux utilisant respectivement un rétrovirus ou un adénovirus (et/ou virus associés). Il est essentiel de se rappeler que ce que l'on désigne par «vecteur viral» est uniquement constitué des éléments génétiques essentiels à l'intégration du virus à l'intérieur de la cellule, donc débarrassé des éléments qui assurent la réplication et le pouvoir infectieux du virus «sauvage».

Vecteur rétroviral

Le matériel génétique d'un rétrovirus est formé d'ARN qui après intégration du virus dans la cellule est transcrit en ADN correspondant. Parmi les gènes importants d'un rétrovirus, certains sont responsables de la synthèse de protéines structurales, d'enzymes protéolytiques, d'une enzyme appelée transcriptase reverse et de protéines nécessaires à la constitution de l'enveloppe du virus. En outre, le génome du virus est composé de terminaisons appelées LTR (Long Terminal Repeat) qui sont essentielles à l'intégration du virus dans le génome de la cellule. Le vecteur rétroviral sera donc comme illustré par la figure 2a,

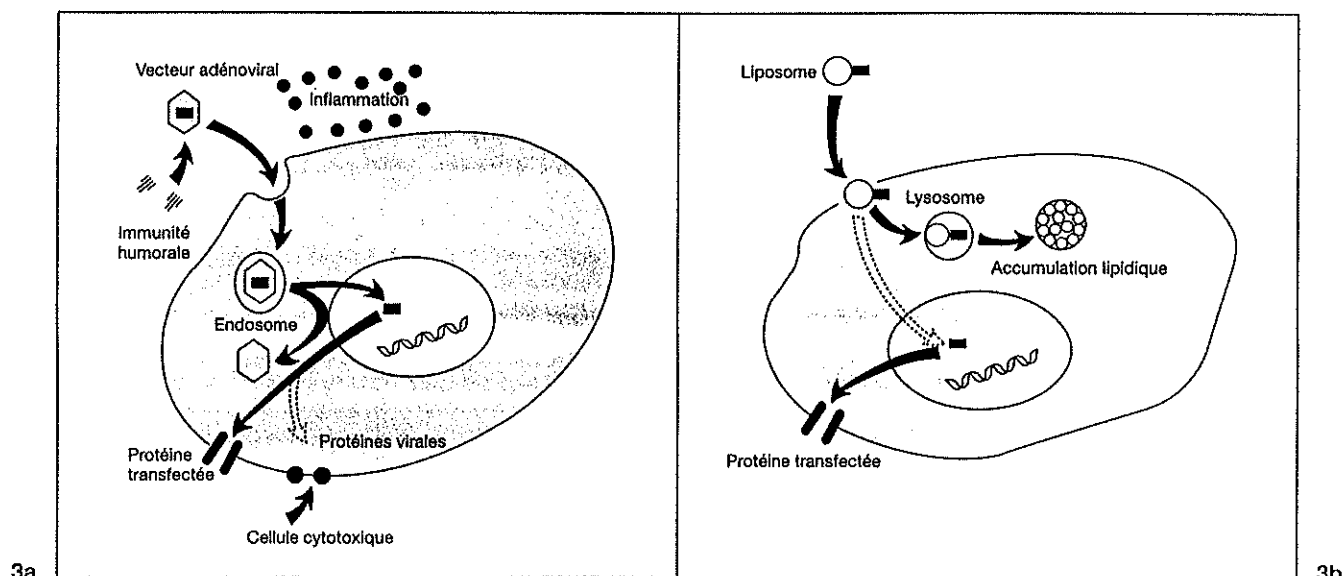


Fig. 3. – a) Réaction immunitaire à un vecteur adénoviral. Outre une réaction inflammatoire, le vecteur viral peut déclencher une réponse immunitaire humorale. De plus, si la cellule transfectée exprime à sa surface des protéines virales en plus de la protéine transfectée, elle devient la cible d'une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique. b) En comparaison, un liposome cationique ne déclenchera pas de réponse immunitaire inflammatoire.

Fig. 3. – a) Immune reaction to an adenoviral vector. In addition to an inflammatory reaction, the viral vector can also trigger a humoral immune response. If the transfected cell expresses viral proteins on its surface, in addition to the transfected protein, it also becomes the target of a cell-mediated cytotoxic immune response. b) In comparison, a cationic liposome will not trigger an inflammatory immune response.

débarassé de toutes les séquences génétiques responsables de la réplication du virus (*gag/pol/env*), alors que les terminaisons LTR nécessaires à l'intégration du matériel génétique dans la cellule seront conservées. Le gène que l'on veut transfecter sera inséré entre ces terminaisons LTR [6, 7]. Parmi les caractéristiques principales d'un vecteur rétroviral, il faut se rappeler que celui-ci s'intègre dans le génome de la cellule et que dès lors, la multiplication du vecteur et donc du gène d'intérêt ne se réalise que lorsque la cellule hôte se divise. Cette caractéristique permet bien sûr d'obtenir un rendement de transfection du nouveau gène qui est élevé et de longue durée mais qui est limité aux cellules qui se divisent fréquemment. L'inconvénient majeur du vecteur rétroviral est qu'à tout moment, il peut s'intégrer « au hasard » dans des séquences du génome de l'hôte interrompant ainsi un gène normal, ce qui provoque alors une mutation génétique ou peut en s'intégrant dans le génome, activer des oncogènes avec les conséquences carcinologiques que l'on imagine.

Vecteur à ADN [adénovirus et virus associés (herpès virus simplex, parvovirus)]

Pour éviter le risque de mutation génétique ou d'activation d'oncogènes en utilisant un vecteur rétroviral, d'autres virus qui ne s'intègrent pas dans le

génome ont été étudiés. Les adénovirus ont un matériel génétique constitué d'ADN codant pour des protéines qui assurent l'interaction avec l'hôte (région E3), la synthèse de la capsid (région L5) et surtout, la région appelée E1 qui régule la plupart des autres gènes. Les séquences appelées ITR (Inverted Terminal Repeat) sont quant à elles nécessaires à la réplication et l'intégration du virus dans le noyau de la cellule hôte [8]. Le vecteur adénoviral est débarrassé principalement de la séquence E1 qui régule les autres gènes alors qu'en théorie, les autres séquences peuvent être maintenues sans danger (fig. 2b). La caractéristique principale d'un vecteur adénoviral est de ne pas s'intégrer dans le génome de la cellule mais de fonctionner de manière autonome dans le noyau de celle-ci (épichromosomal). Ce type de vecteur adénoviral n'est donc en théorie pas mutagène et il peut induire la transfection d'un gène tant dans les cellules qui se divisent que dans celles qui ne se divisent pas. Cependant, la survie de ce type de vecteur adénoviral est transitoire et il sera nécessaire de l'injecter à plusieurs reprises pour pallier son effet temporaire.

