

UNIVERSITE de NANTES
FACULTE de MEDECINE

**Rejet Vasculaire Aigu en Xénotransplantation
et Incompatibilité de la Voie de la Protéine C
dans une Combinaison Porc- Primate**

THESE DE DOCTORAT
Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE
Discipline : Médecine
Spécialité : Immunologie

présentée
et soutenue publiquement par

Jean Christian Roussel

le 20 Octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Président : Pr Duveau Daniel

Rapporteurs : Pr Wolf Philippe et Pr Vincentelli André

Examineurs : Pr Cowan Peter et Pr Le Marec Hervé

Directeur de thèse : Pr Gilles Blancho

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	14
PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS	15
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES:	15
PRESENTATIONS ORALES SCIENTIFIQUES:	16
POSTERS SCIENTIFIQUES:.....	16
INTRODUCTION	17
I. REVUE DE LA LITTERATURE.....	20
I.1 PENURIE DE GREFFONS (DONNEES ISSUES DE L'AGENCE DE BIOMEDECINE).....	21
I.2 HISTOIRE DE LA XENOTRANSPLANTATION.....	22
I.3 XENOTRANSPLANTATION : BARRIERE IMMUNOLOGIQUE	25
I.3.1 <i>Rejet HyperAigu (RHA)</i>	25
I.3.1.1 Xéno-antigènes.....	26
I.3.1.2 Anticorps naturels anti-Gal.....	27
I.3.1.3 Activation du complément et RHA.	28
I.3.1.4 Les cellules endothéliales dans le rejet suraigu	29
I.3.2 <i>Rejet Vasculaire Aigu (RVA)</i>	30
I.3.2.1 Xéno-anticorps et RVA.....	31
I.3.3 <i>Porcs génétiquement modifiés pour la Xenotransplantation</i>	31
I.4 XENOTRANSPLANTATION : BARRIERE DE LA COAGULATION	32
I.4.1 <i>Coagulation et Xenotransplantation</i>	32
I.4.2 <i>Rappel physiologique sur l'hémostase</i>	32
I.4.2.1.1 Hémostase Primaire.....	33
✓ La paroi vasculaire	33
✓ Les plaquettes.....	34
✓ Facteurs plasmatiques intervenant dans l'hémostase primaire	34
I.4.2.1.2 Etapes de l'hémostase primaire.....	34
✓ Adhésion plaquettaire	35
✓ Activation des plaquettes	35
✓ Agrégation plaquettaire.....	36
I.4.2.2 Physiologie de la coagulation	37
I.4.2.2.1 Les facteurs de la coagulation.....	37
I.4.2.2.2 Formation de thrombine.....	38
✓ Voie exogène ou extrinsèque	39
✓ Voie endogène ou intrinsèque.....	39
I.4.2.3 Les inhibiteurs plasmatiques de la coagulation	39
✓ L'antithrombine III	39

✓	L'inhibiteur de la voie extrinsèque de la coagulation : TFPI.....	41
I.4.3	Voie de la Protéine C.....	42
I.4.3.1	Composants de la voie de la protéine C: la THROMBOMODULINE (TM)	42
I.4.3.1.1	Structure de la Thrombomoduline.....	43
✓	Domaine de type Lectine de la TM :	43
✓	Domaine de type EGF de la TM :	44
✓	Domaine riche en Sérine-Thréonine	45
✓	Queue intra-cytoplasmique de l'extrémité C terminale	45
I.4.3.1.2	Expression et concentration de la TM	46
I.4.3.2	Composants de la voie de la protéine C : La THROMBINE ou Facteur II activé (FIIa).....	46
I.4.3.2.1	Mécanismes d'activation de la Thrombine	46
I.4.3.2.2	Mécanismes inhibiteurs de la thrombine	47
✓	Inhibition et changement structurel induit par la TM	47
✓	Inhibition par l'antithrombine III	48
I.4.3.2.3	Récepteurs de la Thrombine.....	48
✓	Famille des PARs :	48
✓	Domaines EGF-like 5 et 6 de la TM	49
I.4.3.3	Composants de la voie de la PC : la PROTEINE C	49
I.4.3.3.1	Structure de la PC	50
I.4.3.3.2	Activation de la protéine C.....	50
I.4.3.3.3	Liaisons de la protéine C	51
I.4.3.4	Composants de la voie de la PC : EPCR.....	51
I.4.3.4.1	Structure de l'EPCR	51
✓	Homologies avec les molécules du CMH/CD1	51
✓	Homologies avec la protéine murine CCD41	51
I.4.3.4.2	Fonctions de l'EPCR:.....	52
I.4.3.4.3	Expression de l'EPCR	52
✓	Localisation de l'expression de l'EPCR	52
✓	L'EPCR Soluble	53
✓	Régulation de l'expression de l'EPCR.....	53
I.4.3.5	PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES de la Voie de la protéine C	54
I.4.3.5.1	PROPRIETES ANTICOAGULANTES de la voie de la PC.....	54
I.4.3.5.2	Propriétés PROFIBRINOLYTIQUES de la voie de la PC	55
I.4.3.5.3	Propriétés ANTI-INFLAMMATOIRES de la voie de la PC	55
✓	Histoire de la découverte des propriétés anti-inflammatoires de la protéine C.....	56
✓	Propriétés anti-inflammatoires de la voie de la PC: études in vitro.....	56
✓	Propriétés anti-inflammatoires de la voie de la PC: études in vivo	57
I.4.3.5.4	Propriétés anti-apoptotiques de la voie de la protéine C :	58
I.4.1	Rôle de l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI)	58
I.4.2	Anomalies héréditaires de la voie de la protéine C	59
I.4.2.1	Déficit en protéine C.....	59
I.4.2.2	Déficits de l'activation de la PC.....	59
I.4.2.3	Résistance à la protéine C activée ou Facteur V Leiden.....	59
I.4.3	Incompatibilité de la Voie de la Protéine C en Xénotransplantation.....	60

I.4.4	<i>Rôle du facteur Willebrand en Xénotransplantation</i>	60
I.5	XENOTRANSPLANTATION: BARRIERE INFECTIEUSE	61
I.6	XENOTRANSPLANTATION : BARRIERE PHYSIOLOGIQUE	61
I.7	XENOTRANSPLANTATION : RECOMMANDATIONS DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS)	62
II.	MATERIELS ET METHODES.....	64
II.1	MATERIELS :.....	65
II.1.1	<i>Solutés.....</i>	65
II.1.2	<i>Matériels de Biologie Moléculaire.....</i>	65
II.1.3	<i>Matériels de Biochimie.....</i>	65
II.1.4	<i>Matériels de Culture Cellulaire.....</i>	65
II.1.5	<i>Laboratoire des Grands Animaux (LGA) de l'unité INSERM 643</i>	66
II.1.6	<i>Les animaux</i>	66
II.1.7	<i>Procédure Chirurgicale et Immunosuppression</i>	66
II.1.7.1	Immunoabsorption	67
II.1.7.2	Immunosuppression	67
II.1.7.3	Monitoring des animaux.....	67
II.1.7.4	Biopsie des greffons.....	67
II.2	METHODES:	68
II.2.1	<i>Méthodes de Biologie Moléculaire.....</i>	68
II.2.1.1	Préparation des boîtes d'agarose et Milieu de culture.....	68
II.2.1.2	Préparation de cellules compétentes d'E. coli.....	68
II.2.1.3	Transformation bactérienne.....	68
II.2.1.4	Isolation des plasmides à DNA.....	68
II.2.1.4.1	Isolation par Miniprep	68
II.2.1.4.2	Isolation par Maxiprep.....	69
II.2.1.5	Préparation d'ADN et d'ARN.....	69
II.2.1.5.1	Isolation de l'ADN génomique	69
II.2.1.5.2	Extraction d'ARN	69
✓	Préparation des échantillons :	69
✓	Ultracentrifugation :	69
✓	Préparation de l'ARN :	70
II.2.1.5.3	Préparation de l'ADNc	70
II.2.1.5.4	Amplification rapide des extrémités d'ADNc.	70
II.2.1.6	Electrophorèse d'ADN	71
II.2.1.7	Extraction d'ADN à partir de gels d'agarose	71
II.2.2	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	71
II.2.2.1	Amplification par PCR	71
II.2.2.2	Amorces pour PCR	72
II.2.2.2.1	Création d'amorces dégénérées pour le gène de la Thrombomoduline porcine.....	72
II.2.2.2.2	Création d'amorces dégénérées pour l'amplification du gène porcin de l'EPCR.....	73
II.2.2.2.3	Création d'amorces spécifiques pour le gène humain codant pour l'EPCR	73
II.2.2.2.4	Création d'amorces spécifiques pour l'amplification rapide des extrémités du gène porcin de l'EPCR	73

II.2.2.2.5	Création d’amorces spécifiques pour l’amplification rapide des extrémités du gène porcine de la Thrombomoduline	74
II.2.2.2.6	Création d’amorces dégénérées pour l’amplification du gène porcine codant pour la prothrombine porcine	74
II.2.2.2.7	Création d’amorces spécifiques pour la construction de variants de la TM avec des domaines EGF permutés entre la TM humaine et la TM porcine.....	75
II.2.2.3	Séquençage double- brin d’ADN	76
II.2.2.3.1	Technique de séquençage	76
II.2.2.3.2	Analyse des séquences	76
II.2.3	<i>Biologie Moléculaire</i>	76
II.2.3.1	Déphosphorylation des vecteurs digérés.....	76
II.2.3.2	Ligature d’ADN.....	76
II.2.3.3	Blunt-ending des fragments d’ADNc.....	77
II.2.4	<i>Constructions de vecteurs plasmidiques</i>	77
II.2.4.1	Construction de vecteurs plasmidiques exprimant la TM.....	77
II.2.5	<i>Construction de variants de la TM avec des domaines EGF permutés</i>	77
II.2.6	<i>Enzymes de Restriction</i>	78
II.2.7	<i>ImmunoHistochimie</i>	78
II.2.7.1	Préparation des tissus.....	78
II.2.7.2	Protocole de marquage par immunohistochimie	79
II.2.7.3	Immunofluorescence	79
II.2.7.4	Coloration à l’Hématoxyline et Eosine.....	80
II.2.7.5	Immunomarquage de l’apoptose (effet TUNEL).....	80
II.2.8	<i>CULTURES CELLULAIRES</i>	80
II.2.8.1	Transfection temporaire	80
II.2.8.1.1	Transfection avec la Lipofectamine	80
II.2.8.1.2	on par Electroporation.....	81
II.2.8.2	Analyse par Cytométrie de Flux.....	81
II.2.8.3	Immunoprécipitation.....	81
II.2.9	<i>Western Blot</i>	82
II.3	TRANSGÈNESE:	83
II.3.1	<i>Préparation des vecteurs</i>	83
II.3.1.1	Micro-injection Nucléaire	83
II.4	DEPISTAGE DES SOURIS TRANSGENIQUES :	83
II.4.1	<i>Préparation de l’ADN génomique</i>	83
II.4.2	<i>Analyse par cytométrie de Flux à partir de Cellules Sanguines Périphériques</i>	83
II.5	ETUDES FONCTIONNELLES :	84
II.5.1	<i>Etude de la liaison Thrombine – Thrombomoduline</i>	84
II.5.1.1	Etude par Spectrophotométrie (Spectrozyme TH)	84
II.5.2	<i>Etude de l’activité de la Thrombomoduline</i>	85
II.5.2.1	Quantification de l’activation de la protéine C humaine	85
II.5.2.2	Quantification de l’activation de la protéine C porcine	86
II.5.2.3	Tampon au Tris-Imidazole	86

II.5.3	<i>Détection de l'activation de TAFI</i>	86
II.5.4	<i>Temps de Saignement</i>	86
II.5.5	<i>Etudes de l'agrégation plaquettaire</i>	87
II.5.5.1	Agrégation plaquettaire sur plaquettes isolées	87
II.5.6	<i>Modèle expérimental d'ischémie reperfusion rénale</i>	87
II.5.6.1	Protocole expérimental	87
II.5.6.2	Evaluation de la fonction rénale et histologie	88
II.5.6.3	Analyse et évaluation histologique des lésions rénales d'ischémie- reperfusion	88
II.5.7	<i>Modèle expérimental d'induction de Thrombose embolique de l'artère pulmonaire</i>	88
II.5.8	<i>Statistique</i>	89
III.	PROJET I: ETUDE <i>IN VIVO</i> DU REJET VASCULAIRE AIGU DANS UNE COMBINAISON PORC SUR PRIMATE.	90
III.1	PREFACE.....	91
III.2	XENOTRANSPLANTATION D'ORGANES PORCINS TRANSGENIQUES POUR LA MOLECULE HUMAINE CD55 CHEZ LE BABOUIN :	91
III.2.1	<i>Effets de l'immunoabsorption d'anticorps non- spécifiques sur le devenir de xénotransplantation d'organes porcins chez le primate</i>	91
III.2.1.1	Informations Générales:	91
III.2.1.2	Article I: "The effect of immunoglobulin immunoabsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons" <i>Xenotransplantation</i> 2003:10:552-561.....	92
III.2.1.3	Discussion (complémentaire à l'article).....	103
III.2.2	<i>Etude de l'infiltrat cellulaire des xénotreffons lors du rejet aigu</i>	104
III.2.2.1	Informations générales.....	104
III.2.2.2	Article II: "Cellular participation in Delayed Xenograft Rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons" <i>Xenotransplantation</i> 2003:10; 446- 453.	104
III.2.2.3	Discussion	113
III.3	CONCLUSION PRELIMINAIRE.....	115
IV.	PROJET II: ETUDE <i>IN VITRO</i> DES TROUBLES DE LA COAGULATION EN XENOTRANSPLANTATION : ROLE DU COMPLEXE THROMBINE- THROMBOMODULINE DANS LA VOIE DE LA PROTEINE C DANS UNE COMBINAISON PORC SUR PRIMATE	116
IV.1	PREFACE.....	117
IV.2	CLONAGE ET CARACTERISATION DE L'ADNC DU GENE PORCIN DE LA THROMBOMODULINE	117
IV.2.1	<i>Sites de liaisons des amorces dégénérées</i>	117
IV.2.2	<i>Amplification première d'un fragment de la TM porcine</i>	118
IV.2.3	<i>Amplification des extrémités de l'ADNc codant pour la TM porcine</i>	119
IV.2.3.1	Amplification par le système Marathon RACE et SMART Race amplification	119
IV.2.3.2	Amplification à partir des zones communes non-spécifiques d'espèces.....	120
IV.2.4	<i>Résumé des différents amplicons de la TM porcine</i>	121
IV.2.5	<i>Analyse et comparaison des séquences pour la TM</i>	122
IV.2.5.1	Séquence nucléique et protéinique de la TM porcine	122
IV.2.5.2	Homologies de la TM entre espèces mammifères.....	123
IV.3	EXPRESSION ET ACTIVITE DE LA TM PORCINE ET HUMAINE	126
IV.3.1	<i>Expression de la TM porcine</i>	126

