

selon laquelle le provirus n'est pas inactivé au cours de la gamétogenèse. Si dans le vecteur lentiviral, le gène de la GFP est placé sous le contrôle d'un promoteur dont l'activité est spécifique d'un tissu, il est alors possible de cibler l'expression du transgène dans ce tissu. Ainsi, la GFP n'est exprimée que dans les cellules du muscle squelettique, quand le transgène est sous le contrôle du promoteur de la myogénine ou dans le thymus, quand son expression dépend du promoteur proximal du gène *lck* spécifique. La transgénèse par vecteur lentiviral, en évitant la micro-manipulation toujours délicate du pronucléus, devrait permettre l'introduction d'un transgène dans les embryons d'autres espèces animales (l'article présente les premiers résultats obtenus chez le rat). De plus, l'incubation des embryons dans la suspension virale propose une approche économique et fiable, facile à mettre en œuvre, et donc accessible à de nombreux laboratoires. Soulignons toutefois que la transgénèse lentivirale reste cependant restreinte à des transgènes de moins de 10 kb.

Comme nous l'avons souligné, ces travaux sont remarquables par le fait que l'expression du vecteur lentiviral ne s'éteint pas au cours des différentes étapes du développement, à l'inverse de celle des vecteurs oncorétroviraux. Comme les vecteurs lentiviraux utilisés dans ces travaux sont auto-inactivants, on ne peut exclure la possibilité que la délétion introduite dans la région U3, entraînant l'inactivation transcriptionnelle des LTR du provirus, isole le transgène des effets négatifs dus au site d'intégration, et/ou empêche les inhibitions épigénétiques, comme la méthylation. Il resterait alors à vérifier que des vecteurs oncorétroviraux auto-inactivants ne seront pas soumis à une telle inhibition. Il se pourrait également que l'élimination de séquences dans les LTR empêche la fixation de facteurs transrépresseurs et explique les résultats obtenus. Les auteurs proposent aussi que les mécanismes cellulaires

spécifiques de l'inhibition de l'activité des oncorétrovirus endogènes seraient inefficaces pour lutter contre les infections par les lentivirus. D'autant plus que des lentivirus endogènes n'ont pas été identifiés. Si l'utilisation de vecteurs lentiviraux auto-inactivants représente une avancée majeure dans le domaine de la transgénèse chez la souris, la transduction réussie de gènes d'intérêt dans des cellules ES humaines indique que ces vecteurs ont un potentiel pour le développement des thérapies génique et cellulaire [2]. ♦

Lentiviral vectors and germ line transmission

RÉFÉRENCES

1. Amado RG, Chen ISY. Lentiviral vectors : the promise of gene therapy within reach? *Science* 1999 ; 285 : 674-6.
2. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 2140-5.
3. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 2002 ; 295 : 868-72.

NOUVELLE

Porcs knock-out pour la galactosyl-transférase: une avancée considérable en xénotransplantation

Joanna Ashton-Chess, Gilles Blancho

> La xénotransplantation, transplantation entre espèces différentes, représente une solution alternative potentielle au problème actuel du déficit d'organes. Outre le risque de transmission de virus porcins à l'homme et le problème du fonctionnement chez l'homme d'un organe

ne d'une espèce différente, et qu'il faudra clarifier, l'obstacle majeur au succès d'une telle stratégie reste la barrière d'espèce entre l'homme et le porc, ce dernier étant retenu de façon unanime comme l'animal donneur. En effet, le sérum des humains

contient des anticorps dits naturels, encore appelés préformés, qui reconnaissent un antigène disaccharidique xénogénique majoritaire : le galactose $\alpha 1,3$ galactose, porté par les cellules de tous les mammifères à l'exception des humains et des primates de l'ancien monde. Ainsi la disparition ou, à défaut, la réduction de l'expression de cet antigène de la surface des cellules porcines était-elle devenue un enjeu essentiel pour l'avenir de la xénotransplantation et une voie de recherche prioritaire depuis quelques années. Jusqu'à

Institut de Transplantation et de recherche en transplantation (ITERT), Hôtel Dieu, CHU de Nantes, 1, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes Cedex 1, France.