L'inconvénient majeur commun aux vecteurs viraux est la réaction inflammatoire et la réponse humorale (fig. 3a). De plus, comme le vecteur viral n'est pas totalement débarrassé de ses constituants génétiques, il peut entraîner l'expression de protéines virales à la

surface de la cellule transfectée qui induisent alors une réponse immunitaire cellulaire de type cytotoxique capable de détruire la cellule hôte [9, 10].

Même si les vecteurs viraux semblent représenter la solution idéale pour véhiculer un nouveau gène à l'intérieur de la cellule cible, les réactions inflammatoires et immunologiques qu'ils peuvent entraîner poussent à rechercher les moyens de purifier au maximum ces vecteurs viraux en les débarrassant des séquences génétiques inutiles ou à trouver d'autre type de vecteurs moins immunogènes mais aussi efficaces [10, 11].

Vecteur non viral

De nombreuses méthodes ont été étudiées pour la transfection de gène *in vitro*, mais nous ne mentionnons ici que les techniques qui sont applicables *in vivo*.

De l'ADN purifié a par exemple été administré directement dans différents tissus, mais le rendement de transfection et le niveau d'expression du gène sont relativement décevants et aléatoires. Une autre alternative consiste à utiliser des liposomes cationiques comme transporteurs de gènes et cette méthode est la plus utilisée en thérapie génique humaine aujourd'hui compte tenu de son caractère dénué d'effets secondaires majeurs [11]. Les liposomes s'intègrent facilement au niveau de la membrane cellulaire lipidique et peuvent ainsi véhiculer dans la cellule cible un fragment d'ADN. Ce type de vecteur a l'avantage considérable de ne provoquer ni réponse inflammatoire, ni réponse immunologique et de ne pas s'intégrer au génome (fig. 3b). La limitation actuelle de l'utilisation des liposomes cationiques comme véhicules de gènes est néanmoins son rendement faible [10], car le fragment d'ADN attaché à la membrane externe du liposome représente une cible facile pour les enzymes protéolytiques sanguines lorsque ces liposomes sont injectés par voie intraveineuse. Ce facteur limitant peut néanmoins être contourné en encapsulant le fragment d'ADN à l'intérieur du liposome lui-même. En utilisant cette technique d'encapsulation, des résultats préliminaires récents ont rapportés des succès dans différents modèles expérimentaux et notamment chez la souris, où l'expression du gène humain du facteur IX de la coagulation a été obtenu pendant 6-8 jours [12]. Dans la mesure où les liposomes sont rapidement attaqués à l'intérieur de la cellule par des enzymes lysosomiales qui dégradent aussi le fragment d'ADN transporté, ces liposomes peuvent être couplés à des agents qui contrecarrent l'action des lysosomes et permettent donc d'améliorer le rendement de transfection. Un traitement par injection systémique de colchicine ou de chloroquine peut également diminuer de manière similaire l'activité des lysosomes et améliorer le niveau de transfection génique. D'autres approches utilisant des « ligands » particuliers pour certains tissus ont aussi été étudiés, comme les asialoglycopro-

téines capables de délivrer des gènes dans le foie via le récepteur d'asialoglycoprotéine hépato-spécifique [12]. Le développement des techniques de transfection de gène par des vecteurs non-viraux continuera donc à se développer parallèlement aux techniques de purification de vecteurs viraux. Leur utilisation en clinique humaine est déjà d'application du fait de son caractère inoffensif.

■ Promoteurs et régulateurs

Pour assurer une transfection optimale du gène d'intérêt au niveau d'un tissu en particulier avec un vecteur viral, on utilise ce que l'on appelle « un promoteur » qui est en quelque sorte un régulateur de l'expression du gène. Ce promoteur permet en effet d'enclencher, d'inhiber ou de moduler l'expression d'un gène. C'est ainsi que dans le contexte de la transplantation d'organes, il serait important d'assurer l'expression maximale d'un gène au niveau de l'endothélium vasculaire car ce tissu représente la première surface de contact entre le receveur et le donneur. Pour y parvenir, il est possible de faire précéder le gène que l'on veut introduire au niveau de l'endothélium vasculaire, d'un promoteur comme le facteur Von Willebrand ou la pré-proendothéline, des molécules que l'on retrouve exprimées essentiellement au niveau de l'endothélium vasculaire. De la même manière, pour obtenir l'expression d'un gène nouveau au niveau du thymus (un organe essentiel dans l'induction de la tolérance aux antigènes du « soi » mais aussi aux allo antigènes) il serait possible d'utiliser un promoteur similaire au promoteur de la molécule *P56^{kk}* qui assurera l'expression préférentielle du nouveau gène au niveau des cellules thymiques [13].

On peut également modifier l'expression d'un gène en agissant sur différents régulateurs. On sait, en effet, que les promoteurs des gènes sont régulés par un ensemble complexe d'interactions protéiques. Il est dès lors concevable de réaliser des constructs génétiques dont le promoteur est sensible à la présence d'une molécule chimique particulière. Ainsi, la possibilité de faire varier l'expression d'un gène en fonction de la présence ou de l'absence de tétracycline a été récemment rapportée [14, 15]. Dans le contexte de la transplantation d'organes, il serait possible de cette façon, de transfecter l'organe à greffer avec un gène qui code pour la synthèse d'une cytokine immunomodulatrice sous le contrôle de la tétracycline, puisque l'expression de cette cytokine n'est pas nécessaire en permanence. En fonction du besoin, on pourrait alors activer ou inhiber le gène transfecté « *in vivo* » par la seule administration de doses tout à fait infra-thérapeutiques de tétracycline. En pratique clinique, lorsque des signes biologiques ou cliniques de rejet sont détectés chez un patient greffé, on lui administre des doses importantes de cortisone ou

d'autres immuno-suppresseurs pour traiter le rejet. Si l'organe greffé a préalablement été transfecté avec un gène sous le contrôle par exemple de la tétracycline, le traitement du rejet consisterait alors non plus en l'administration de fortes doses de cortisone, mais bien de doses infra-thérapeutiques de tétracycline qui enclencheront alors au niveau de l'organe greffé une production importante de la cytokine capable de moduler ou d'inhiber la réaction de rejet.