IV.3.1.1	Détection par FACS de la TM porcine	126
IV.3.1.2	Création et détection de la TM porcine avec un épitope FLAG	126
IV.3.2	<i>Etude de la liaison Thrombine- Thrombomoduline</i>	127
IV.3.2.1	Etude de la liaison Thrombine-TM par FACS:.....	128
IV.3.2.2	Etude de la liaison Thrombine-TM par spectrophotométrie.....	129
IV.3.2.3	Etude de la liaison Thrombine-TM par des tests d'hémostase.....	129
IV.3.3	<i>Etude de l'activité de co-facteur de la TM porcine</i>	130
IV.4	EXPRESSION ET ACTIVITES DE VARIANTS HYBRIDES DE LA TM PORCINE ET HUMAINE	131
IV.5	ACTIVATION DE TAFI PAR LE COMPLEXE THROMBINE-TM	134
IV.6	CLONAGE ET CARACTERISATION DE L'ADNC CODANT POUR LA PROTHROMBINE PORCINE	135
IV.7	ARTICLE III: « PIG THROMBOMODULIN BINDS HUMAN THROMBIN BUT IS A POOR COFACTOR FOR ACTIVATION OF HUMAN PROTEIN C AND TAFI » AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION 2008; 8:1-12	136
IV.8	DISCUSSION	149
V.	PROJET III: ETUDE IN VITRO DES TROUBLES DE LA COAGULATION EN XENOTRANSPLANTATION : ROLE DE L'ENDOTHELIUM PROTEIN C RECEPTOR (EPCR) DANS UNE COMBINAISON PORC-PRIMATE	152
V.1	CLONAGE DE L'ADNC DU GENE PORCIN CODANT POUR L'EPCR.....	153
V.1.1	<i>Amplification à partir d'amorces dégénérées</i>	153
V.1.2	<i>Amplification des extrémités de l'ADnc de l'EPCR porcine</i>	153
V.1.2.1	Par méthode Marathon RACE et SMART RACE.....	153
V.1.2.2	Amplification de l'extrémité 5' non translétée de l'EPCR porcine	154
V.2	ANALYSE ET CARACTERISATION DE L'ADNC DE L'EPCR PORCIN	155
V.2.1	<i>Analyse des séquences nucléique et protéique de l'EPCR porcine</i>	155
V.2.2	<i>Homologies entre espèces mammifères</i>	157
V.2.3	<i>Analyse comparative de l'EPCR porcine avec l'EPCR humaine</i>	158
V.3	EXPRESSION ET ACTIVITE DE L'EPCR PORCIN DANS DES CELLULES TRANSFECTEES	159
V.3.1	<i>Expression de l'EPCR porcine</i>	159
V.3.1.1	Amplification de l'ADnc de l'EPCR porcine	159
V.3.1.2	Expression de l'EPCR porcine par transfection et détection par FACS.....	159
V.3.2	<i>Marquage par l'épitope « Flag » de l'EPCR porcine</i>	161
V.3.2.1	Amplification de l'EPCR-Flag porcine.....	161
V.3.2.2	Détection de l'EPCR porcine marqué par l'épitope Flag	162
V.3.3	<i>Etude de la liaison de la Protéine C humaine avec l'EPCR porcine</i>	162
V.3.3.1	Mise au point d'une méthode détectant la liaison de la PC sur l'EPCR	162
V.3.3.2	Etude par FACS de la liaison PC humaine – EPCR porcine	164
V.4	CO-EXPRESSION IN VITRO ET ACTIVITE DU COMPLEXE TM/EPCR	164
V.4.1	<i>Co-expression in-vitro de l'EPCR porcine et de la TM porcine</i>	165
V.4.2	<i>Fonctionnalité du couple TM-EPCR porcins dans l'activation de la protéine C humaine</i>	165
V.5	DISCUSSION	166
VI.	PROJET IV : ETUDE IN VIVO DES TROUBLES DE LA COAGULATION EN XENOTRANSPLANTATION: GENERATION D'UNE SOURIS TRANSGENIQUE POUR LA MOLECULE HUMAINE EPCR.....	168
VI.1	ELABORATION DU PLASMIDE POUR MICRO-INJECTIONS.....	169

VI.1.1	<i>Expression in vitro de l'EPCR humain</i>	169
VI.1.2	<i>Préparation du plasmide H2Kb-hEPCR pour micro-injection</i>	170
VI.2	NAISSANCE ET DEPISTAGE DES SOURIS TRANSGENIQUES POUR L'EPCR HUMAIN	171
VI.2.1	<i>Phénotype des souriceaux</i>	171
VI.2.2	<i>Dépistage du transgène par PCR</i>	171
VI.2.3	<i>Expression de l'EPCR humain sur les cellules sanguines périphériques</i>	172
VI.3	PHENOTYPAGE DES SOURIS TRANSGENIQUES POUR L'EPCR HUMAIN	175
VI.3.1	<i>Expression tissulaire de l'EPCR humain</i>	175
VI.3.1.1	Détection Immunohistochimique	175
VI.3.2	<i>Caractéristiques physiques de la souris transgénique pour l'EPCR humain</i>	177
VI.3.3	<i>Paramètres hématologiques</i>	177
VI.3.4	<i>Test d'agrégation plaquettaire</i>	177
VI.3.5	<i>Temps de saignement</i>	178
VI.4	RESISTANCE DE LA SOURIS TRANSGENIQUE POUR L'EPCR HUMAIN DANS UN MODELE D'INDUCTION DE THROMBOSE EMBOLIQUE DE L'ARTERE PULMONAIRE	179
VI.5	RESISTANCE DE LA SOURIS TRANSGENIQUE POUR L'EPCR HUMAIN DANS UN MODELE D'ISCHEMIE- REPERFUSION RENALE	181
VI.5.1	<i>Evaluation de la fonction rénale après ischémie- reperfusion</i>	181
VI.5.2	<i>Evaluation histologique des lésions d'ischémie- reperfusion</i>	183
VI.6	DISCUSSION	185
VI.7	REMARQUES COMPLEMENTAIRES : RESULTATS DE LA XENOTRANSPLANTATION D'ORGANES PORCINS GAL K.O	188
VII.	PROJET V : ETUDE <i>IN VITRO</i> DES TROUBLES DE LA COAGULATION EN XENOTRANSPLANTATION : VOIE DE L'INHIBITEUR DU FACTEUR TISSULAIRE (TFPI) DANS UNE COMBINAISON PORC SUR PRIMATE	190
VII.1	ARTICLE : «RECOMBINANT PIG TFPI EFFICIENTLY REGULATES HUMAN TISSUE FACTOR PATHWAYS” XENOTRANSPLANTATION 2008: 15: 191-197.....	191
VIII.	CONCLUSION FINALE ET PERSPECTIVES	199
VIII.1	ARTICLE “THE VASCULAR AND COAGULATION ISSUES IN XENOTRANSPLANTATION” CURRENT OPINION IN ORGAN TRANSPLANTATION, 2009, APRIL; 14 (2): 161-7	200
	BIBLIOGRAPHIE.....	208

Abréviations

ADP	Adénosine Diphosphate
AA	Acide Aminé
ADN	Acide Deoxyribonucléotique
ADNc	ADN complémentaire
ALG	Globulines Anti-Lymphocytaire
AMV	Avian Myeloblastosis virus
ATIII	Anti-thrombine III
AZA	Azathioprine
BDT v3.1	BigDye Terminator v3.1
CIVD	Coagulation Intra- Vasculaire Disséminée
CS	Corticostéroïdes
CsA	Ciclosporine
CyP	Cyclophosphamide
DAF	Decay Accelerating Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EA hy926	Cellules endothéliales aortiques humaines immortalisées
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétique acide
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMBOSS	European Molecular Biology Open Software Suite
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
F	Facteur (de la coagulation)
FI	Facteur I ou fibrinogène
FII	Facteur II / Prothrombine
FIIa	Facteur II activé/ thrombine
FIII	Facteur III/ Facteur Tissulaire
FIV	Facteur IV
FV	Facteur V/ Pro-accéléline
FVII	Facteur VII/ Proconvertine
FX	Facteur X/ Facteur Stuart
FXa	Facteur X activé
FXII	Facteur XII/ Facteur Hageman
FXIII	Facteur XIII/ Facteur stabilisateur de la fibrine
Gla	Acide γ -carboxyglutamique
GSCN	Isothiocyanate de guanidium
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IdM	Infarctus du myocarde
LGA	Laboratoire des Grands Animaux
MMF	Mycophénolate Mofétil
PBL	Peripheral Blood Leucocytes
PC	Protéine C
PCa	Protéine C activée

PCR	Polymerase Chain Reaction
Pdb	Paires de bases
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RHA	Rejet Hyper Aigu
RHA	Rejet Hyper Aigu
RT	Reverse transcriptase
RVA	Rejet Vasculaire Aigu
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SMART	Switching Mechanism at 5' end of Reverse Transcript
SVAP	SV40-transformed porcine aortic endothelial cell line
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
TF	Facteur tissulaire ou Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TM	Thrombomoduline
TNF	Tumour Necrosis Factor
vWF	facteur von Willebrand
α Gal	galactose $\alpha(1,3)$ galactose

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution du nombre de greffes d'organes en France entre 2000 et 2008 selon le type d'organe transplanté.	21
Figure 2 : Evolution du nombre de malades inscrits sur liste d'attente de transplantation	22
Figure 3 : Evolution du nombre de donneurs prélevés et du taux de prélèvement par million d'habitants.	22
Figure 4 : Aspect macroscopique d'un rein ayant subi un rejet hyperaigu.	26
Figure 5 : Aspect macroscopique d'un rein ayant subi un rejet vasculaire aigu	30
Figure 6: fonctions du facteur Willebrand dans l'agrégation plaquettaire.	35
Figure 7 : Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. Le thromboxane A2 et l'ADP, activateurs plaquettaires, sont les cibles respectives de l'aspirine et des thiénoxydines. De leur côté, les anti-GPIIb/IIIa empêchent l'agrégation plaquettaire en inhibant la fixation interplaquettaire du fibrinogène (Fbg).	36
Figure 8 : Le complexe Thrombine-Thrombomoduline. La liaison de la thrombine à la TM nécessite l'exosite anionique 1 de la thrombine et les domaines EGF 4 à 6 sur la TM. (Esmon, CHEST, 2003, 124)	43
Figure 9 : Structure de la TM. La TM est constituée d'une extrémité N-terminale formée d'un Lectin-like domaine et de 6 modules EGF, suivie d'un domaine riche en sérine- thréonine, d'un domaine trans- membranaire, et d'une queue intra-cytoplasmique C- terminale	45
Figure 10 : Complexe prothrombinase formé par l'association du facteur Xa et Va.	47
Figure 11 : structure des récepteurs couplés aux G protéines avec 7 domaines transmembranaires	49
Figure 12 : Structure de la protéine C.....	50
Figure 13 : Rôle de la protéine C dans le rétrocontrôle de la coagulation. La thrombine générée par les complexes VIIIa-Ixa ou Va-Xa peut soit activer la formation de fibrine ou soit se lier à la TM pour rapidement activer la protéine C. Ce processus est activé lorsque la prtéine C se lie à l'EPCR. Dès que la protéine C activée se dissocie de l'EPCR, elle se fixe à la protéine S pour inactiver les facteurs Va et VIIIa (Esmon, Chest 2003; 124:26S)	54
Figure 14 : Photo officielle des experts réunis à Changsha sous l'égide de l'OMS.	63
Figure 15 : schématisation de la permutation du domaine EGF4 entre la TM humaine et la TM porcine. Pour la construction de chaque variant, 3 PCR initiales étaient réalisées (PCR-1, PCR-2, PCR-3) séparément soit à partir de l'ADNc de TM humaine ou à partir de l'ADNc de TM porcine.	78
Figure 16 : schématisation de l'évaluation de la liaison de la thrombine à la TM en mesurant la concentration en thrombine libre résiduelle après incubation pendant 10min de thrombine avec des cellules COS-7 exprimant la TM (humaine ou porcine). La diminution en thrombine libre était considérée comme un reflet de la fixation de la thrombine sur la TM.	85
Figure 17: Sites de fixation des amorces pour l'amplification théorique de l'ADNc codant pour la TM porcine. Les amorces « sens » sont situées au-dessus de l'ADNc et les amorces « anti-sens » en dessous. La longueur du cadre de lecture et de la « partie non codante » est un consensus entre la séquence d'ADNc codant pour la TM bovine(Jackman et al. 1986), la TM humaine (Jackman et al. 1987; Suzuki et al. 1987; Wen et al. 1987), la TM murine(Dittman et al. 1988; Dittman et al. 1989), la TM de lapin(Deming et al. 2003) et la TM de rat(Wang et al. 1999).	118
Figure 18: Amplification d'un fragment d'ADNc de TM de taille attendue en utilisant différents cocktails (A à I) du système Failsafe™ et les amorces 182 et 987.	118
Figure 19 : Amplification d'un fragment d'ADNc de la TM porcine par le système Failsafe (cocktails D à K) avec les amorces 182 et 987 et le contrôle positif humain correspondant (H = humain (ADNc provenant de cellules EAhy926), P = porcin (poumon total)).	119
Figure 20 : Expression de l'ARNm de la TM porcine dans les cellules SVAPs. (amorces 182 and 987). (4 ^{ème} ligne à droite). Contrôle positif avec de l'ADNc de cellules EAhy926.	119
Figure 21: Fragments de la TM porcine générés selon différentes combinaisons d'amorce : 182, 320, GSP2, GSP2D avec 987, 1691, 3'hUTR 1750 et 3'bUTR (9 = amorce 987, 16 = 1691, h = 3' hUTR 1750, b = 3'bUTR 1750).	120
Figure 22 : Amplicon contenant le codon STOP de l'ADNc de la TM porcine obtenu avec les amorces 1620/3'HTM STOP et 1630/3'bTM.	121
Figure 23 : Séquences nucléique et protidique attendue de la TM porcine. La séquence protéique est située au-dessus de la séquence nucléique. La séquence du peptide signal comprenant 16 résidus est suivie par le domaine riche en lectine (en italique), une région hydrophobique (soulignée par des pointillées), six domaines EGF-like (en double soulignage), la région riche en sérine- thréonine (entre les flèches), le domaine transmembranaire (en soulignage simple) puis par la queue intra-cytoplasmique (résidu de 34 AA). Les sites potentiels de N-glycosylation sont encadrés. La séquence nucléique de la TM porcine est référencée dans GenBank au numéro EF692640.....	122