présent, l'impossibilité d'isoler chez le porc les cellules ES (*embryonic stem cells*) qui sont absolument nécessaires à la technique de *knock-out* rendait totalement impossible l'obtention de porcs dont le gène codant pour ce sucre aurait été invalidé. On se contentait donc de diminuer l'expression des disaccharides galactose $\alpha 1,3$ galactose par différentes stratégies astucieuses de compétition avec d'autres sucres, ou encore de neutralisation intracellulaire de l'enzyme galactosyl-transférase responsable du « branchement » des résidus Gal à la surface des cellules par des chaînes uniques de fragments variables d'immunoglobulines dirigées contre l'enzyme. Depuis l'avènement de la technique de clonage par transfert nucléaire appliquée d'abord à la brebis (Dolly) (→) puis à d'autres espèces comme le porc [1], il devenait envisageable d'invalider un gène par recombinaison homologue *in vitro* dans des cellules en culture puis de transférer le noyau de ces dernières dans un œuf porcin vide afin de recréer un embryon. La publication du travail de l'équipe de Randall Prather, en collaboration avec *Immerge BioTherapeutics*, annonce l'obtention, par cette technique de transfert nucléaire, de porcelets dont le gène codant pour la galactosyl transférase a été invalidé [2]. Brièvement, la technique a consisté à insérer au sein du gène codant pour cette enzyme, par l'intermédiaire d'un vecteur, un fragment d'ADN contenant notamment une séquence de résistance à un antibiotique. Lorsqu'elles sont exposées en culture à la présence de cet antibiotique, seules les cellules porteuses du nouveau fragment d'ADN survivent. On contrôle alors que l'intégration du nouvel ADN s'est faite à la position voulue dans ces cellules. Le gène ainsi recombiné exprime alors une version tronquée et donc inopérante de la galactosyl-transférase. Mais cette technique conduit à la recombinaison d'un seul allèle, et donc à des animaux hétérozygotes pour le gène recombiné. Les cellules fœtales ainsi manipulées sont ensuite

fusionnées avec des ovocytes dont les chromosomes ont été retirés, permettant le démarrage de cycles de divisions cellulaires et la production de blastocystes qui sont ensuite implantés dans l'utérus de femelles pré-traitées pour que la muqueuse utérine soit propice à l'implantation. Cette stratégie complexe a dû être répétée un nombre considérable de fois (3 000 implantations sur 28 femelles) pour arriver à la naissance de 7 porcelets hétérozygotes pour le gène *galactosyl-transférase*, soit 0,2 % de succès. Ainsi que nous le mentionnons ci-dessus, les premiers animaux sont hétérozygotes et expriment donc toujours des résidus Gal. Pour obtenir des animaux homozygotes pour le gène tronqué, les hétérozygotes seront croisés entre eux, ce qui représente plusieurs mois supplémentaires de travail. Cette recherche n'est pas l'apanage d'un seul laboratoire car, simultanément à cette publication, la firme écossaise *PPL Therapeutics* (à l'origine de la naissance de Dolly) annonçait lors d'une conférence de presse, puis dans une publication [3] la naissance, le jour de Noël (!), de 5 porcelets dépourvus de galactosyl-transférase. En outre, il semble que la firme *Advanced Cell Technology* (Worcester, USA) soit proche du même résultat. L'arrivée prochaine dans le monde de la recherche en xénotransplantation de porcs homozygotes pour une délétion du gène *galactosyl transférase* est une information de première importance, que l'on attendait depuis bien longtemps. Des progrès considérables ont été obtenus avec les porcs transgéniques pour les molécules capables de bloquer l'activation du complément humain qui est un des facteurs essentiels du rejet hyperaigu dans les xéno greffes. Si la compréhension des mécanismes des rejets xénogéniques est de plus en plus précise, il n'en demeure pas moins que le rejet

retardé de tissus xénogéniques ne peut toujours pas être prévenu et reste l'obstacle immunologique majeur au succès de la xénotransplantation. L'utilisation d'organes issus de tels animaux devrait vraisemblablement faire progresser considérablement les travaux cherchant à améliorer la survie des xéno greffes chez les primates. Ce n'est sûrement pas la fin de l'histoire ! De nombreux résultats expérimentaux laissent en effet penser que des réponses tant humorales que cellulaires induites contre d'autres antigènes porcins devront aussi être prévenues. Enfin, le mieux étant l'ennemi du bien, l'absence de résidus Gal peut accroître, en théorie, le risque de transmission, à partir des organes de ces porcs dépourvus de galactosyl-transférase, de rétrovirus endogènes porcins (PERV) : en effet, les virus n'exprimeront pas non plus de résidus Gal ; or, les anticorps anti-Gal jouent vraisemblablement un rôle essentiel de défense contre les zoonoses. Dans ce sens, les animaux décrits dans la publication de *Science* [2] pourraient être avantagés parce que la souche de porcs dont ils dérivent manifestement ne transmet pas de PERV aux cellules humaines en culture. ♦

A breakthrough in xenotransplantation: generation of pigs knock-out for galactosyl transferase

RÉFÉRENCES

1. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000 ; 289 : 1188-90.
2. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, *et al.* Production of alpha-1,3-galactosyl transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002 ; 295 : 1089-92.
3. Dai Y, Vaught TD, Boone J, *et al.* Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyl transferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002 ; 20 : 251-5.