■ Voies d'administrations spécifiques à la transplantation

Au niveau de l'organe à greffer lui-même

Dans le contexte de la transplantation d'organes, la situation est particulièrement favorable car l'organe à greffer est disponible durant la phase de conservation qui dure souvent plusieurs heures. L'administration d'un vecteur véhiculant le gène qui nous intéresse par voie intravasculaire est possible en perfusant « *ex vivo* » l'organe à greffer avec une solution à 4°C. Il a été montré que la perfusion à 4°C d'une solution de conservation contenant un vecteur adénoviral qui exprime le gène d'une protéine bactérienne (β -galactosidase) permet la transfection de ce gène dans des hépatocytes « *in vitro* » ou dans un foie de rat « *in vivo* » [16-18]. L'expression du gène augmente avec le temps d'exposition de l'organe, même à 4°C, mais la détection de la protéine synthétisée est déjà tout à fait significative dès la première heure de mise en contact à 4°C entre l'adénovirus et l'organe à greffer. Nous avons étudié la possibilité de transfecter ce même gène de la β -galactosidase au niveau de cellules endothéliales porcines en culture en utilisant un vecteur adénoviral. Après une heure de contact entre les cellules endothéliales et le vecteur adénoviral à 4°C, il était possible de détecter, dès le lendemain, la synthèse de galactosidase dans plus de 80 % des cellules endothéliales porcines (résultats préliminaires non encore publiés). L'étape suivante sera bien sûr de permettre la transfection de ce même gène au niveau de l'endothélium d'un organe entier (foie et rein). On peut aussi transfecter le gène d'intérêt en injectant directement le vecteur viral dans le parenchyme de l'organe, mais cette technique n'assure pas la production homogène de la protéine recherchée car il est inconcevable de réaliser des centaines de ponction dans le parenchyme d'un organe à greffer.

Puisque les cellules d'un organe vascularisé comme le rein, le cœur ou le foie ne se divisent pas en permanence, seul un vecteur de type adénoviral ou non-viral pourra être utilisé pour transfecter un gène dans ce type d'organe. De plus, manipuler génétiquement l'organe à greffer pendant la période de conservation est la seule possibilité d'application de la thérapie génique en cas de greffes cadavériques puisque le receveur est connu en dernière minute et que l'on ne

dispose que de quelques heures pour réaliser la greffe. Par contre, les greffes à partir de donneurs vivants, permettent de manipuler génétiquement les cellules du système immunitaire du futur receveur qui est connu plusieurs semaines avant la greffe.

Au niveau du système immunitaire du receveur

Dans le cas de greffes à donneur vivant, il est envisageable de prélever des cellules de la moelle osseuse du futur receveur pour les transfecter avec un gène du donneur, ceci permettrait peut-être d'induire chez le receveur une tolérance spécifique aux antigènes du futur donneur. De nombreux protocoles d'induction de tolérance ont en effet démontré que la présentation d'un antigène d'histocompatibilité du futur donneur (sous forme de cellules sanguines, lymphoïdes ou parenchymateuses...) peut sous certaines conditions induire chez le receveur une tolérance spécifique et définitive à cet allo-antigène [19-24]. Il semble donc que l'on puisse théoriquement induire une tolérance définitive à une allogreffe en transfectant le gène d'une molécule d'histocompatibilité du futur donneur au niveau des cellules médullaires osseuses, des thymocytes ou des cellules dendritiques du receveur. Ce dernier exprimera alors sur un certain pourcentage de ses propres cellules, le nouvel antigène d'histocompatibilité qu'il va rencontrer ultérieurement sur l'organe greffé venant du même donneur.

Au niveau de l'embryon d'un animal

Une dernière voie d'administration, spécifique à la transplantation, trouve son application dans le contexte des xéno greffes. Il est en effet possible dans ce cas de manipuler le futur donneur au stade de l'embryon. L'ADN d'un gène peut-être directement injecté dans une cellule embryonnaire animale par microponction. Une partie de la progéniture exprimera alors le nouveau gène et par sélections successives, l'expression de ce gène sera augmentée en croisant les animaux pour obtenir finalement des animaux homozygotes pour ce nouveau gène.

APPLICATIONS

DE LA THÉRAPIE GÉNÉRIQUE

■ Allotransplantation

Au niveau de l'organe à greffer

Transfection du gène responsable de la synthèse de certaines cytokines : IL-10, IL-4, TGF- β 1

Pour diminuer les effets secondaires de l'immunosuppression chronique, on peut transfecter au niveau de l'organe, le gène responsable de la synthèse d'une molécule capable de moduler ou d'inhiber la réponse

immunitaire de rejet. Depuis quelques années on sait en effet qu'il existe deux types de lymphocytes T auxiliaires qui se différencient uniquement par les cytokines qu'ils produisent. Les lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Ta1) produisent préférentiellement de l'Interleukine-2, de l'Interféron- γ , ou du TNF (Tumor Necrosis Factor). Ces différentes cytokines activent les macrophages et sont impliquées dans la réponse immune anti-virale ou dans la réaction d'hypersensibilité. Les lymphocytes Ta1 sont également identifiés en grande quantité dans les greffes d'organes en cours de rejet [25]. Parallèlement, les lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Ta2) produisent des cytokines telles que l'Interleukine-4, -5, -6 et -10 qui sont destinées à promouvoir la réponse humorale [26]. Une production préférentielle de cytokines de type Ta2 est souvent détectée au niveau des greffes d'organes qui sont tolérées de manière définitive [27]. De fait, dans un modèle porcin, nous avons démontré qu'une allogreffe rénale incompatible au niveau des antigènes de classe I peut être définitivement et spécifiquement tolérée grâce à un traitement transitoire avec la ciclosporine. Durant le premier mois qui suit la greffe, nous avons montré que les cytokines préférentiellement produites par les lymphocytes infiltrant le greffon toléré étaient de type Ta2 (IL-10, IL-4), alors que l'expression des cytokines de type Ta1 (IL-2, IFN- γ) étaient quasi absentes. Par contre, en l'absence de traitement avec la ciclosporine, ces greffons étaient rejetés et les cytokines produites au niveau de l'organe étaient essentiellement de type Ta1 [28, 29]. La relation de cause à effet d'une part entre cytokines de type Ta1 et le rejet d'une allogreffe, et d'autre part entre les cytokines de type Ta2 et la tolérance n'est pas formellement démontrée, mais on sait aujourd'hui qu'il existe une régulation croisée entre ces deux types de lymphocytes auxiliaires.

En effet, une production importante d'IFN- γ inhibe la prolifération des lymphocytes Ta2 et inversement la production d'IL-10 est capable d'inhiber la synthèse des cytokines de type Ta1 [30-32]. Il paraît donc logique d'essayer de transfecter au niveau d'un organe à greffer le gène de l'IL-10 pour assurer une production importante d'IL-10 au niveau de l'organe, ce qui inhiberait les lymphocytes Ta1 dont la mission est de détruire l'organe greffé [33]. Shaked et coll. ont ainsi injecté au niveau du parenchyme cardiaque d'un cœur de souris un vecteur adénoviral exprimant soit de l'IL-10 ou du TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β); comparée à celle d'un groupe contrôle, la survie de l'allogreffe cardiaque était ainsi prolongée de 12 à 26 jours après transfection du gène du TGF- β 1 et de 12 à 36 jours après transfection du gène de l'IL-10 [33-35]. Bien que de telles applications de thérapie génique n'ont pas encore été rapportées dans un modèle animal supérieur, ces résultats encore préliminaires sont particulièrement encourageants.