Figure 24 : Analyse comparatives des domaines EGF3 à EGF6. Les Résidus fonctionnellement important des domaines EGF3 à EGF6 pour l'activation de la protéine C ou de TAFI sont hautement conservés dans la TM porcine. Les nombres représentent la position des AA dans la protéine mature. Les résidus de la TM humaine ayant montrés un rôle fonctionnel important sont indiqués par un cercle sous la séquence. Les sites de N-glycolysation sont soulignés.	124
Figure 25 : Evolution phylogénique de la TM.	125
Figure 26 : Détection par FACS de l'expression de la TM porcine avec l'Ac anti-TM 1A4 après transfection de cellules COS-7 par le vecteur pBOS-pTM. Aucune détection avec l'Ac 1A4 n'a pu être possible par rapport à la molécule humaine, ainsi qu'avec l'Ac CD 141 (ligne verte).	126
Figure 27 : Représentation schématique de la TM porcine dotée d'un épitope FLAG pour permettre la détection de la molécule.	127
Figure 28 : Détection des TM-flag humaine et porcine par FACS (à gauche) et par Western Blot (à Droite) à partir de cellules COS-7 transfectées avec pBos-hTM-Flag (H) , pBos-pTM-Flag (P) et vecteur seul (V). L'expression était similaire entre les deux espèces par FACS et par Western Blot.....	127
Figure 29 : Schématisation de la détection de la liaison de la thrombine sur la TM par FACS.	128
Figure 30 : Evaluation de la liaison TM- thrombine par calcul de la quantité de thrombine fixée à la TM. La liaison de la thrombine à la TM était similaire quelque soit le type de thrombine (humaine ou porcine) et quelque soit la TM (humaine (H) ou porcine (P)).	129
Figure 31 : Activités de co-facteur d'activation de la PC par la TM humaine (H) et par la TM porcine (P) avec soit la thrombine humaine (à gauche) ou soit la thrombine porcine (à droite). La TM porcine est un co-facteur inefficace d'activation de la PC humaine par la thrombine humaine ou porcine. Les valeurs représentaient les résultats d'au moins 3 procédures indépendantes. Le symbole (§) représente une différence statistiquement significative.	130
Figure 32 : Activation de la PC porcine par des cellules exprimant la TM porcine et humaine incubées avec de la thrombine porcine et du plasma de porc appauvrie en plaquettes et contenant de la protéine C porcine.	131
Figure 33 : Variants de la TM humaine avec différents domaines EGF substitués par des domaines EGF porcins correspondants: hTMpEGF4, hTMpEGF5, hTMpEGF6 et hTMpEGF5-6.....	132
Figure 34 : Variants de la TM porcine avec différents domaines EGF substitués par des domaines EGF humains correspondants: pTMhEGF4, pTMhEGF5, pTMhEGF6 et pTMhEGF5-6.	132
Figure 35 : Activation de la PC humaine par des variants hybrides de la TM humaine et de la TM porcine avec de la thrombine humaine. Ces variants étaient exprimés par des cellules COS-7 transfectées. Les domaines substitués sont représentés par P4 pour l'EGF4 porcine, H4 pour l'EGF humain ect... L'absence de substitution est représentée par - . Comparativement à la TM humaine, seuls des variants contenant le domaine EGF5 humain présentaient au moins 20% de l'activité de co-facteur pour l'activation de la PC humaine. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne et écart- type de 3 procédures indépendantes.	133
Figure 36 : Activation de la PC humaine par des variants hybrides de la TM humaine et de la TM porcine avec de la thrombine porcine. L'utilisation de thrombine porcine n'a apporté aucune modification sur l'activation de la PC par les variants.	133
Figure 37 : Détection de l'activation de TAFI. Des cellules COS-7 exprimant la TM humaine (H), la TM porcine (P) ou le vecteur plasmidique seul (V) étaient incubées avec de la thrombine humaine et TAFI pendant 15 ou 30 minutes et après arrêt de la réaction par un inhibiteur de la thrombine PPACK, le supernageant était prélevé pour être analysé par électrophorèse sur gel polyacrylamide et coloré avec du bleu de Coomassie. Les symboles suivant correspondaient pour chaque ligne à : (-) thrombine et TAFI seul, (M) marqueurs moléculaires de poids, (+) TM humaine incubée avec la thrombine et TAFI pendant 30 min. L'activation de TAFI, indiquée par l'apparition d'un domaine catalytique de 36 kDa, était seulement détectable pour la TM humaine.	134
Figure 38 : Alignement des séquences en acides aminés de la chaîne B de la thrombine porcine (P, ligne supérieure) et humaine (H, ligne inférieure) montrant le degré très élevé de conservation entre les deux espèces, notamment au niveau des résidus fonctionnellement important indiqués par un symbole sous la séquence. La séquence de l'ADNc de la prothrombine de porc est disponible dans GenBank au numéro EF692642.	136
Figure 39 : Amplification de l'ADNc de l'EPCR porcine. Plusieurs fragments de taille attendue ont été isolés à partir d'ADNc de poumon porcine. (H : ADNc humain à partir de cellules EAhy926, P : ADNc porcine, W : pas d'ADNc). Les amorces sens sont listées sur la première ligne du gel et les amorces anti-sens sur la 2 ^{ème} ligne.	153
Figure 40 : Amplification de l'EPCR porcine en utilisant l'amorce 5' EPCR 0 et EGSP1B et EGSP1C comme amorce « reverse ».	154
Figure 41 : Amplification de la région 5' non traduite de l'EPCR porcine en utilisant les amorces hUTR, bUTR avec les amorces 683 ou R1.	154
Figure 42 : cadre de lecture et sites de digestion enzymatique de l'EPCR porcine.....	155
Figure 43 : Séquences nucléotidique et protéinique de l'EPCR porcine. La séquence protéinique attendue est située au dessus de la séquence nucléique et la position est indiquée sur la droite. Le surlignage à une ligne représente le	

signal peptide et le surlignage à deux lignes représente le domaine transmembranaire. Les résidus pour une éventuelle N-glycosylation sont encadrés. Les résidus cystéine extra-cellulaires sont encerclés.	156
Figure 44 : Arbre phylogénique de l'EPCR basé sur l'homologie de séquence protéique.....	157
Figure 45 : Alignement des séquences protéiques de l'EPCR porcin avec l'EPCR humain. Le signal peptide est souligné par une ligne et le domaine similaire au CMH I/CD1 par un double soulignage. Le domaine transmembranaire est souligné par des tirets. Les AA essentiels pour la fixation de la PC sont coloriés en gris et les mismatches important pour cette liaison sont indiqués par un astérisque sous les séquences.	158
Figure 46 : Amplification PCR par la Pfx de l'ADNc de l'EPCR porcin (à gauche) et schématisation de son intégration dans le vecteur pIRES (à droite).....	159
Figure 47 : Détection par FACS de l'EPCR porcin par un Ac monoclonal anti-EPCR humain (anti-CD201) (A), par un Ac polyclonal anti-EPCR humain (B). Contrôle positif (C) avec des cellules exprimant l'EPCR humain.	160
Figure 48 : Schématisation du marquage Flag de l'EPCR porcin.	161
Figure 49 : Amplification PCR de l'EPCR porcin avec les amorces pEPCR-F2 et pEPCR-R2 afin d'intégrer un site MluI à chaque extrémité du cadre de lecture et en utilisant différentes concentration de Pfx enhancer (résultats en duplicat).	161
Figure 50 : Détection par FACS de l'expression cellulaire de l'EPCR-Flag porcin par un Ac anti-flag (en haut) et par l'Ac monoclonal anti-CD201 (en bas).	162
Figure 51 : Vérification de l'expression cellulaire de l'EPCR humain dans les cellules Eahy par FACS	163
Figure 52 : Schématisation de la détection de la fixation de la PC sur l'EPCR par une méthode cellulaire et par FACS.	163
Figure 53 : Détection par FACS de la PC humaine après sa fixation sur des cellules Eahy 926. La fixation de la PC humaine a été testée à différentes concentration (0,3mM, 0,6 mM et 0,9 mM).	164
Figure 54 : Détection par FACS de la fixation de la PC humaine sur des cellules exprimant l'EPCR porcin. Les 3 courbes représentent 3 concentrations différentes de PC (0.3 mM ; 0.6mM et 0.9 mM).	164
Figure 55 : Activation de la PC par la TM porcine seule ou en association avec l'EPCR porcin ou humain. Détection par spectrophotométrie (Spectrozyme essay)	166
Figure 56 : Amplification PCR du cadre de lecture de l'EPCR humain avec les amorces hEPCR-F3 et hEPCR-R3.....	169
Figure 57 : Cartographie du vecteur pCR-Blunt-hEPCR.....	169
Figure 58 : Détection par FACS de l'expression cellulaire de l'EPCR humain après transfection de cellules COS-7 par pBos-hEPCR afin de vérifier l'intégrité du transgène avant micro-injection.....	170
Figure 59 : Cartographie du plasmide H2Kb-hEPCR utilisé lors des micro-injections.	171
Figure 60 : Dépistage par PCR de la présence dans le génome des souris du transgène hEPCR.	172
Figure 61 : Dépistage de l'expression de l'EPCR humain chez les 7 souris porteuses du transgène. Cinq souris exprimaient la molécule à des niveaux différents. Les animaux les plus expresseurs étaient les souris JCR 1332.3 (++++), JCR 1333.2 (++) et JCR 1336.5 (+++).	173
Figure 62 : Répertoire des différentes lignées de souris transgénique après micro-injection pour l'EPCR humain.	174
Figure 63 : Marquage du transgène EPCR humain par immuno-histochimie	176
Figure 64 : Test d'agrégation plaquettaire de plaquettes issues d'animaux transgéniques pour l'EPCR humain (lignes bleue et noire) et non-transgéniques (lignes rouge et verte).....	178
Figure 65 : Temps de saignement obtenu après section de la queue des animaux transgéniques pour l'EPCR humaine par rapport à des animaux non- transgéniques.	179
Figure 66 : Survie après induction d'une embolie pulmonaire chez des souris sauvages par rapport à des souris transgéniques pour l'EPCR humain.....	180
Figure 67 : Taux de créatininémie 24 heures après ischémie- reperfusion rénale.	182
Figure 68 : Taux d'urée 24 heures après ischémie- reperfusion rénale.....	182
Figure 69 : Quantification des lésions histologiques et du nombre d'apoptose observées dans les 3 groupes d'animaux 24 heures après ischémie- reperfusion.	184
Figure 70 : Coupes histologiques des lésions rénales après ischémie- reperfusion et détection des corps apoptotiques.	185

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Premières expériences cliniques en xénotransplantation à partir de primates non-humains.	23
Tableau 2 : Résultats des premières xénotransplantations d'organes porcins non- transgéniques chez des primates avec ou sans protocole immunosuppresseur.....	24
Tableau 3 : Résultats des premières xénotransplantations chez le singe à partir d'organes transgéniques pour des molécules contrôlant l'activation du complément (hCD55 et/ou hCD59).	25
Tableau 4 : Distribution réciproque de l'épitope Gal et des anticorps naturels anti-Gal chez les mammifères.	27
Tableau 5 : Caractéristiques des facteurs de la coagulation	38
Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la création de variants de la TM avec des domaines EGF permutés entre la TM humaine et la TM porcine.	75
Tableau 7 : Amorces utilisées pour générer des variants de la TM avec des domaines EGF permutés entre la TM humaine et porcine.	75
Tableau 8 : Niveaux d'homologies de la TM porcine avec la TM des autres espèces mammifères (exprimés en % d'identités d'acides aminés).....	123
Tableau 9 : Niveaux d'homologie de la TM entre différents mammifères. (hTM : TM humaine, mTM : TM de souris, rTM : TM de rat, oTM : Tm de lapin).....	125
Tableau 10 : Niveaux d'homologies dans la séquence peptidique de l'EPCR porcine avec d'autres espèces mammifères (h : humain, b : bovin, m : murin, p : porcine).	157
Tableau 11 : Conditions expérimentales du modèle d'induction de thrombose jugulaire.	180
Tableau 12 : Evaluation de la fonction rénale 24 heures après ischémie- reperfusion rénale par la mesure des taux sanguins en urée et créatinine.	181
Tableau 13 : Scores histologiques des lésions post-ischémie reperfusion des trois groupes d'animaux (factice, sauvage et transgénique).....	183

PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES:

- G. Lamirault, N. Le Meur, **JC Roussel**, MF Le Cunff, D. Baron, A. Bihouée, I. Guisle, M. Raharijaona, G. Ramstein, JN Trochu, JJ Léger, R Houlgatte, Marja Steenman « Molecular risk stratification in advanced heart failure patients » **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. *In press*
- Peter J. Cowan, **JC Roussel** and Anthony J.F. d'Apice. "The Vascular and Coagulation issues in Xenotransplantation" **Current Opinion in Organ Transplantation**, April 2009, 14(2):161-167.
- **JC Roussel**, CJ Moran, EJ Salvaris, AJF d'Apice and P Cowan « Pig Thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI" **American Journal of Transplantation**, 2008;8:1-12.
- Lee KF, Salvaris EJ, **Roussel J-C**, Robson SC, d'Apice AJF, Cowan PJ. "Recombinant pig TFPI efficiently regulate human tissue factor pathways". **Xenotransplantation** 2008;15:191-197
- **JC Roussel**, J. Ashton, J.P Soulillou, J.L Michaud, P. Despins, D. Duveau, G. Blancho. «Xénotransplantation: l'obstacle du rejet vas culaire aigu. » **J Chir Thorac Cardio-Vasc**. 2005, IX (1).
- Peche H, van Denderen B, **Roussel JC**, Trinite B, Soulillou JP, Cuturi MC « Presentation of donor major histocompatibility complex class II antigens by dna vaccination prolongs heart allograft survival" **Transplantation**. 2004 Mar 15;77(5):733
- P. Mathieu, **J.C. Roussel**, I. Anegon. « Cartilaginous metaplasia and calcification in aortic allograft associated with transforming growth factor beta 1 expression ». **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2003 Nov ; 126 (5) :1449-54.
- J. Ashton-Chess, **JC Roussel**, P. Bernard, N.Barreau, G. Karam, J.Dantal, A. Moreau, E.Cossi, D.Minault, JP Soulillou and G. Blancho. « The effect of immunoglobulin immunoadsptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons ». **Xenotransplantation** 2003, Nov ; 10(6) :552-561.
- J. Ashton-Chess, **JC Roussel**, R. Manez, C.Ruiz, A. Moreau, E.Cossi, D.Minault, JP Soulillou and G. Blancho. « Cellular participation in Delayed Xenograft Rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons ». **Xenotransplantation** 2003 sep ;10(5) :446-53.
- Petzold T, Barreau N, Ashton-Chess J, Edan G, Boulday G, **Roussel JC**, Le berre L, Minault D, Soulillou JP, Blancho G. « **The effect of mitoxantrone on anti-pig immunization in baboons.** » **Xenotransplantation**. 2003 Sep ;10(5) :422-31
- Chauveau C, Bouchet D, **Roussel JC**, Mathieu P, Braudeau C, Renaudin K, Tesson L, Soulillou JP, Iyer S, Buelow R, Anegon I. « Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection ». **Am J Transplant**. 2002 Aug ; 2(7) :581-92.
- Bouchet D, Chauveau C, **Roussel JC**, Mathieu P, Braudeau C, Tesson L, Soulillou JP, Iyer S, Buelow R, Anegon I. « Inhibition of graft arteriosclerosis development in rat aortas following heme oxygenase-1 gene transfer ». **Transpl Immunol**. 2002 May ; 9(2-4) :235-8.

PRESENTATIONS ORALES SCIENTIFIQUES:

- ✓ E Lee, **JC Roussel**, B Lu, L Murray-Segal, O Ischenko, A d'Apice, P Cowan, H Gock "Transgenic overexpression of human EPCR confers protection against inflammation and coagulation" The Transplantation Congress, Sydney, Australia. Aout 2008
- ✓ E Lee, **JC Roussel**, B Lu, L Murray-Segal, O Ischenko, A d'Apice, P Cowan, H Gock "Transgenic overexpression of human EPCR confers protection against inflammation and coagulation" St Vincent's Hospital's Research Week 2008 – Melbourne – Australie
- ✓ E Lee, H Gock, **JC Roussel**, O Ischenko, A d'Apice, P Cowan " Generation and analysis of transgenic mice expressing human EPCR" International Xenotransplantation Association Conference, Minneapolis, USA Septembre 2007
- ✓ **JC Roussel**, C Moran, A d'Apice, P Cowan "Molecular Basis for the Failure of Pig Thrombomodulin to Activate the Human Protein C Pathway" **American Transplant Congress**. Seattle USA. Mai 2005
- ✓ **JC Roussel**, C Moran, A d'Apice, P Cowan "Molecular Basis for the Failure of Pig Thrombomodulin to Activate the Human Protein C Pathway" **Transplantation Society of Australia and New Zealand** – Canberra. Australie. 13 Mai 2005
- ✓ **JC Roussel** J Ashton, E Cozzi, JP Souillou, JL Michaud . « **Xénotransplantation : l'obstacle du rejet vasculaire aigu** ». **Congrès de la société francophone de chirurgie thoracique et cardio-vasculaire**. Juin 2001. Paris.

POSTERS SCIENTIFIQUES:

- ✓ **JC Roussel**, C Moran, A d'Apice, P Cowan "Investigation of potential causes of xenograft thrombosis". St Vincent's Health Research Week – Melbourne. Australie. 1 septembre 2004.

INTRODUCTION

Perçue comme une source potentielle d'organe depuis les années 1990, la xénotransplantation, qui correspond à l'utilisation chez l'homme d'organes d'origine animale, a été confrontée à de nombreux obstacles souvent considérés comme insurmontables. Grâce aux avancées médicales dans le domaine de l'immunologie, la génétique et le clonage, les mécanismes de rejets ont été de mieux en mieux étudiés et ont permis une amélioration significative de la survie des xénogreffes.

L'animal donneur choisi par la communauté scientifique est le porc depuis l'éviction du singe comme source d'organe, en raison du risque de transmissions de rétrovirus vers l'homme trop important (Gao et al. 1999). Néanmoins, d'un point de vue immunologique, la barrière d'espèce entre l'homme et le porc est telle que les organes transplantés sont soumis à des réponses complexes et multiples responsables de rejets très puissants et rapides. L'homme possède en effet des anticorps (Ac) naturels ou préformés dirigés contre les antigènes (Gal $\alpha(1,3)$ Gal) exprimés chez l'ensemble des mammifères non primates. L'absence ou la présence de ces anticorps naturels chez le receveur définit respectivement le caractère concordant ou discordant de la xénotransplantation (Calne 1970). Ainsi une xénogreffe d'un organe porcine chez un primate porteur de ces Ac est qualifiée comme discordante et se heurte à un rejet rapide (de quelques minutes à quelques heures) appelé rejet hyperaigu (RHA). Celui-ci est secondaire à l'activation du complément par la reconnaissance de ces Ac pour leur cible. L'importance de ce rejet est amplifiée par l'incapacité des molécules porcines régulatrices du complément (CD55 ou CD59) à bloquer l'activation du complément humain. L'obstacle du rejet hyperaigu a été surmonté dans les années 1995-2000 par diverses techniques visant à dépléter les Ac (plasmaphérèse, immunoadsorption, anticorps anti- μ) ou par le recours à des organes issus d'animaux transgéniques exprimant des molécules humaines capables de contrôler l'activation du complément. Ainsi des organes provenant de tels animaux, greffés à des primates recevant par ailleurs un régime immunosuppresseur important, ont pu montrer des survies atteignant jusqu'à 2 mois. Cependant, il se développait secondairement dans les jours ou semaines suivantes un autre type de rejet, également très puissant appelé rejet vasculaire aigu. De médiation cellulaire et humorale, ce type de rejet paraissait impossible à vaincre tant que la barrière immunologique d'espèce serait présente. Ainsi, l'obtention d'animaux Gal knock-out n'exprimant pas l'antigène Gal, relança tous les espoirs de la xénotransplantation au début des années 2000. Les survies obtenues avaient réellement progressé mais un autre problème apparaissait à type de micro-angiopathie thrombotique à l'origine d'une perte du greffon. Les causes précises de cette atteinte de la microcirculation étaient probablement multifactorielles, associant des facteurs immunologiques (ex : activation endothéliale par des anticorps induits avec apparition d'un environnement pro-coagulant) et non- immunologiques avec une possible incompatibilité moléculaire d'espèce des mécanismes de régulation de l'hémostase entre le porc et le primate. Ainsi, une barrière physiologique venait probablement se surajouter à la barrière immunologique. Un nouveau domaine scientifique concernant de potentielles incompatibilités moléculaires d'espèce restait à explorer.

Le service de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire du CHU de Nantes dans lequel je travaille, a débuté un programme de transplantation cardiaque, cardio-pulmonaire et pulmonaire depuis les années 1985- 1990 avec une première transplantation cardiaque effectuée le 22 mars 1985. Depuis, plus de 600 greffes cardiaques et près de 250 transplantations pulmonaires ou cardio-pulmonaires ont été réalisées dans notre service. L'expérience et le travail de l'équipe Nantaise ont permis d'obtenir des taux de survie à 10 ans et 15 ans fort honorables (Roussel et al. 2008) pour des patients qui avaient un pronostic initial de survie de quelques mois. Parallèlement, un programme d'assistance circulatoire artificielle s'est développé dans notre département en raison de la nécessité de prendre en charge des patients en défaillance cardiaque gravissime en l'absence de greffon disponible (Baron et al. 2003; Roussel et al. 2009). Cette pénurie de greffon et les effets délétères du régime immunosuppresseur ont amené également plusieurs équipes de transplantation à proposer une assistance circulatoire en alternative à la transplantation cardiaque chez des patients ayant dépassés un âge limite, variable selon les centres, ou en cas de contre-indication à la transplantation comme un antécédent récent de néoplasie. C'est donc dans cet esprit « d'alternative » à l'allogreffe cardiaque que notre service a trouvé un intérêt à la xénotransplantation et m'a conduit à travailler avec l'équipe du Pr Gilles Blancho de l'unité INSERM U643 dirigée à l'époque par le Pr Souillou. Cette unité développait plusieurs thématiques de recherche en xénotransplantation, notamment un modèle porc-primate au sein du laboratoire des grands animaux. Cette équipe, qui m'a accueilli au début des années 2000, étudiait plus particulièrement la xénotransplantation de reins de porcs transgéniques chez le babouin. Ce primate présentait l'intérêt avec le macaque, de posséder des Ac naturels de même nature que ceux de l'homme, permettant ainsi d'en faire un modèle superposable à la situation humaine. Après avoir étudié ce modèle pré-clinique, quasi unique en France, j'ai eu l'opportunité de continuer mes travaux dans le laboratoire du Pr d'Apice à Melbourne, où j'ai pu profiter de leur expertise dans le domaine de l'hémostase en xénotransplantation et dans le domaine de la transgénèse sous la direction du Pr Peter Cowan.

I. REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 PENURIE DE GREFFONS (DONNEES ISSUES DE L'AGENCE DE BIOMEDECINE)

De 2000 à 2008, la greffe d'organe a connu un essor important en France puisque le nombre de personnes prélevées a augmenté de 54% et le nombre de greffes de 44% (données issues de l'Agence de la Biomédecine) (Figure 1). Malgré cela, le besoin en greffons ne cesse de croître et la hausse de l'activité ne suffit pas à le couvrir (Figure 2, Figure 3). En 2008, 222 patients sont décédés sur liste d'attente alors que 4620 greffes ont été réalisées et 1563 personnes ont été prélevées.

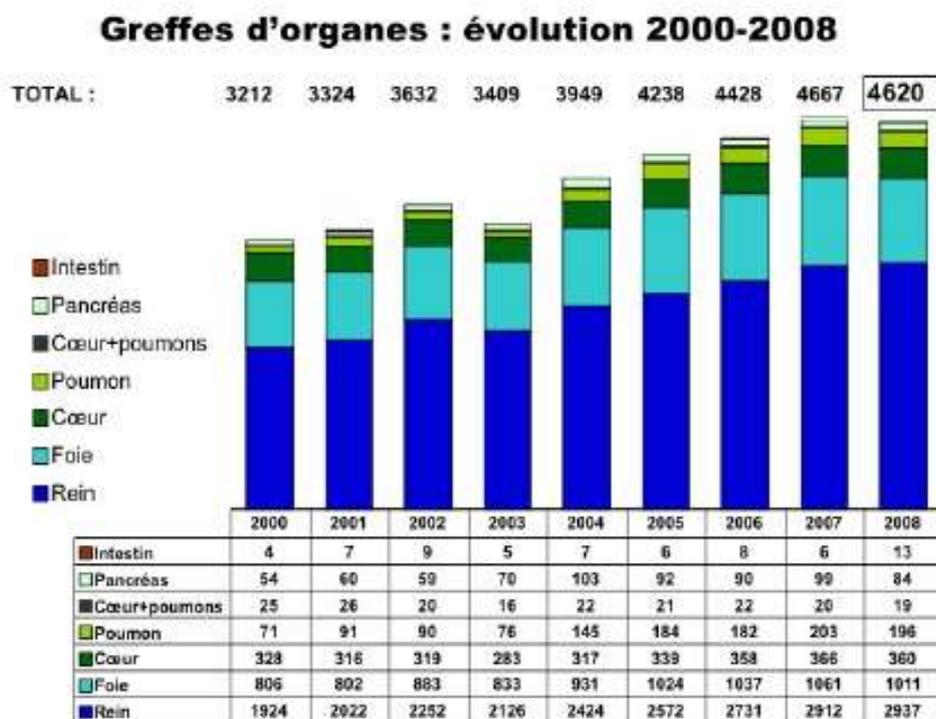


Figure 1 : Evolution du nombre de greffes d'organes en France entre 2000 et 2008 selon le type d'organe transplanté.

Les raisons de cette augmentation en besoins en greffon sont multiples. La transplantation, par ces très bons résultats en terme de durée et de qualité de vie c'est imposée comme le traitement de référence pour de nombreuses pathologies terminales, quelque soit l'organe. Les situations dans lesquelles une greffe est recommandée sont de plus en plus nombreuses et diversifiées. Le vieillissement de la population générale favorise également les problèmes de santé menant à une greffe et parallèlement, le vieillissement de la population des transplantés s'accompagne d'une augmentation du risque de retransplantation pour les patients en rejet chronique terminal. Ainsi, chaque année le nombre de personnes inscrites en liste d'attente progresse, tout comme la durée d'attente du greffon qui peut atteindre maintenant plusieurs années (Figure 2).

Liste d'attente : évolution 2003-2008

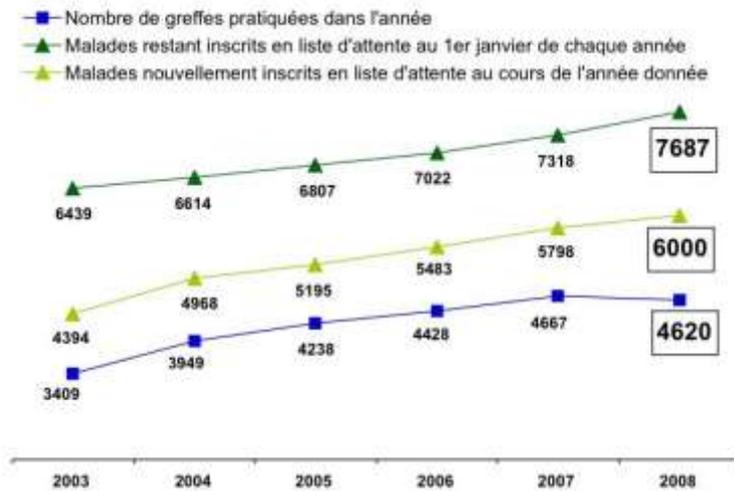


Figure 2 : Evolution du nombre de malades inscrits sur liste d'attente de transplantation

Moins de 1% des personnes qui décèdent à l'hôpital sont en état de mort encéphalique ; or cette source d'organes représente 95% des greffes réalisées en France. Malgré la possibilité d'élargir les prélèvements à des donneurs vivants ou à des donneurs décédés après un arrêt cardiaque, les différentes campagnes de sensibilisation n'ont pas permis d'augmenter suffisamment le nombre de prélèvements d'organes en France. Actuellement, près d'un prélèvement possible sur trois est refusé. Dans près de 4 cas sur 10, c'est parce que le défunt a déclaré son opposition au don d'organes durant sa vie. Dans les 6 autres cas, l'opposition vient de la famille. Le manque d'informations sur la volonté du défunt semblerait être une des principales causes de refus de la famille.