Transfection du gène codant pour une molécule qui inhibe le second signal : CTLA-4Ig

Il a été récemment démontré que l'activation d'un lymphocyte ne dépend pas uniquement de la reconnaissance du complexe « HLA + peptide » par le récepteur du lymphocyte T (TCR), mais dépend également de l'existence d'un « second signal » [36-39]. Lorsque ce second signal est absent, le lymphocyte ne s'active pas et ne prolifère pas, mais il devient spécifiquement tolérant ou « anergique » à l'antigène présenté au moment de cette interaction incomplète avec le TCR. Ce concept d'anergie spécifique est très intéressant en transplantation d'organes, puisque l'on peut imaginer inhiber le second signal lors de la première rencontre entre les lymphocytes du receveur et l'organe greffé du donneur. Les lymphocytes du receveur seraient alors spécifiquement anergisés et incapables de réagir contre les antigènes du donneur mais ils resteraient capables de réagir contre un autre allo-antigène ou contre une agression bactérienne ou virale, ce qui est bien sûr vital chez les patients greffés. Les molécules CD28 ou CTLA-4 du lymphocyte ainsi que la molécule B7.1 ou B7.2 de la cellule présentatrice d'antigène ont ainsi été identifiés et sont impliqués dans le second signal [40]. Des études expérimentales ont démontré que l'induction d'une tolérance à une allogreffe vascularisée est possible chez le rongeur si l'on infuse au moment de la greffe un anticorps-monoclonal capable de reconnaître la molécule CD28 ou CTLA-4 [41]. Il serait donc intéressant de transfecter au niveau de l'organe à greffer le gène d'une protéine de fusion (CTLA-4Ig) qui possède une très grande affinité pour la molécule CTLA-4 et qui empêcherait l'interaction complète entre les cellules du greffon et le système lymphocytaire du receveur. Cette interruption d'interaction préviendrait le rejet aigu de l'organe et pourrait même peut-être induire une anergie clonale spécifique pour l'allo-antigène présenté. Ce type de manipulation génétique vient d'être rapporté avec succès au niveau du foie chez le rat où une survie prolongée du greffon a pu être induite après transfection au niveau de l'organe du gène de la protéine de fusion CTLA-4Ig par un vecteur adénoviral (Shaked et coll., American Society of Transplant surgeon, Mai 1996, Dallas).

Transfection du gène d'une molécule qui provoque l'apoptose des lymphocytes : Fas/Fas-Ligand

C'est très récemment qu'une molécule responsable de l'apoptose (mort cellulaire programmée) vient d'être identifiée, clonée et appelée « Fas » [42]. Lorsqu'un lymphocyte est activé, il exprime à sa surface la molécule Fas et l'on sait aujourd'hui que si ce lymphocyte activé rencontre son ligand (Fas-L), il reçoit alors un signal d'apoptose qui provoque sa mort par fragmentation de l'ADN. Il vient également d'être

suggéré que certains tissus (chambre antérieure de l'œil, testicule) qui ont toujours été considérés comme des sites privilégiés immunologiquement, le sont parce qu'ils portent à leur surface une grande quantité de ligand Fas. En effet, les cellules de Sertoli expriment à leur surface le Fas-L et certains auteurs viennent de démontrer que des cellules allogéniques de Sertoli survivent lorsqu'elles sont greffées sous la capsule du rein chez la souris alors que des cellules de Sertoli manipulées qui ne portent pas ce ligand sont rejetées [43]. Il pourrait être intéressant d'induire l'expression du ligand Fas au niveau d'un organe destiné à être transplanté car les lymphocytes activés qui rencontreront leur ligand sur cet organe mourront en apoptose aboutissant à la délétion clonale spécifique des lymphocytes qui reconnaissent le greffon. Il existe néanmoins des restrictions à un tel système car on sait que certains parenchymes (tel le foie et le cœur) expriment la molécule Fas. Les cellules de cet organe pourraient alors aussi devenir une cible idéale pour mourir en apoptose suite à l'interaction avec le ligand Fas-L. L'injection de Fas-L est d'ailleurs utilisée « *in vivo* » chez la souris pour induire un modèle d'hépatite aiguë car la fixation du ligand Fas sur les cellules hépatiques portant la molécule Fas induit une mort rapide de l'hépatocyte [44]. Quoique très séduisant, le concept de transfection d'un molécule induisant l'apoptose des lymphocytes au niveau de l'organe à greffer n'est pas encore envisageable en pratique clinique.

Greffe de cellules : îlots pancréatiques de Langerhans, cellules de moelle osseuse

Si l'utilisation de la thérapie génique au niveau d'un organe à greffer est difficile parce qu'elle intéresse un organe entier, elle peut par contre trouver une application plus facile dans le cas de greffes cellulaires comme les greffes de moelle osseuse ou les greffes d'îlots pancréatiques. En effet, à l'échelon cellulaire, de nombreuses manipulations génétiques sont possibles sur des cellules qui peuvent être maintenues en culture « *in vitro* » pour quelques heures ou quelques jours [45]. Dans le contexte des xénogreffes d'îlots de Langerhans à partir de pancréas porcin, il semble intéressant et possible de transfecter différents gènes qui devraient rendre ces xénogreffes cellulaires plus acceptables par l'homme. Plus près de nous, en allogreffe de moelle osseuse chez l'homme, plusieurs études de phase I sont maintenant en cours. Au niveau de la moelle osseuse prête à être greffée, les lymphocytes T ont été transfectés avec l'ADN de la thymidine kinase Herpès qui rend alors ces lymphocytes sensibles à un traitement systémique au Gancyclovir : en cas de maladie du greffon contre l'hôte, il est alors possible d'éliminer sélectivement ces lymphocytes T responsables de la réaction immune contre l'hôte par un traitement systémique au Gancyclovir [46].

Au niveau du système immunitaire du futur receveur

La thérapie génique dans ce cas n'a pas comme but de moduler ou d'inhiber le rejet au niveau de l'organe à greffer, mais elle tente plutôt d'induire une tolérance spécifique à un allo-antigène en particulier. La tolérance à une allogreffe représente le but ultime de la recherche en transplantation d'organes et le cas des greffes à partir d'un donneur vivant (qui sont couramment réalisées pour le rein, le foie et le pancréas et plus rarement pour le poumon) représente une situation privilégiée car les caractéristiques immuno-histologiques (système HLA) du donneur et du receveur sont connues suffisamment avant la greffe, ce qui permet de manipuler le système immunitaire du receveur pour le rendre spécifiquement tolérant aux antigènes HLA du futur donneur.

Les premières tentatives expérimentales dans ce domaine ont été rapportées par le groupe d'Oxford, où Madsen et al. [47] ont montré qu'il est possible d'augmenter la survie d'une allogreffe cardiaque chez la souris en lui réinjectant ses propres fibroblastes préalablement transfectés avec le gène responsable de la synthèse des molécules d'histocompatibilité (antigène de classe I ou de classe II) du futur donneur. Sans immuno-suppression, la survie du greffon cardiaque issu du même donneur était significativement augmentée sans néanmoins qu'une tolérance réelle ne soit induite. Ces mêmes auteurs viennent récemment de démontrer la possibilité d'induire une tolérance à une greffe cardiaque chez la souris en transfectant préalablement, au niveau des cellules de la moelle osseuse du receveur, le gène de la molécule de classe I qui sera présente sur l'organe du futur donneur [48]. Un protocole similaire est actuellement réalisé dans un modèle animal supérieur. D.H. Sachs, à Boston, étudie en effet dans un modèle porcin, la possibilité d'induire une tolérance spécifique et définitive à un allo-antigène en transfectant le gène d'une molécule d'histocompatibilité du donneur au niveau de la moelle osseuse du futur receveur. Des cellules médullaires du receveur sont extraites, cultivées « *in vitro* » pendant quelques jours et transfectées avec un gène qui code pour la synthèse de la molécule DR β (antigène de classe II) du futur-donneur [49, 50]. Le receveur est alors irradié et reçoit en retour sa propre moelle transfectée qui exprime maintenant à sa surface une molécule de classe II du futur donneur d'organe. Après reconstitution de la moelle, ce receveur est capable alors de tolérer la greffe de rein du même donneur pour des périodes excédant 2 ans (D.H. Sachs, communication personnelle).

Parmi les cellules lymphoïdes qui peuvent être utilisées pour ce genre de protocole de transfert génique, on pense bien sûr aux cellules de la moelle osseuse, mais les cellules dendritiques ou les thymocytes pourraient être également très intéressants puisqu'il a été démontré dans plusieurs protocoles expérimentaux

chez l'animal qu'une injection d'un allo-antigène dans le thymus du receveur permet d'induire une tolérance définitive à une allogreffe vascularisée provenant du même donneur [51]. Finalement, l'idée d'utiliser des cellules lymphoïdes du futur receveur pour induire une tolérance pourrait aussi être testée dans le contexte des xénogreffes d'organes puisque dans ce cas, le donneur et le receveur sont également connus et caractérisés génétiquement.

■ Xénotransplantation

Un des problèmes actuels de la transplantation d'organes est le manque de donneur d'organes et la xénotransplantation représente une solution possible à ce problème. Depuis les années soixante, il est connu que des xénogreffes entre les primates supérieurs et l'homme peuvent réussir : en 1963 à New York, K. Reemtsma a greffé un rein de chimpanzé à un patient en urémie terminale et celui-ci a survécu durant 9 mois avec une fonction rénale normale. Le receveur est finalement décédé d'une cause intercurrente. Pour des raisons éthiques, de reproduction et pour le danger de transmission de virus et notamment de rétrovirus, il n'est pas souhaitable de considérer les primates comme un réservoir potentiel d'organes pour l'homme. Pour cette raison, le porc se présente comme le donneur potentiel le plus probable pour des raisons éthiques, physiologiques, anatomiques et de reproduction. En dépit de son caractère un peu obligatoire, ce choix a des avantages car la manipulation génétique de ces porcs est plus facile et surtout plus rentable (progéniture régulière). Il a par contre l'inconvénient majeur d'utiliser un animal très éloigné de l'homme au plan phylogénétique. En effet, une xénogreffe de porc à l'homme, entraînerait, en l'absence de préparation immunologique particulière un « rejet hyperaigu » du greffon de porc dans les minutes ou les heures suivant l'implantation. On sait aujourd'hui que les trois acteurs principaux qui participent à la survenue de ce type de rejet hyperaigu sont les anticorps préformés (IgM et IgG) présents chez le receveur, l'activation du complément et l'antigène cible présent sur les cellules endothéliales porcines. Ce dernier vient d'être identifié comme étant une terminaison glycosylée appelée Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal- $\beta(1,4)$ -GlcNAc-R ou plus simplement « α -galactosyl» [52, 53].

L'avantage de la situation de la xénogreffe est bien sûr de pouvoir agir d'une part au niveau du système immunitaire du receveur et d'autre part au niveau du donneur lui-même au stade embryonnaire. C'est ainsi que la thérapie génique est utilisée aujourd'hui pour tenter de rendre le tissu porcin plus compatible avec le système immunitaire humain. Le modèle porcin a néanmoins un inconvénient majeur, car il n'est pas possible d'interrompre sélectivement un gène chez le porc alors qu'il est possible de le faire chez la souris

(souris « knock-out »). En effet, pour obtenir une recombinaison homologue et interrompre sélectivement un gène, il est nécessaire de manipuler une cellule souche embryonnaire totipotente qui est dérivée d'une cellule de tumeur embryonnaire de souris. Grâce à cette cellule souche embryonnaire, il est possible aujourd'hui de créer de nombreuses souches de souris qui sont déficientes pour un gène en particulier : souris déficiente pour le gène de l'IL-10, pour le ou les gènes des molécules d'histocompatibilités de classe I ou II, souris déficiente pour le gène de l'Interféron- γ , etc. [54-60]. Ces souches de souris déficientes représentent une avancée extraordinaire en biologie car il est possible à présent de mesurer l'effet d'un gène précis sur un organisme *in vivo* pour découvrir et démontrer des phénomènes biologiques qui précédemment restaient hypothétiques. Par contre, il n'existe pas à l'heure actuelle de cellule embryonnaire souche chez le porc et on ne peut donc pas interrompre un gène existant, alors qu'il est possible d'ajouter un nouveau gène ou, éventuellement d'essayer de bloquer l'expression d'un gène par des oligonucléotides anti-sens [61]. Cette dernière technique n'a cependant pas encore trouvé d'application *in vivo*.

Transfection chez le porc d'un gène humain régulateur de l'activation du complément

Lorsque le sang humain pénètre dans un organe porcin, les anticorps préformés de type IgM et IgG reconnaissent immédiatement l'épitope « α -galactosyl» présent sur l'endothélium porcin. La fixation des anticorps préformés sur cet épitope glycoprotéique endothélial provoque alors immédiatement l'activation de la voie classique du complément qui conduit à la perforation et la destruction de la cellule endothéliale par le complexe d'attaque membranaire (C'9). Suite à ce changement d'architecture, l'endothélium vasculaire n'assure plus sa mission d'étanchéité et le sang peu alors s'engouffrer dans l'interstitium parenchymateux provoquant ainsi des hémorragies interstitielles suivies de thromboses intravasculaires et d'infarctus de l'organe (fig. 4). Ce processus prend de quelques minutes à quelques heures pour détruire complètement l'organe (en comparaison, le rejet cellulaire aigu d'une allogreffe prend de 5 à 7 jours). Une première solution pour éviter cette cascade d'événements est bien sûr d'éliminer les anticorps préformés et d'éviter leur resynthèse et nous avons démontré qu'il est possible d'obtenir des survies de reins de porc chez le babouin allant jusqu'à 23 jours, résultat très encourageant [62]. Il est néanmoins possible que la voie alterne du complément puisse aussi s'activer indépendamment des anticorps préformés et c'est la raison pour laquelle certains auteurs se sont intéressés à la question de savoir comment interrompre les deux voies d'activation du complément en même temps. A la surface de beaucoup de nos cellules, il existe nor-