Prélèvements d'organes : évolution 2001-2008 (donneurs décédés en état de mort encéphalique)

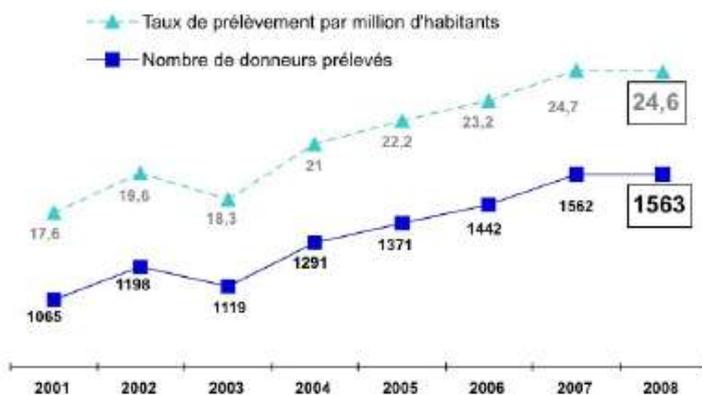


Figure 3 : Evolution du nombre de donneurs prélevés et du taux de prélèvement par million d'habitants.

I.2 HISTOIRE DE LA XENOTRANSPLANTATION

La xénotransplantation n'est pas une idée nouvelle puisque les premières publications médicales remontent en 1906, où Jaboulay décrivait à Lyon, deux tentatives de greffe de rein, l'un de porc et l'autre de chèvre, chez deux jeunes femmes atteintes d'urémie terminale. Auparavant, Alexis Carrel (Lyon) publiait pour la première fois des travaux de greffes vascularisées de reins au cou de chiens avec émission d'urine sur une courte période. D'autres tentatives infructueuses furent décrites dans les années suivantes.

Alors que l'allogreffe humaine débutait dans les années 1950 avec la première transplantation rénale en 1952 sur le jeune Marius Renard par l'équipe de Louis Michon à l'hôpital Necker, Reemtsma relança la xénotransplantation en 1963 en greffant des reins de chimpanzés sur des humains. Un patient put vivre plus de 9 mois avant de décéder de complications secondaires à l'immunosuppression qui associait irradiation, actinomycine C, azathioprine et stéroïdes. Ces travaux initièrent d'autres tentatives avec comme animal donneur le singe, du fait de sa proximité avec l'homme. (Tableau 1)

Année	Nom	Animal donneur	Organe prélevé	Survie
1964	Reemtsma	Chimpanzé	Rein	9 mois
1964	Hitchcock	Babouin	Rein	4 jours
1964	Starzl	Babouin	Rein	2 mois
1964	Hardy	Chimpanzé	Cœur	Insuffisance cardiaque
1969-74	Starzl	Chimpanzé	Foie	14 jours
1977	Barnard	Babouin	Cœur	Rejet aigu
1977	Barnard	Chimpanzé	Cœur	4 jours
1985	Bailey	Babouin	Cœur	4 semaines
1992	Starzl	Babouin	Foie	70 jours

Tableau 1 : Premières expériences cliniques en xénotransplantation à partir de primates non-humains.

La diffusion des techniques d'hémodialyse et les résultats en constante amélioration des greffes à partir de donneurs humains mettront fin à cette deuxième époque de la xénotransplantation.

En 1984, on observe à nouveau un regain d'intérêt avec Bailey qui transplanta un cœur de babouin chez un nouveau-né surnommé « Baby Fae » (Bailey et al. 1985). D'autres transplantations suivirent, toujours à partir du singe et en utilisant notamment le foie comme xéno-organe. Cependant, à partir des années 1990, le risque de transmission virale et en particulier de rétrovirus de primates chez l'homme apparaît comme très élevé. Le HIV pourrait être une zoonose provenant du singe (Gao et al. 1999). Le recours aux primates à visée de greffe est alors complètement remis en cause et abandonné. Parallèlement, un débat éthique très important apparaît sur le droit de disposer, en dehors de la recherche, de colonies de primates dévolus à la transplantation humaine.

Ainsi scientifiques et transplantateurs identifiaient le porc comme autre animal donneur d'organes. Cet animal présentait en effet des caractéristiques de taille et de physiologie proches de celles de l'homme, des conditions d'élevages simples et ne soulevait pas de débat éthique passionné. Enfin, il était désormais possible d'appliquer la technique de transgénèse chez le porc et d'obtenir des animaux génétiquement modifiés en vue de prévenir les réactions de rejet.

Néanmoins le recours aux primates était toujours indispensable car avant d'envisager tout essai clinique de xénotransplantation chez l'homme, un modèle pré-clinique sur des grands animaux devait confirmer la faisabilité d'un tel geste. Ainsi, les travaux de xénotransplantation à partir de greffon porcin ont été effectués sur des singes comme receveur, cela représentait un modèle superposable à l'homme. La grande majorité des travaux réalisés concernait des xéno greffes de cœur de porc chez le babouin. En quelques heures, ces organes étaient très rapidement rejetés malgré un lourd traitement immunosuppresseur (Tableau 2).

Auteur	Receveur	Greffon porcin	Traitement	Survie de greffe
Calne (1968)	Babouin	Foie	CS + AZA	6h-3 jours
Calne (1970)	Rhésus	Foie	ALG	<12h
Cooper (1988)	Babouin	Cœur	Aucun	<8h
			SPx	<8h
			CsA+ CS	2h-5jours
Fischel (1992)	Rhésus	Cœur	Aucun	2h
Leventhal (1993)	Babouin	Cœur	Aucun	90min
Kawauchi (1994)	Macaques du japon	Cœur	Aucun	<14 min
			Splénect + FK506	30 min
Ye (1994)	Babouin	Cœur	CsA+CyP+MTX+CS	15 min
Kaplon (1995)	Babouin	Cœur	Aucun	<82h
Kaplon (1995)	Cynomolgus	Poumon	Aucun	7-9h
Magee (1995)	Cynomolgus	Cœur	Ig+SPx+CsA+AZA+CS	2h-7 jours
	Babouin	Coeur	Idem+IA	7-10 jours
Kobayashi (1996)	Babouin	Cœur	CsA±CyP±CS±MTX±	15-40 min
Michler (Michler, 1996)	Babouin	Cœur	Aucun	15-96h
Sanfilippo (1996)	Cynomolgus	Cœur	Aucun	1h
			CsA+CyP+CS	1h
White (1996)	Cynomolgus	Cœur	Aucun	45 min
Luo (1996)	Babouin	Foie	CsA+CyP+CS	2h
Shah (1997)	Babouin	Poumon	Aucun	<4h
Itescu (1997)	Babouin	Cœur	CsA+CyP+CS	6 jours
O'Hair (1998)	Babouin	Cœur	Ig+MMF	24h
Minanov (1998)	Babouin	Cœur	Aucun	<4jours
			CsA+MMF+CS	<6jours
Yeatman (1998)	Babouin	Poumon	Aucun	<30 min
Daggett (1998)	Babouin	Poumon	Aucun	<30 min

Tableau 2 : Résultats des premières xénotransplantations d'organes porcins non- transgéniques chez des primates avec ou sans protocole immunosuppresseur

Ce rejet très puissant, appelé Rejet Hyperaigu semblait être un obstacle quasi insurmontable jusqu'à l'avènement de porcs transgéniques pour des molécules humaines contrôlant l'activation du complément

CD55 et/ou CD59. Ces premiers porcs transgéniques permirent d'obtenir des survies beaucoup plus longues, pouvant atteindre plusieurs mois mais toujours au prix d'une très forte immunosuppression (Tableau 3).

Auteur/Année	Receveur	Greffon porcin	Traitement	Survie de greffe
McCurry (1995)	Babouin	Cœur	HCD55+hCD59+SPx+CyP+ AZA+CS+IA	4-30h
Norin (1996)	Babouin	Poumon	hCD59	<12h
White (1995- 1996)	Cynomolgus	Cœur	hCD55	5 jours
Cozzi (1995-1997)	Cynomolgus	Cœur	hCD55+CsA+CyP+CS	6-62 jours
Kroshus (1997)	Babouin	Cœur	hCD59+IA+SPx+CsA+CS+MTX	<10 jours
Lin (1997)	Babouin	Cœur	hCD59/hCD55+IA+CsA+CyP+CS	<29 jours
Daggett (1998)	Babouin	Poumon	hCD55/hCD59 hCD55/hCD59+IA	<4h <24h
Waterworth (1998)	Babouin	Cœur	hCD55	2-21 jours
Yeatman (1998)	Babouins	Poumon	hCD55+hCD59	<3h
Bhatti (1999)	Babouin	Cœur	hCD55+CsA+CyP+CS hCD55+CsA+CyP+CS+SPx	3 mois

Tableau 3 : Résultats des premières xénotransplantations chez le singe à partir d'organes transgéniques pour des molécules contrôlant l'activation du complément (hCD55 et/ou hCD59).

L'identification de l'antigène Gal α 1-3 β Gal comme épitope responsable du rejet hyperaigu et l'extinction de son expression dans des porcs Gal K.O relança jusqu'à nos jours la conquête de l'homme sur l'animal.

I.3 XENOTRANSPLANTATION : BARRIERE IMMUNOLOGIQUE

I.3.1 REJET HYPERAIGU (RHA)

Selon Calne (Calne 1970), la transplantation entre espèces animales où le greffon subit un rejet hyperaigu (RHA) est une combinaison animale appelée discordante alors qu'elle est appelée concordante lorsqu'il n'y a pas de rejet hyperaigu (ex : singe sur homme). On peut également discriminer le caractère discordant ou concordant des xéno greffes sur la présence ou l'absence des anticorps préformés. L'étude des mécanismes du rejet hyperaigu met en évidence le rôle important joué par l'existence d'anticorps naturels ou préformés, le système du complément et l'activation endothéliale. Ce rejet est similaire à celui rencontré lors de greffes ABO - incompatibles chez l'homme.

Le RHA résulte de :

- La fixation des anticorps naturels anti-Gal sur les antigènes Gal exprimés au niveau de l'endothélium vasculaire du donneur animal
- L'activation du complément du receveur par la voie classique et minoritairement la voie alterne
- L'incompatibilité de certaines protéines régulatrices du complément du donneur à réguler l'activation du complément du receveur
- L'activation des cellules endothéliales de l'organe greffé

Macroscopiquement un organe ayant subi un rejet suraigu est nécrosé avec des foyers hémorragiques (Figure 4). Histologiquement ce rejet est marqué par la présence de thromboses intra-vasculaires extensives associées à des hémorragies et œdèmes extra vasculaires.



Figure 4 : Aspect macroscopique d'un rein ayant subi un rejet hyperaigu.

I.3.1.1 Xéno-antigènes

La plupart des espèces animales dispose d'une enzyme de glycosylation, l'alpha 1,3 galactosyltransférase ($\alpha 1,3GT$), responsable de la synthèse d'un épitope Gal alpha 1-3 βGal selon la réaction suivante :



Cet épitope est porté par de nombreuses molécules de surface des cellules endothéliales. Chez les singes de l'Ancien Monde, les grands singes et les hommes, cette enzyme de glycosylation n'existe pas, si bien que

l'antigène Gal est absent et ces mammifères « supérieurs » synthétisent des anticorps anti-Gal naturels dirigés contre cet épitope (Tableau 4).

Espèces	Expression de l'épitope Gal	Production d'AC anti-Gal
Mammifères non primates (porc, souris, rat....)	+	-
Singes du nouveau monde (<i>Amérique du sud</i>) (marmouset, capucin, tamarin)	+	-
Singes de l'Ancien Monde (Asie, Afrique) (Babouin, macaque rhésus et cynomolgus)	-	+
Grands singes (chimpanzé, gorille, gibbon, orang- outan)	-	+
Homme	-	+

Tableau 4 : Distribution réciproque de l'épitope Gal et des anticorps naturels anti-Gal chez les mammifères.

Il est fort probable que le gène de cette enzyme α 1-3 GT qui existe sous forme de pseudo gène chez l'homme (Joziase et al. 1991) ai été inactivé chez les primates ancestraux de l'Ancien Monde (il y a moins de 28 millions d'années). Ces derniers auraient pu être infectés par un agent pathogène endémique exprimant l'épitope Gal provoquant ainsi une pression de sélection positive sur les primates Gal négatif qui produisaient des anticorps anti-Gal (Galili et al. 1991). Cette pression de sélection a probablement eu lieu après la dérive des continents car les mammifères non-primates et les singes du Nouveau Monde continuent à exprimer l'épitope Gal. Donc l'endothélium vasculaire des hommes, des grands singes et des singes de l'Ancien Monde exprime les épitopes des groupes sanguins ABO (ou ABH), alors que l'endothélium vasculaire des singes du Nouveau Monde et des autres mammifères exprime l'épitope Gal (Oriol et al. 1996).

I.3.1.2 Anticorps naturels anti-Gal

Le primate nouveau-né (homme, macaque) possède des immunoglobulines G (IgG) naturelles préformées anti-Gal d'origine maternelle, grâce à leur passage au travers du placenta puis grâce à l'allaitement. Les IgM anti-Gal sont absentes à la naissance (Minanov et al. 1997) et leur production commence avec le premier contact avec les antigènes étrangers (contact extra-utérin). Les IgM anti-Gal apparaissent progressivement

après la naissance et atteignent le niveau adulte à l'âge de deux mois. Les micro-organismes essentiellement de la flore intestinale et les antigènes alimentaires en sont probablement responsables.

Ainsi les Ac naturels résultent d'une stimulation antigénique par des bactéries intestinales de la flore normale. Ces dernières expriment des structures similaires aux épitopes Gal, au niveau de lipopolysaccharides ou des parois cellulaires. Puisque chez l'homme il n'y a pas de tolérance immunitaire vis à vis des structures Gal, l'anticorps anti-Gal est constamment produit en réponse à ces bactéries. Ces anticorps anti-Gal représentent une réponse immunitaire primitive, naturelle, originellement déterminée à fournir une réponse rapide mais relativement non-spécifique pour lutter contre l'invasion par des agents infectieux. Ainsi les virus enveloppés produits par des organismes Gal positifs sont inactivés *in vitro* et *in vivo* par du sérum ayant des anticorps xénoréactifs anti-Gal. Les anticorps anti-Gal semblent donc jouer un rôle important dans la prévention des zoonoses.

La majorité de ces anticorps naturels sont des IgM. Il existe aussi des IgG3 et des IgA mais à des niveaux plus bas. La constante d'affinité de ces anticorps naturels pour les épitopes Gal est relativement basse, aux alentours de 10^{-4} .

Bien qu'il existe plusieurs isotypes d'anticorps naturels anti-Gal, les IgM semblent être responsables du rejet hyperaigu car malgré une relative faible affinité, leur quantité associée à leur multivalence rend compte d'une forte avidité qui ajoutée à leur grande capacité de fixation du complément en font des agents cytotoxiques extrêmement rapides et délétères (Parker et al. 1994). Le rôle des IgG anti-Gal dans le rejet hyperaigu a été controversé. Certains travaux ont mis en évidence un effet protecteur *in vitro* sur les cellules endothéliales probablement par inhibition de la fixation des IgM, alors que d'autres ont décrit un effet cytolytique *in vitro* (Koren et al. 1994).

I.3.1.3 Activation du complément et RHA.

Le système du complément est l'un des systèmes enzymatiques du sérum qui intervient dans l'inflammation, l'opsonisation des particules antigéniques et dans la destruction des pathogènes. Ce système est constitué de molécules sériques qui peuvent être activées selon 3 voies :

- la voie classique
- la voie alterne
- la voie des lectines

Les composants du complément interagissent les uns sur les autres de telle sorte que le produit d'une réaction est l'enzyme catalysant la suivante, déclenchant ainsi une cascade d'événement. A la fin de cette

cascade d'activation, les derniers composants du complément s'assemblent en un **complexe d'attaque membranaire** qui traverse la membrane de la cellule cible et forme ainsi un canal lytique provoquant la mort de la cellule.

Le rejet hyperaigu est toujours associé à l'activation du complément et peut être prévenu si ce dernier est inhibé ou si le receveur est déficient en complément (Brauer et al. 1993; Leventhal et al. 1993). Cependant à la fin de la cascade du complément la formation du complexe d'attaque membranaire n'est pas systématique (Daniels et al. 1997). Dans le modèle porc sur primate, le complément est activé essentiellement par la voie classique qui dépend de la fixation des anticorps xénoréactifs. L'analyse immunohistologique d'organes rejetés retrouve des dépôts de C1q, de C3 et C5b-9 alors que le facteur B et la properdine (ou facteur P) intervenant dans la voie alterne, ne sont pas détectés.

La cascade du complément est normalement régulée par une série de protéines endothéliales qui agissent comme des inhibiteurs à différentes étapes de l'activation du complément :

- **CD55** ou **DAF** (Decay Accelerating Factor) qui empêche la formation de la C3 convertase en la clivant
- **CD46** ou **MCP** (Membrane Cofacteur Protein) qui inactive la C5 convertase
- **CD59** qui bloque la formation du complexe d'attaque membranaire

Ces protéines régulatrices fonctionnent efficacement vis à vis des protéines du complément de leur propre espèce protégeant ainsi les cellules de l'hôte d'une activation non contrôlée du complément (Dalmasso et al. 1991).

Dans le modèle porc sur primate, les molécules CD55 et CD59 porcines sont spécifiques d'espèce et sembleraient incapables d'inhiber l'activation du complément du primate (Daniels et al. 1997).

Avec le développement de la transgénèse et en particulier de son application possible au porc, différentes équipes ont pu obtenir des porcs transgéniques pour une voire deux molécules régulatrices (CD55, CD59) humaines du complément permettant l'inhibition *in vitro* de la cytotoxicité de sérums humains vis à vis de cellules endothéliales porcines transgéniques. *In vivo*, on obtient une inhibition du rejet hyperaigu de l'organe porcin transgénique chez le macaque ou le babouin. Il existe en effet une réactivité croisée de ces molécules humaines avec les primates (Cozzi et al. 1995).

I.3.1.4 Les cellules endothéliales dans le rejet suraigu

Bien qu'une conséquence de la fixation du complexe d'attaque membranaire du complément soit la lyse des cellules endothéliales, le début du rejet suraigu a lieu avant cette destruction et met en jeu une activation des cellules endothéliales. Cette activation se traduit par la perte de la fonction de barrière de l'endothélium et par un changement du phénotype cellulaire anticoagulant vers un phénotype hautement pro-coagulant. On observe alors une agrégation plaquettaire qui aboutit à la thrombose du greffon (Daniels et al. 1997). Cette réponse qui requiert la présence du complément (C5a) correspond à une **activation endothéliale de**

type I (Bach et al. 1995). Cette activation est associée à la rétraction des cellules endothéliales et à la formation de « brèches » ou déchirures intercellulaires provoquant l'exposition de composants thrombogènes de la matrice sous-endothéliale comme le facteur von Willebrand et le collagène et le Facteur Tissulaire. Les plaquettes s'activent alors, la fibrine s'organise en réseau et le caillot se forme (Saadi et al. 1995). Il existe également une perte du sulfate d'héparine extracellulaire impliqué dans l'anticoagulation.

Au total, l'activation endothéliale de type I associée à l'activation de la cascade du complément est responsable du rejet suraigu avec thrombose intravasculaire, hémorragie et œdème extravasculaire.

I.3.2 REJET VASCULAIRE AIGU (RVA)

Lorsque le rejet suraigu de xénogreffes discordantes peut être prévenu, un deuxième type de rejet appelé Rejet Vasculaire Aigu (Leventhal et al. 1993; Candinas et al. 1996) va alors survenir même en présence d'une lourde immunosuppression (Cooper 1998). Le rejet vasculaire aigu apparaît également dans des combinaisons concordantes (ex : Hamster sur rat, souris sur rat...). Avant les années 2000, on pensait que les mécanismes pathogéniques conduisant au rejet vasculaire aigu semblaient être distincts de ceux qui conduisaient au rejet suraigu et étaient moins bien connus que pour ce dernier.

Comme pour le rejet suraigu, l'élément central, dans la physiopathologie de ce rejet, était l'activation endothéliale. Cette activation semblait être complètement indépendant et était appelée **activation endothéliale de type II** en contraste avec l'activation de type I observée dans le rejet hyperaigu.

L'histologie de ce type de rejet comportait (Figure 5):

- des lésions hémorragiques moindres que dans le rejet suraigu
- des thromboses intravasculaires
- infiltrat cellulaire peu abondant

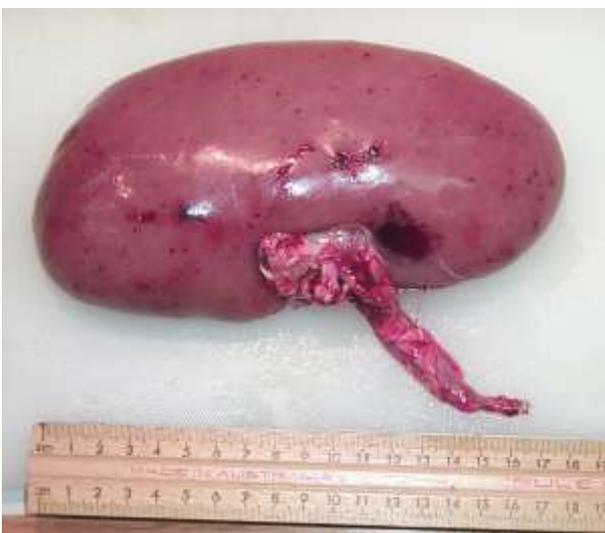


Figure 5 : Aspect macroscopique d'un rein ayant subi un rejet vasculaire aigu

Globalement, le rejet hyperaigu correspondait à une activation du complément alors que le rejet vasculaire aigu correspondait à une réponse humorale précoce.

Le rôle primordial joué par les anticorps était souligné par le fait que :

- Il existait une forte corrélation dans le temps entre l'apparition des anticorps anti-donneurs et l'apparition du rejet vasculaire.
- Les immunosuppresseurs agissant sur la réponse humorale retardaient l'apparition du rejet vasculaire.
- La pauvreté de l'infiltrat cellulaire (essentiellement composé de cellules NK et de macrophages)
- L'activation endothéliale pouvait être induite par ADCC (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity), qui était un mécanisme intéressant également les cellules NK.

I.3.2.1 Xéno-anticorps et RVA

En contraste par rapport au rejet hyperaigu, certaines IgG antiGal préformées sont impliquées dans la genèse du rejet vasculaire aigu (Minanov et al. 1997). Dans la combinaison porc sur primate, il existe chez le singe des IgG anti- α Gal présents à l'état de base. Après contact avec du tissu porcin, ces IgG augmentent rapidement.

Il existe également des IgG anti-donneur à l'état de base en cas de combinaison concordante, qui augmentent rapidement après la greffe. Il est fort probable que leurs taux soient trop bas avant la greffe pour être détectés et pour induire un rejet hyperaigu. Le panel de ces IgG semble être beaucoup plus large que celui des immunoglobulines induisant le rejet hyperaigu.

I.3.3 PORCS GENETIQUEMENT MODIFIES POUR LA XENOTRANSPLANTATION

Dans un premier temps, afin de prévenir l'apparition du rejet hyperaigu secondaire à l'activation incontrôlée du complément humain par les xénoanticorps naturels, des porcs transgéniques pour des molécules humaines régulant le système du complément ont été conçus. Ainsi des porcs transgéniques pour le DAF (Decay Accelerating Factor) (Cozzi et al. 1995) et/ou le CD59 humains (Diamond et al. 1996) ont été créés et utilisés avec succès dans des modèles de greffe cardiaque (McCurry et al. 1995), rénale (Loss et al. 2000) ou hépatique (Ramirez et al. 2000). Néanmoins, même avec un lourd traitement immunosuppresseur, les organes subissaient un rejet vasculaire aigu, caractérisé par une activation endothéliale et une forte augmentation des Ac xénoréactifs. Le rôle prédominant de ces Ac naturels dans le RHA et le RVA ont conduit à l'idée que la suppression de l'expression du motif Gal α 1-3-Gal pouvait être une solution de choix pour

prévenir les xénorejets (Cooper et al. 1993). La technique du transfert de noyau, apparue en 1996, a permis de produire en 2001 les premiers porcs hétérozygotes pour une forme inactive de l' α 1,3-galactosyltransférase, l'enzyme responsable de la glycolysation Gal α 1-3Gal. L'année suivante, des porcs dont les deux allèles de l' α 1,3-galactosyltransférase avaient été invalidés (porcs Gal-KO) ont vu le jour (Lai et al. 2002).

I.4 XENOTRANSPLANTATION : BARRIERE DE LA COAGULATION

I.4.1 COAGULATION ET XENOTRANSPLANTATION

Les lésions histologiques secondaires à des troubles de la coagulation rencontrés au cours des rejets de xénogreffes ont depuis longtemps fait évoquer une possible incompatibilité moléculaire au niveau des mécanismes régulant l'hémostase primaire et la coagulation plasmatique entre porc et primate. Ces lésions vont de la tendance thrombophilique locale à la coagulation intra-vasculaire disséminée ou à l'activation catastrophique de la coagulation menant à l'infarctus du xénogreffon (Bach et al. 1995). Ce processus pathologique peut être de surcroît potentialisé par la perte de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, où la disparition des molécules anticoagulantes de surface est secondaire à l'action cytotoxique des anticorps naturels et du processus inflammatoire associé (Lawson et al. 1996). Ainsi, de nombreuses études ont suggéré que plusieurs systèmes physiologiques régulant l'hémostase et la coagulation pouvaient être perturbés en raison d'une barrière moléculaire entre les deux espèces. Cette incompatibilité toucherait la voie de la protéine C, la voie du facteur tissulaire ainsi que les mécanismes régulateurs de la fibrinolyse.

I.4.2 RAPPEL PHYSIOLOGIQUE SUR L'HEMOSTASE

L'hémostase est le processus physiologique qui regroupe les mécanismes responsables de la prévention des saignements et l'arrêt des hémorragies, en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire, par la formation d'un thrombus. Elle comprend l'**hémostase primaire**, comportant un temps vasculaire et un temps plaquettaire et la **coagulation plasmatique** qui succède à l'hémostase primaire. L'adhésion des plaquettes avec la paroi vasculaire précède l'activation de processus biochimiques internes menant à l'agrégation des plaquettes entre elles. La formation des agrégats irréversibles contribue ainsi à l'arrêt du saignement. La coagulation est la résultante d'une cascade de réactions enzymatiques qui sont régulées par des boucles de rétroaction positive ou négative. Un équilibre harmonieux de cette balance hémostatique

entre facteurs procoagulants et anticoagulants est nécessaire pour éviter un déséquilibre responsable alors d'hémorragie ou de thrombose.

I.4.2.1.1 Hémostase Primaire

L'hémostase primaire comprend l'ensemble des phénomènes qui se déroulent depuis la rupture de la continuité vasculaire jusqu'à la formation d'un thrombus plaquettaire. Elle fait intervenir des facteurs vasculaires (endothélium et sous-endothélium), plaquettaires et plasmatiques.

✓ *La paroi vasculaire*

▪ *L'endothélium*

Les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux synthétisent à la fois des substances anti-thrombotiques et pro-thrombotiques. A l'état physiologique, la régulation de ce système est en faveur du versant antithrombotique : on parle de « thromborésistance physiologique de l'endothélium » du fait de la synthèse de substances ayant des propriétés antiagrégantes, anticoagulantes et profibrinolytiques.

Les propriétés antiagrégantes de l'endothélium reposent sur :

- La sécrétion de **prostacycline (PGI₂)**, prostaglandine synthétisée à partir des phospholipides membranaires. C'est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire qui agit en augmentant l'AMPc intraplaquettaire et un puissant vasodilatateur.
- La sécrétion de **monoxyde d'azote (NO)**, formé à partir de l'arginine, qui renforce l'action de la prostacycline sur les plaquettes. Son action vasodilatatrice est en grande partie responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses induite par l'endothélium.
- L'expression à la surface endothéliale d'une **ectonucléotidase** qui dégrade l'adénosine diphosphate (ADP), inducteur de l'agrégation plaquettaire, en un inhibiteur, l'adénosine.

L'activité anticoagulante de l'endothélium est liée à la sécrétion d'un inhibiteur du facteur XII et d'un inhibiteur du facteur tissulaire (Tissue Factor Pathway Inhibitor ou TFPI), à la présence d'héparanes sulfates membranaires stimulant l'inactivation de la thrombine par l'antithrombine, et à la présence de la thrombomoduline membranaire.

L'**activité profibrinolytique** de l'endothélium dépend de la synthèse et de la sécrétion d'un activateur du plasminogène, le t-PA (tissue type plasminogen activator) et de la fixation de cette enzyme ainsi que son substrat, le plasminogène, sur la membrane endothéliale.

Les **propriétés pro-thrombotiques** de l'endothélium reposent sur la synthèse par les cellules endothéliales de facteurs favorisant l'hémostase primaire et la coagulation, notamment le facteur Willebrand (vWF), nécessaire à l'adhésion des plaquettes, le facteur tissulaire (FT), responsable de l'initiation de la coagulation et un inhibiteur de la fibrinolyse (Plasminogen activator inhibitor type 1 ou PAI-1) qui limite l'activité du t-PA.