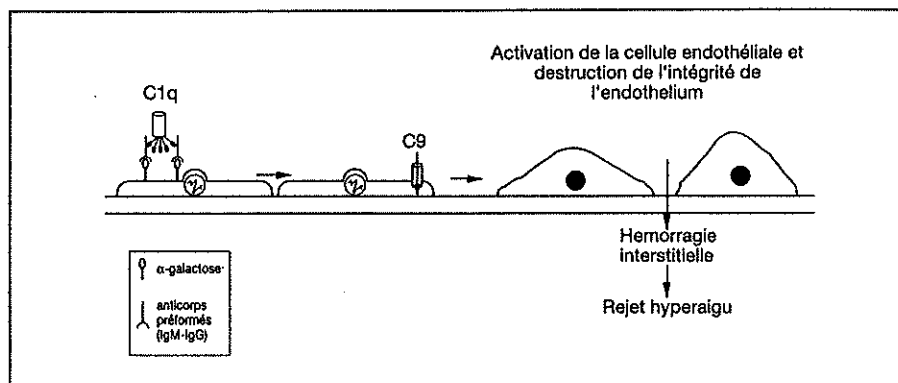


Fig. 4. – Physiopathologie du rejet hyperaigu: les anticorps préformés (IgM/IgG) reconnaissent sur l'endothélium porcin les terminaisons glycoprotéiques α -galactosyl. Ce complexe antigène-anticorps active le complément (C1q), ce qui entraîne la cascade d'activation jusqu'au complexe d'attaque membranaire (C9) qui perforé la cellule endothéliale. Le changement de forme de la cellule endothéliale du à l'œdème intracellulaire fait perdre à la cellule endothéliale le caractère de barrière imperméable de l'endothélium. Ce passage entre les cellules permet alors au sang de s'engouffrer dans l'espace interstitiel et provoque les hémorragies interstitielles, thromboses et infarctus de l'organe.

Fig. 4. – Pathophysiology of hyperacute rejection: preformed antibodies (IgM/IgG) recognize α -galactosyl glycoprotein terminations on the porcine endothelium. This antigen-antibody complex activates complement (C1q), which induces the activation cascade as far as the membrane attack complex (C9) which perforates the endothelial cell. The change of shape of the endothelial cell due to intracellular oedema destroys the impermeable nature of the endothelium of the endothelial cell. This passage between cells then allows blood to enter the interstitial space and induces interstitial haemorrhages, thromboses and infarction of the organ.

malement des molécules qui régulent l'activation du complément s'opposant à son action sur des cellules saines. Ces molécules de régulation de l'activation du complément sont connues depuis longtemps et elles ont été identifiées. Ce sont: le DAF [(Decay Accelerating Factor), la MCP (Membrane Cofactor Protein) et CD59 (qui empêche la fixation du complexe d'attaque membranaire (C9)]. Ces régulateurs sont néanmoins spécifiques de l'espèce ce qui fait qu'un régulateur porcin à la surface de l'endothélium vasculaire ne peut pas réguler l'activation du complément humain. Deux équipes (D. White à Cambridge, UK, et J.F. Platt à Duke, Durham, USA) ont alors eu l'idée d'injecter par micropuncture dans un embryon porcin, les gènes humains responsables de la synthèse de ces différents régulateurs de l'activation du complément pour obtenir l'expression de ces molécules humaines au niveau de l'endothélium vasculaire du porc [63-65]. Aujourd'hui, une première génération de porcs transgéniques pour différentes molécules existe et l'utilisation des organes de ces porcs transgéniques semblent mieux résister au rejet hyperaigu. D. White démontre ainsi que lorsqu'il réalise une greffe de cœur d'un porc normal à un primate non traité, la survie est de 1,6 jours, alors que lorsqu'il utilise un cœur provenant d'un porc transgénique (transfecté avec le gène humain de la molécule DAF), la survie du cœur est de 5,1 jours. Des survies de 40 à 50 jours ont été rapportées lorsque les receveurs

étaient traités par l'association ciclosporine, cyclophosphamide et cortisone (D. White: communication personnelle). Le groupe contrôle qui consisterait à greffer le cœur d'un porc normal en utilisant la même immuno-suppression que celle utilisée chez le porc transgénique ne peut en réalité être testé car la xéno-greffe cardiaque serait de toute manière détruite rapidement par les anticorps préformés malgré cette immuno-suppression. Les résultats présentés en utilisant ces porcs transgéniques sont donc souvent confondus avec l'effet du transgène lui-même alors qu'ils sont ceux de l'addition de l'organe transgénique et du traitement immunosuppresseur. J.F. Platt (Durham, USA), rapporte quant à lui qu'un cœur provenant de porcs transgéniques de première génération ayant été transfectés avec les trois gènes humains des principaux régulateurs d'activation du complément (DAF, MCP et CD59) survit 36 heures alors que les greffes contrôles ne survivent que quelques heures. Ces premiers résultats sont encourageants mais ne représentent qu'une ouverture vers d'autres types d'expérimentations qui permettront de démontrer qu'il est possible d'obtenir des survies longues en utilisant des immuno-suppressions applicables chez l'homme [66].

Dans le même ordre d'idée, l'équipe australienne de Mac Kenzie vient de rapporter les résultats préliminaires d'expériences consistant à agir génétiquement au niveau de l'expression de l'antigène cible (α -galactosyl) lui-même.

Transfection chez le porc d'un gène humain de la H-transférase

S'il était possible d'éliminer complètement de la surface de l'endothélium vasculaire d'un organe porcin la terminaison α -galactosyl, il est probable que le rejet hyperaigu serait maîtrisé en grande partie. Sachant que l'épitope « α -galactosyl» exprimé sur l'endothélium du porc dépend d'une enzyme appelée «galactosyl-transférase» et dans la mesure où il est encore impossible à l'heure actuelle d'inhiber chez le porc l'expression du gène de cette enzyme, Mac Kenzie et al. ont tenté de substituer la production de la terminaison «galactose» en transfectant au niveau de la cellule endothéliale de porc, le gène humain d'une autre enzyme appelée « α -1,2-fucosyl-transférase». Cette enzyme permet l'expression à la surface de la cellule endothéliale d'une autre terminaison glycosylée appelée «fucosyl» qui est en réalité la terminaison glycosylée qui caractérise le groupe sanguin humain «O». Cette terminaison fucosylée a l'avantage de ne pas être reconnue par les anticorps préformés humains, ce qui permet d'éviter la fixation des anticorps préformés humains sur l'endothélium vasculaire porcin, l'activation du complément et par conséquent les lésions de rejet hyperaigu. En réalisant cette expérience, les auteurs ont remarqué que le précurseur utilisé tant par l'enzyme galactosyl-transférase que par l'enzyme fucosyl-transférase est identique (N-acetyl-lactosamine) et *in vitro* comme *in vivo* la transfection du gène de la deuxième enzyme provoque une compétition d'expression des terminaisons glycosylées. Puisque l'expression de la fucosyl-transférase est tout à fait supra physiologique dans les cellules porcines transfectées, les auteurs ont obtenu une expression majoritaire (80%) de terminaisons fucosyl-