- ***Le sous-endothélium***

La membrane basale située immédiatement sous la couche de cellules endothéliales est bien délimitée au niveau des capillaires : elle contient des types particuliers de collagène, notamment le collagène de type IV associé à de la thrombospondine, des protéoglycans et des microfibrilles. Au niveau des gros vaisseaux, le sous-endothélium contient du collagène de type III de façon prédominante ainsi que des fibres d'élastine. Certains facteurs de l'hémostase sont déposés dans la matrice sous-endothéliale tels le vWF, le facteur tissulaire et le PAI-1 et peuvent donc exercer leur action hémostatique lorsque l'endothélium est lésé.

- ✓ ***Les plaquettes***

Les plaquettes sont des éléments anucléés de petites dimensions (2 à 3,5 μ de diamètre et 0,5 à 0,75 μ d'épaisseur) dont le volume plaquettaire est de 8 à 10 fL, soit dix fois plus petit que celui d'un globule rouge. Les plaquettes ont une forme discoïde et on peut distinguer la membrane plaquettaire, les systèmes membranaires intraplaquettaires, le cytosquelette, les granules spécifiques et d'autres formations intraplaquettaires.

- ✓ ***Facteurs plasmatiques intervenant dans l'hémostase primaire***

Au moins deux protéines plasmatiques interviennent dans l'hémostase primaire : le facteur Willebrand et le fibrinogène.

Facteur Willebrand : C'est une glycoprotéine multimérique de haut poids moléculaire synthétisées par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes et présente dans le plasma où il est lié au facteur VIII. Le facteur Willebrand est stocké dans les cellules endothéliales et les granules alpha des plaquettes sous forme de multimères de haut poids moléculaire. Il joue un rôle important dans l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium lésé : il forme un pont entre la plaquette et le sous-endothélium vasculaire (collagène). Au niveau de la plaquette, il se fixe à deux glycoprotéines membranaires : la GPIb et la GPIIb/IIIa. Son absence dans la maladie de Willebrand entraîne un allongement du temps de saignement.

Fibrinogène : Ce facteur, synthétisé par l'hépatocyte, est nécessaire à l'agrégation des plaquettes. En l'absence de fibrinogène (afibrinogénémie congénitale), le temps de saignement est allongé.

I.4.2.1.2 Etapes de l'hémostase primaire

Dans le sang circulant, les plaquettes sont inactives. Leur stimulation par une lésion vasculaire *in vivo* ou par différentes substances *in vitro* entraîne une série de phénomènes morphologiques et biochimiques qui constituent l'hémostase primaire. On distingue ainsi l'adhésion plaquettaire, l'activation des plaquettes aboutissant à la sécrétion des constituants plaquettaires et l'agrégation des plaquettes.

✓ Adhésion plaquettaire

Les plaquettes n'adhèrent pas à l'endothélium intact mais au sous-endothélium exposé en cas de lésion vasculaire. Cette adhésion est un phénomène rapide, irréversible, dépendant d'un certain nombre de paramètres :

- Les constituants du sous-endothélium : les plaquettes adhèrent principalement aux fibres de collagène.
- Les paramètres hémodynamiques et en particulier, les forces de cisaillement. Le taux de cisaillement est proportionnel au débit sanguin et inversement proportionnel au carré du diamètre du vaisseau : il est donc faible au niveau des gros vaisseaux et élevé au niveau de la microcirculation.
- Le facteur Willebrand, indispensable à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, surtout à taux de cisaillement élevé, comme au niveau des artérioles. Il forme un pont entre le sous-endothélium et, au niveau de la plaquette, la GPIb et la GPIIb/IIIa (Figure 1). Cette propriété augmente avec le degré de polymérisation du vWF.
- Les plaquettes. La GPIb et la GPIIb/IIIa sont nécessaires à l'adhésion plaquettaire (Figure 6).

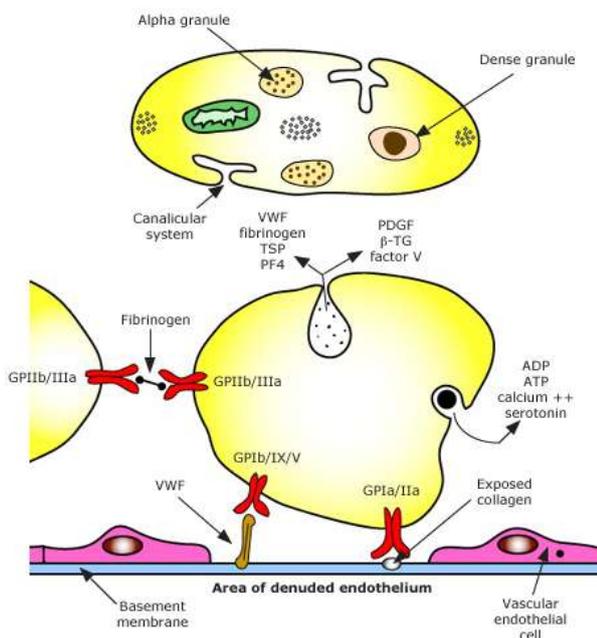


Figure 6: fonctions du facteur Willebrand dans l'agrégation plaquettaire.

✓ Activation des plaquettes

Les mécanismes initiateurs de l'activation plaquettaire sont l'adhésion des plaquettes au collagène du sous-endothélial après lésion vasculaire ainsi que la thrombine formée sur la membrane plaquettaire dès les phases initiales de l'hémostase primaire, l'ADP d'origine exogène (globules rouges) ou endogène (plaquettes), l'adrénaline, l'acide arachidonique et les complexes immuns circulants.

Les conséquences de l'activation plaquettaire sont :

- Les **modifications morphologiques des plaquettes**. Les plaquettes deviennent sphériques.
- La **sécrétion des constituants des granules**, permettant la sécrétion de substances actives comme la sérotonine, qui favorise la vasoconstriction et l'ADP, qui induit l'agrégation plaquettaire.
- L'**induction du métabolisme des prostaglandines**. La plaquette activée est capable de synthétiser des prostaglandines à partir des phospholipides (PL) membranaires. L'acide arachidonique est libérée des PL membranaires sous l'action d'une phospholipase A2. Il est transformé en endoperoxydes par la cyclooxygénase. Deux voies métaboliques sont alors possibles : la voie plaquettaire aboutissant à la synthèse de thromboxane A2 qui est un puissant agent agrégant et vasoconstricteur et la voie endothéliale aboutissant à la synthèse de prostacycline qui est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et un agent vasodilatateur.

L'aspirine et la majorité des anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent la voie des prostaglandines : ils bloquent la synthèse du TXA2 et de la PGI2 en inhibant les cyclooxygénases. Ils ont un effet anti-agrégant plaquettaire à faibles doses (Figure 7).

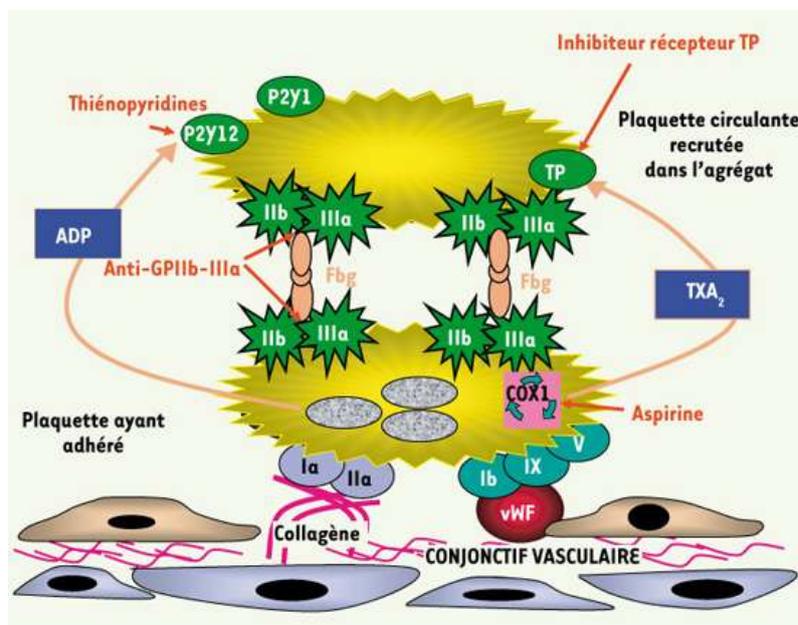


Figure 7 : Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. Le thromboxane A2 et l'ADP, activateurs plaquettaires, sont les cibles respectives de l'aspirine et des thiénoxyridines. De leur côté, les anti-GPIIb/IIIa empêchent l'agrégation plaquettaire en inhibant la fixation interplaquettaire du fibrinogène (Fbg).

✓ *Agrégation plaquettaire*

L'agrégation des plaquettes est définie comme la propriété des plaquettes à adhérer les unes aux autres, sous l'effet d'un stimulus, pour former des agrégats plus ou moins importants et solides.

Le mécanisme d'agrégation plaquettaire repose sur la liaison du fibrinogène au complexe GP IIb-IIIa : le fibrinogène sert de véritable pont entre les complexes GP IIb-IIIa de différentes plaquettes et permet l'agrégation des plaquettes entre elles.

L'agrégation plaquettaire peut se décomposer en 2 phases : une phase réversible au cours de laquelle le fibrinogène se détache de son récepteur permettant aux plaquettes de se désagréger et de redevenir circulantes et une phase irréversible au cours de laquelle certaines substances libérées par les granules (thrombospodine, fibronectine) amplifient l'agrégation et la consolident.

Parallèlement à l'hémostase primaire, la lésion vasculaire induit l'activation de la coagulation dont les phénomènes initiaux se déroulent à la surface de la plaquette. La libération de facteur tissulaire entraîne l'activation de la voie exogène de la coagulation. L'action du collagène sur le facteur XII entraîne l'activation de la voie endogène. Les premières traces de thrombine générée contribuent aux phénomènes d'activation et d'agrégation plaquettaires et renforcent le thrombus.

I.4.2.2 Physiologie de la coagulation

La coagulation du sang est due à la transformation d'une protéine plasmatique soluble, le fibrinogène, en une protéine insoluble, la fibrine ; celle-ci formant le caillot qui vient enserrer dans ses mailles les éléments figurés du sang et renforcer le clou plaquettaire formé au cours de l'hémostase primaire pour arrêter définitivement le saignement. La transformation du fibrinogène en fibrine est l'aboutissement d'une chaîne de réactions enzymatiques impliquant les facteurs de coagulation plasmatiques. Ces réactions enzymatiques sont déclenchées par le contact du sang avec une surface vasculaire lésée ou par l'action d'extraits tissulaires.

In vitro, le sang recueilli dans un tube en verre coagule à 37°C en 8 à 10 mn. Dans un tube de plastique, le sang coagule plus lentement. Le contact avec une surface mouillable joue donc un rôle important. Par contre si le sang est recueilli en présence d'extrait tissulaire, il coagule très rapidement en moins d'une minute quelle que soit la nature de la paroi du tube. Ceci permet de définir deux mécanismes de la coagulation déclenchée *in vitro* : la **voie endogène** où l'agent déclenchant est le contact du sang avec certaines surfaces ; la **voie exogène**, prépondérante *in vivo*, dont l'agent déclenchant est le facteur tissulaire.

L'ion calcium est également nécessaire à la coagulation. Le sang ne coagule pas s'il est recueilli sur des agents complexants le calcium ionisé (citrate, oxalate, EDTA). Les plaquettes interviennent également dans la coagulation grâce à leurs phospholipides membranaires.

I.4.2.2.1 Les facteurs de la coagulation

Chaque facteur de la coagulation a été affecté d'un numéro en chiffre romain par le Comité International de Nomenclature, sauf pour la prékallikréine et le kininogène de haut poids moléculaire. On connaît aujourd'hui, 12 protéines plasmatiques intervenant dans la coagulation.

Quatre de ces protéines plasmatiques, les **facteurs II, VII, IX, X**, ainsi que deux inhibiteurs (**protéine C et S**) sont synthétisées par la **cellule hépatique** en présence de **vitamine K**. Dans l'hépatocyte, la vitamine K

réduite assure la carboxylation des 6 protéines vitamines K-dépendantes, leur permettant de se transformer de précurseurs inactifs en protéines fonctionnelles.

Les facteurs XII, XI, la prékallikréine et le kininogène interviennent à la phase initiale (contact) de la coagulation. Les déficits congénitaux en facteurs XII, PK et KHPM ne n'accompagnent cependant pas de syndrome hémorragique.

La coagulation correspond à une chaîne de réactions enzymatiques. Chacune des enzymes de la coagulation est présente dans le plasma à l'état de précurseur inactif (proenzyme ou zymogène) et l'activation correspond à une protéolyse limitée de la protéine qui devient à son tour une enzyme. Trois facteurs de la coagulation ne sont pas des zymogènes (FV, FVIII et Kininogène de haut poids moléculaire : ce sont des cofacteurs (ou coenzymes) qui accélèrent la vitesse d'activation des autres enzymes (Tableau 5).

Facteurs de la coagulation	Concentration plasmatique (mg/l)	Demi- vie (h)	Fonction
Facteur I (fibrinogène)	2000-4000	100-150	Substrat
Facteur II (prothrombine)	100-150	50-120	Zymogène d'une sérine protéase
Facteur V (proaccélélerine)	5-10	12-36	Cofacteur
Facteur VII (proconvertine)	0,35- 0,6	4-6	Zymogène d'une sérine protéase
Facteur VIII (facteur antihémophilique A)	0,1- 0,2	8-12	Cofacteur
Facteur IX (facteur antihémophilique B)	3-5	18- 24	Zymogène d'une sérine protéase
Facteur X (Facteur Stuart)	7- 17	36- 48	Zymogène d'une sérine protéase
Facteur XI (Facteur Rosenthal)	3-6	40- 80	Zymogène d'une sérine protéase
Facteur XII (facteur Hageman)	15-45	50- 70	Zymogène d'une sérine protéase
Facteur XIII (Facteur stabilisant de la fibrine)	20-30	9-11 j	Zymogène d'une transglutaminase
Prékallikréine (PK) (Facteur Fletcher)	25-50	35	Zymogène d'une sérine protéase
Kininogène de haut poids moléculaire (KHPM)	60-90	150	Cofacteur

Tableau 5 : Caractéristiques des facteurs de la coagulation

Le fibrinogène est un substrat. La coagulation est un mécanisme auto-amplifié : la thrombine qui active les plaquettes, et à faible concentration, les FV et FVIII, favorise sa propre formation.

I.4.2.2.2 Formation de thrombine

La thrombine est une enzyme formée à partir de la prothrombine sous l'action d'un complexe appelé « prothrombinase » (Cf I.4.3.2.1) comprenant le FXa.