lées à la surface de l'endothélium. Une souris transgénique portant au niveau de son endothélium ce gène humain de la fucosyl-transférase vient d'être produite et plus de 80% de ses cellules endothéliales portent la terminaison fucosylée et non la terminaison glycosylée. Il est évident que l'étape suivante est de réaliser des porcs transgéniques qui après une ou deux générations n'exprimeront plus à la surface de leur endothélium que cette terminaison «fucosyl» qui n'est pas reconnue par les anticorps préformés humains. Cette découverte devrait ouvrir définitivement le champ de la xénogreffe aux chercheurs et aux cliniciens et permettre d'étudier le type de rejet cellulaire qu'engendrera la xénogreffe porcine.

CONCLUSIONS

Cette revue d'actualité laisse penser que la thérapie génique fera probablement partie de l'arsenal thérapeutique de la transplantation d'organes d'ici peu et que son impact devrait augmenter dans les années à venir. Les différents résultats expérimentaux déjà obtenus suggèrent que la thérapie génique fera son entrée dans les thérapeutiques par trois voies : l'immuno-modulation locale au niveau de l'organe à greffer, l'induction de la tolérance spécifique à un allo-antigène et finalement la réalisation de xénogreffes à partir d'organes porcins. Il est maintenant primordial que chirurgiens et biologistes moléculaires travaillent ensemble pour tester, à l'aide de modèles animaux supérieurs les différentes hypothèses de travail qui sont présentées dans cette revue.

RÉFÉRENCES

1. BEVERIDGE T., CALNE R.Y. – Cyclosporine (Sandimmun) in cadaveric renal transplantation. Ten-year follow-up of a multicenter trial. European Multicenter Trial Group. *Transplantation* 1995 ; 59 : 1568.
2. CAPLEN N.J., KINRADE E., SORGI F. et al. – In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther* 1995 ; 2 : 603.
3. CAPLEN N.J., ALTON E.W., MIDDLETON P.G. et al. – Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis [see comments]. *Nat Med* 1995 ; 1 : 39.
4. CAPLEN N.J., GAO X., HAYES P. et al. – Gene therapy for cystic fibrosis in humans by liposome-mediated DNA transfer : the production of resources and the regulatory process. *Gene Ther* 1994 ; 1 : 139.
5. CAPLEN N.J., ALTON E.W.F.W., MIDDLETON P.G. et al. – Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Med* 1995 ; 1 : 39.
6. EGLITIS M.A., KANTOFF P., GILBOA E., ANDERSON W.F. – Gene expression in mice after high efficiency retroviral-mediated gene transfer. *Science* 1985 ; 230 : 1395.
7. MILLER A.D. – Retrovirus packaging cells. *Human Gene Therapy* 1990 ; 1 : 5.
8. ALI M., LEMOINE N.R., RING C.J. – The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1994 ; 1 : 367.
9. CRYSTAL R.G. – Transfer of genes to humans : early lessons and obstacles to success. *Science* 1995 ; 270 : 404.
10. CRYSTAL R.G. – The gene as the drug. *Nature Med* 1995 ; 1 : 15.
11. LEDLEY F.D. – Nonviral gene therapy : the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 1995 ; 6 : 1129.
12. BARU M., AXELROD J.H., NUR I. – Liposome-encapsulated DNA-mediated gene transfer and synthesis of human factor IX in mice. *Gene* 1995 ; 161 : 143.
13. ABRAHAM K.M., LEVIN S.D., MARTIN J.D., FORBUSH K.A., PERLMUTTER R.M. – Thymic tumorigenesis induced by overexpression of p56lck. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 3977.
14. LANG Z., FEINGOLD J.M. – An autonomously replicating eukaryotic expression vector with a tetracycline-responsive promoter. *Gene* 1996 ; 168 : 169.
15. SHOCKETT P.E., SCHATZ D.G. – Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 5173.
16. DRAZAN K.E., WU L., SHEN X.D. et al. – Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting. Part III. Variables affecting gene transfer in liver grafts. *Transplantation* 1995 ; 59 : 670.

17. SHAKED A., CSETE M.E., DRAZAN K.E. et al. – Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting. II. Successful expression of transferred cDNA in syngeneic liver grafts. *Transplantation* 1994; 57: 1508.
18. CSETE M.E., DRAZAN K.E., VAN BREE M. et al. – Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting. I. Conditions for expression of transferred genes in cold-preserved hepatocytes. *Transplantation* 1994; 57: 1502.
19. VAN TWUYVER E., KAST W.M., MOOIJAAART R.J.D., MELIEF C.J.M., DE WAAL L.P. – Induction of transplantation tolerance by intravenous injection of allogeneic lymphocytes across an H-2 class II mismatch. Different mechanisms operate in tolerization across an H-2 class I vs. H-2 class II disparity. *Eur J Immunol* 1990; 20: 441.
20. SACHS D.H., SHARABI Y., SYKES M. – Mixed chimerism and transplantation tolerance. In: MELCHERS F. et al. eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989: 1171.
21. SHIMONKEVITZ R.P., BEVAN M.J. – Split tolerance induced by the intrathymic adoptive transfer of thymocyte stem cells. *J Exp Med* 1988; 168: 143.
22. HEEG K., WAGNER H. – Induction of peripheral tolerance to class I major histocompatibility complex (MHC) alloantigens in adult mice: transfused class I MHC-incompatible splenocytes veto clonal responses of antigen-reactive Lyt-2 + T cells. *J Exp Med* 1990; 172: 719.
23. VAN TWUYVER E., MOOIJAAART R.J.D., TEN BERGE I.J.M. et al. – Pretransplantation blood transfusion revisited. *N Engl J Med* 1991; 325: 1210.
24. SACHS D.H. – Specific transplantation tolerance. *N Engl J Med* 1991; 325: 1240.
25. FORD H.R., HOFFMAN R.A., WANG S.A., SIMMONS R.L. – Profile of cytokine production within the rejecting allograft. *Transplant Proc* 1991; 23: 251.
26. MOSMANN T.R., CHERWINSKI H., BOND M.W., GIEDLIN M.A., COFFMAN R.L. – Two types of murine helper T cell clones: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348.
27. DALLMAN M.J., SHIHO O., PAGE T.H., WOOD K.J., MORRIS P.J. – Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the Interleukin 2 pathway. *J Exp Med* 1991; 173: 79.
28. GIANELLO P.R., BLANCHO G., FISHBEIN J.F. et al. – Mechanism of cyclosporine-induced tolerance to primarily vascularized allografts in miniature swine. Effect of administration of exogenous IL-2. *J Immunol* 1994; 153: 4788.
29. BLANCHO G., GIANELLO P., GERMANA S., BAETSCHER M., SACHS D.H., LE GUERN C. – Molecular identification of porcine interleukin-10: regulation of expression in a kidney allograft model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 (in press).
30. TADMORI W., ZHANG M., BEAVIS A.J., SULLIVAN L.M., NARULA S.K. – Suppression of the allogeneic response by human IL-10: a critical role for suppression of a synergy between IL-2 and TNF-alpha. *Cytokine* 1994; 6: 462.
31. KARPUS W.J., PETERSON J.D., MILLER S.D. – Anergy *in vivo*: down-regulation of antigen-specific CD4 + Th1 but not Th2 cytokine responses. *Int Immunol* 1994; 6: 721.
32. FISHMAN M.A., PERELSON A.S. – Th1/Th2 cross regulation. *J Theor Biol* 1994; 170: 25.
33. DRAZAN K.E., WU L., OLTHOFF K.M., JURIM O., BUSUTTIL R.W., SHAKED A. – Transduction of hepatic allografts achieves local levels of viral IL-10 which suppress alloreactivity *in vitro*. *J Surg Res* 1995; 59: 219.
34. QIN L., CHAVIN K. D., DING Y. et al. – Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10. *Transplantation* 1995; 59: 809.
35. QIN L., CHAVIN K. D., DING Y. et al. – Gene transfer for transplantation. Prolongation of allograft survival with transforming growth factor-beta 1. *Ann Surg* 1994; 220: 508.
36. JENKINS M.K., PARDOLL D.M., MIZUGUCHI J., QUILL H., SCHWARTZ R.H. – T-cell unresponsiveness *in vivo* and *in vitro*: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol Rev* 1987; 95: 113.
37. JENKINS M.K., SCHWARTZ R.H. – Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1987; 165: 302.
38. DE SILVA D.R., URDAHL K.B., JENKINS M.K. – Clonal anergy is induced *in vitro* by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J Immunol* 1991; 147: 3261.
39. SCHWARTZ R.H. – A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349.
40. AZUMA M., CAYABYAB M., BUCK D., PHILLIPS J.H., LANIER L.L. – CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 175: 353.
41. BALIGA P., CHAVIN K.D., QIN L. et al. – CTLA4lg prolongs allograft survival while suppressing cell-mediated immunity. *Transplantation* 1994; 58: 1082.
42. RUSSELL J.H. – Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 382.
43. BELLGRAU D., GOLD D., SELAWRY H., MOORE J., FRANZUSOFF A., DUKE R.C. – A role for CD95 ligand in preventing graft rejection [see comments]. *Nature* 1995; 377: 630.
44. OGASAWARA J., WATANABE FUKUNAGA R., ADACHI M. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice [published erratum appears in *Nature* 1993 oct 7; 365 (6446): 568]. *Nature* 1993; 364: 806.
45. CSETE M.E., BENHAMOU P.Y., DRAZAN K.E. et al. – Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation* 1995; 59: 263.
46. KORBLING M. – Blood stem cell transplantation and gene therapy of cancer. *Stem Cells* 1995; 13 (suppl. 3): 106.
47. MADSEN J.C., SUPERINA R.A., WOOD K.J., MORRIS P.J. – Immunological unresponsiveness induced by recipient cells transfected with donor MHC genes. *Nature* 1988; 332: 161.
48. WONG W., MORRIS P.J., WOOD K. – Syngeneic bone marrow expressing a single donor class I MHC molecule permits acceptance of a fully allogeneic cardiac allograft. *Transplantation* 1996; 62: 1462.
49. LE GUERN C., SHIMADA H., EMERY D.W., GERMANA S., SACHS D.H. – Molecular transplantation of MHC class II genes as a means for inducing transplantation tolerance in miniature swine. *Bull Inst Pasteur* 1993; 91: 125 (abstract).
50. LE GUERN C., SHIMADA H., EMERY D.W., GERMANA S., SHAFER G.E., SACHS D.H. – Retrovirus-mediated transfer of MHC class II cDNA into swine bone marrow cells. *J Mol Med* 1995; 73: 269.
51. POSSELT A.M., BARKER C.F., TOMASZEWSKI J.E., MARKMANN J.F., CHOTI M.A., NAJI A. – Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 1990; 249: 1293.
52. SACHS D.H., BACH F.H. – Immunology of xenograft rejection. *Hum Immunol* 1990; 28: 245.
53. PLATT J.L., VERCELLOTTI G.M., DALMASSO A.P. et al. – Transplantation of discordant xenografts: A review of progress. *Immunol Today* 1990; 11: 450.
54. RENNICK D., DAVIDSON N., BERG D. – Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76: S174.
55. GALLI TALIADEOROS L.A., SEDGWICK J.D., WOOD S.A., KORNER H. – Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods* 1995; 181: 1.
56. LADEL C.H., DAUGELAT S., KAUFMANN S.H. – Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur J Immunol* 1995; 25: 377.
57. LADEL C.H., FLEISCH I.E., ARNOLDI J., KAUFMANN S.H. – Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection [published erratum appears in *J Immunol* 1995 Apr 15; 154 (8): 4223]. *J Immunol* 1994; 153: 3116.
58. STEINMETZ M., HAAS W. – Recent experiments with MHC knock-out mice: more questions than answers. *Bioessays* 1993; 15: 613.
59. HERGUEUX J., BODMER H., CARDELL S. et al. – Knock-out mice: a new tool for transplantation immunologists. *Transplant Proc* 1993; 25: 30.
60. WYNN T.A., JANKOVIC D., HIENY S. et al. – IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN-gamma. *J Immunol* 1995; 154: 3999.
61. BHATTI L., BEHLE K., STEVENS R.H. – Inhibition of B cell proliferation by antisense DNA to both alpha and beta forms of Fc epsilon R II. *Cell Immunol* 1992; 144: 117.
62. GIANELLO P.R., LATINNE D., ALEXANDRE G.P.J. – Pig to baboon xenograft. *Xeno* 1995; 3: 26.
63. COZZI E., WHITE D.J. – The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1995; 1: 964.
64. Mc CURRY K.R., KOOYMAN D.L., DIAMOND L.E., BYRNE G.W., LOGAN J.S., PLATT J.L. – Transgenic expression of human complement regulatory proteins in mice results in diminished complement deposition during organ xenoperfusion. *Transplantation* 1995; 59: 1177.
65. Mc CURRY K.R., KOOYMAN D.L., DIAMOND L.E. et al. – Human complement regulatory proteins in transgenic animals regulate complement activation in xenoperfused organs. *Transplant Proc* 1995; 27: 317.
66. PLATT J.L., LOGAN J.S. – Use of transgenic animals in xenotransplantation. *Transplant Reviews* 1996; 10: 69.