L'activation du FX peut être réalisée par deux voies différentes :

✓ **Voie exogène ou extrinsèque**

C'est la voie d'initiation de la coagulation *in vivo*. Le facteur tissulaire libéré dans la circulation active le FVII et en présence d'ions calcium. Le complexe facteur tissulaire- FVIIa est ensuite capable d'activer le FX en présence de Ca^{2+} . Ce complexe peut également activer directement le FIX.

✓ **Voie endogène ou intrinsèque**

C'est une voie d'activation importante *in vitro* mais elle intervient secondairement *in vivo*. Elle se déroule en plusieurs étapes :

- Le contact avec le sous endothélium (*in vivo*) ou avec certaines surfaces (verre, silice micronisée, kaolin *in vitro*) entraîne l'activation du FXII en présence de KHPM et de kallikréine. Le facteur XIIa en présence de KHPM active le FXI. Mais le FXI peut être directement activé par la thrombine.
- Le FXIa active à son tour le FIX en présence de Ca^{2+} .
- Le FIXa forme avec le FVIII en présence de phospholipides et de Ca^{2+} un complexe enzymatique qui à son tour active le FX.

I.4.2.3 Les inhibiteurs plasmatiques de la coagulation

Découvertes dans le plasma où elles sont présentes en abondance, ces protéines inhibitrices de la coagulation exercent leur fonction physiologique surtout à la surface de l'endothélium où leur efficacité est maximale. La thrombine, plaque tournante de l'hémostase, est ainsi la cible et l'acteur des réactions anticoagulantes auxquelles participent les protéines inhibitrices du plasma.

Les protéines inhibitrices d'enzymes coagulantes actives sont pour la plupart du groupe des « serpins ». Ces protéines ne sont pas des enzymes car :

- Elles forment un complexe bimoléculaire avec l'enzyme cible, habituellement à l'aide d'un cofacteur membranaire ;
- Au sein du complexe, l'activité enzymatique est réduite ou anéantie ;
- Le complexe inhibiteur-enzyme est éliminé de la circulation sanguine par le système des phagocytes mononucléés fixes, particulièrement par le récepteur 1 pour les « serpins » à la surface des hépatocytes.

✓ **L'antithrombine III**

L'antithrombine III (ATIII) est l'un des deux inhibiteurs plasmatiques les plus importants en physiologie. Le déficit constitutionnel en l'antithrombine III produit un abaissement de son taux plasmatique à 50% de la normale et est associé au risque héréditaire de thrombose le plus élevé parmi les déficiences connues.

▪ *Mécanismes d'action de l'antithrombine III*

L'ATIII est synthétisée par le foie. C'est un inhibiteur de protéases à action lente et progressive. Elle neutralise plusieurs enzymes hémostatiques (thrombine, Xa, Ixa, XIa et plasmine) en formant avec chacune un complexe bimoléculaire au sein duquel l'enzyme est neutralisée. Par contre, l'ATIII n'inhibe pas les pro-enzymes ni le VIIa. L'endothélium et le sous-endothélium ont à leur surface des **protéoglycans** (sulfate d'héparane ou de dermatane) qui sont des récepteurs - cofacteurs physiologiques de l'ATIII. L'ATIII doit donc se fixer à la surface de l'endothélium normal ou lésé ou du sous-endothélium. C'est là qu'elle interagira avec ses enzymes cibles. Les protéoglycans possèdent des chaînes de mucopolysaccharides de la même famille que celles des molécules d'héparine. Ce sont des protéines transmembranaires de la membrane endothéliale. Leur structure arborisée porte plusieurs chaînes de sulfate d'héparane ou autres mucopolysaccharides qui s'élèvent au-dessus de la membrane endothéliale et baigne dans le sang circulant. L'héparine et d'autres molécules apparentées sont d'importants cofacteurs de l'ATIII. L'union d'une molécule d'héparine et d'une molécule d'ATIII modifie la structure tertiaire de cette dernière et augmente sa puissance inhibitrice d'un facteur 1000 de telle sorte que l'ATIII puisse inhiber quasi instantanément son enzyme-cible.

Le complexe trimoléculaire ainsi formé, ATIII-enzyme et sulfate d'héparane ou héparine, a une vie éphémère car le complexe ATIII – enzyme voit son affinité pour les protéoglycans diminuer 100 à 1000 fois et il se détache rapidement de l'endothélium ou sous-endothélium. La molécule d'héparane ou d'héparine redevient disponible: des traces d'héparine agissent ainsi comme catalyseur de multiples rondes successives de formation de complexes ATIII + enzymes. De même, les propriétés antithrombotiques de l'intima sont constamment régénérées.

Le complexe ATIII-enzyme est rapidement éliminé par les phagocytes mononucléés fixes. Sa demie vie plasmatique est d'environ 5 min. Contrairement à l'héparine, l'ATIII est consommée dans la réaction d'inhibition. La puissance anticoagulante de l'héparine circulante diminue avec la chute du taux d'ATIII. Le taux critique de 50% d'ATIII peut être atteint lors d'une production massive de thrombine comme au cours des CIVD : la concentration de l'ATIII (2,5 μ M) est à peine supérieure à celle de la prothrombine (2,0 μ M). Les concentrations molaires des facteurs IX et X sont moins élevées : l'efficacité du couple sulfate d'héparane + ATIII repose probablement sur son inhibition des facteurs Ixa et Xa. Par contre, l'ATIII inhibe beaucoup moins efficacement le Xa fixé à la surface plaquettaire procoagulante.

L'héparine non fractionnée a un poids moléculaire moyen d'environ 12 000 à 15 000 daltons. Elle contient des chaînes polysaccharidiques de longueurs très variables. Les longues chaînes dotées de propriétés anticoagulantes s'unissent non seulement avec l'ATIII, mais aussi avec la thrombine ou le Ixa. Mais elles ne se combinent pas directement au Xa. Les héparines de faible poids moléculaires ont un poids moyen ne dépassant pas 5000 daltons et elles s'unissent à l'ATIII qu'elles potentialisent, mais elles ne se combinent pas directement à la thrombine ou à toute autre enzyme cible.

✓ *L'inhibiteur de la voie extrinsèque de la coagulation : TFPI*

L'importance de l'inhibiteur de la voie extrinsèque ou Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) est due au fait qu'il inhibe le facteur VIIa, c'est-à-dire l'enzyme qui est à l'origine de la voie extrinsèque de la coagulation et qui n'est pas neutralisée par l'ATIII. En conséquence, le TFPI et l'ATIII ont des cibles complémentaires. L'importance clinique du TFPI reste toutefois à confirmer.

▪ *Structure du TFPI*

L'isoforme α (TFPI α) est constituée de trois domaines de type Kunitz. Le premier de ces domaines (K1) fixe le site actif du FVIIa dans le complexe FVIIa/ Facteur tissulaire (TF). Le deuxième domaine (K2) fixe et inhibe le facteur Xa (Crawley et al. 2008). L'inhibition du complexe FVIIa/ TF est dépendant du FXa. TFPI interagirait avec le FXa n'ayant pas encore été libéré du complexe FVIIa/TF, formant ainsi un complexe « quaternaire » sur la surface membranaire. Le 3^{ème} domaine Kunitz (K3) n'a pas de fonction inhibitrice connue mais permettrait la liaison du TFPI à la surface cellulaire. L'isoforme β du TFPI contient seulement les domaines K1 et K2 et est directement attaché aux cellules endothéliales par une liaison de type glycosyl- phosphatidyl- inositol.

▪ *Mécanisme d'action du TFPI*

Le TFPI est une protéine plasmatique de 33 à 40 000 daltons associée à des lipoprotéines. Le TFPI est synthétisé par l'endothélium et les plaquettes. Le TFPI n'inhibe pas le FVIIa libre mais seulement lorsqu'il est combiné au facteur tissulaire. L'inhibition se produit donc sur une surface cellulaire porteuse du facteur tissulaire (cellule endothéliale lésée ou inflammée, ayant extériorisé le facteur tissulaire, ou monocyte activé...). Le TFPI ne peut inhiber le complexe facteur tissulaire + VIIa qu'après s'être d'abord combiné au Xa. La vitesse de formation du complexe TFPI-Xa est accélérée environ 40 fois par l'héparine.

Le complexe TFPI-Xa intervient donc par rétrocontrôle négatif : en effet, le VIIa ne peut être neutralisé par le TFPI seulement si le FVIIa a eu le temps de commencer à produire du FXa, au moins en petite quantité. Même à faible concentration, le Xa pré-requis aura produit des traces de thrombine qui suffisent à activer les facteurs VIII et V et les plaquettes ce qui aboutit à hausser le régime d'activité des voies intrinsèque et intermédiaire.

De cette manière, le TFPI laisserait la voie extrinsèque amorcer la coagulation en générant un peu de thrombine, puis inhiberait la voie extrinsèque une fois que les voies de la protéine C et de l'ATIII soient activées.

La concentration plasmatique du TFPI (2,5 μ M) est plus faible que celles des facteurs VII (10 μ M), X (140 μ M) et de l'ATIII (25000 μ M). Ainsi, en raison de cette capacité limitée, l'inhibition par le TFPI est défailante si

l'activation du VIIa est trop grande. Le TFPI empêcherait une CIVD que déclencheraient de petites quantités de facteur tissulaire (en l'absence de TFPI).

I.4.3 VOIE DE LA PROTEINE C

La voie de la protéine C activée est une voie physiologique majeure contrôlant la coagulation et l'inflammation ainsi que l'apoptose lors de phénomènes ischémiques et/ou inflammatoires. Les acteurs essentiels de cette voie physiologique sont la thrombine, la thrombomoduline (TM), le récepteur endothéliale de la protéine C (EPCR), la protéine C et la protéine S. La voie de la protéine C est un système inhibiteur physiologique de la coagulation en raison de sa capacité à neutraliser la thrombine et à détourner son activité enzymatique pour activer un puissant anticoagulant, la protéine C. L'activation de cet anticoagulant naturel est optimisée d'un facteur 20 lorsque la protéine C se fixe sur l'EPCR. Ainsi, une fois activée par le complexe thrombine- TM, la protéine C se dissocie de l'EPCR pour inactiver les facteurs Va et VIIIa, ce qui induit un rétrocontrôle inhibiteur sur la formation ultérieure de thrombine. L'importance clinique de cette voie physiologique est illustrée par les complications thrombo- emboliques sévères rencontrées lorsque cette voie est déficiente. En plus de ses propriétés anticoagulantes et anti-inflammatoires, la voie de la protéine C présente également des propriétés anti-fibrinolytiques.

I.4.3.1 Composants de la voie de la protéine C: la THROMBOMODULINE (TM)

La Thrombomoduline est le tampon physiologique majeur de l'action procoagulante de la thrombine dans un vaisseau normal (Waugh et al. 2000) parce que la TM se lie sur le même site actif de la thrombine qui normalement sert à sa liaison au fibrinogène et au facteur V plaquettaire. Elle bloque ainsi toutes ses fonctions procoagulantes et inflammatoires tout en catalysant l'activation de la protéine C par la thrombine. La TM est également le cofacteur de l'activation par la thrombine d'un inhibiteur de la fibrinolyse plasmatique, une procarboxypeptidase B appelée TAFI. La TM est à donc un récepteur primordial situé à la croisée des chemins entre coagulation et inflammation.

La TM est un récepteur glycoprotéinique transmembranaire de type I constitué de 557 acides aminés qui ne possède **aucune activité enzymatique intrinsèque**. C'est une molécule complexe constituée de multiples domaines distincts ayant chacun une fonction définie (Figure 8). La protéine humaine a un poids moléculaire apparent de 75 kda sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Après réduction des ponts disulfides, le poids apparent est de 105 kda, reflétant une structure secondaire constituée de multiples ponts de cystine. Cette structure secondaire rend la TM stable dans des conditions extrêmes de pH ou de dénaturation.

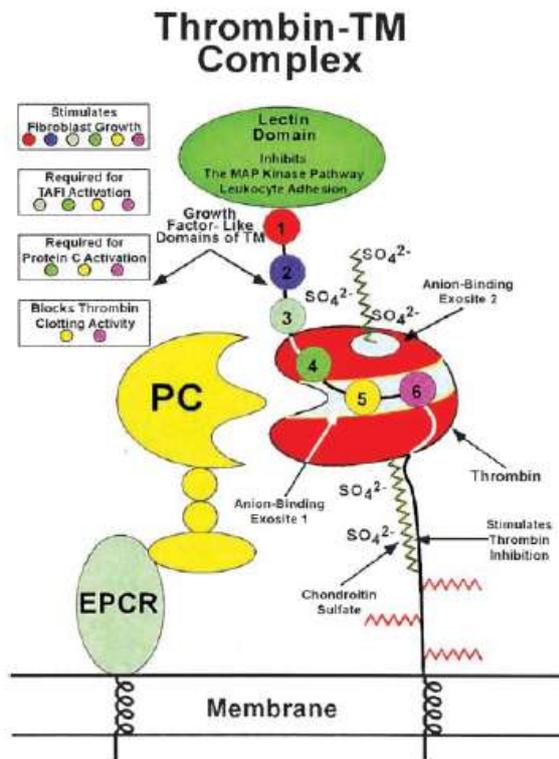


Figure 8 : Le complexe Thrombine-Thrombomoduline. La liaison de la thrombine à la TM nécessite l'exosite anionique 1 de la thrombine et les domaines EGF 4 à 6 sur la TM. (Esmon, CHEST, 2003, 124)

I.4.3.1.1 Structure de la Thrombomoduline

La structure de la TM est connue depuis la caractérisation de son ADN complémentaire (Jackman et al. 1987) et le clonage du gène situé chez l'homme sur le chromosome 20 (Wen et al. 1987). La TM murine (Dittman et al. 1988; Dittman et al. 1989), canine (Maruyama et al. 2004) et la TM du lapin (Deming et al. 2003) ainsi qu'une séquence partielle de l'ADNc bovin (Jackman et al. 1986) ont été également isolés et séquencés.

La TM est constituée de 5 domaines structuraux :

- Une queue cytoplasmique à l'extrémité C-terminale
- Un domaine transmembranaire
- Un domaine riche en Sérine-Thréonine sur lequel est branché le chondroïtine- sulfate qui optimise la fonction anticoagulante
- Un domaine constitué de 6 motifs répétitifs de type Epidermal Growth Factor, dont 4 sont responsables des fonctions anticoagulante et antifibrinolytique.
- Un domaine NH2-terminal ou lectin-like domaine

✓ *Domaine de type Lectine de la TM :*

La moitié du domaine extracellulaire est représentée par une globuleuse extrémité N-terminale. Ce domaine de type lectine a plusieurs fonctions essentielles. C'est un récepteur pour l'endocytose de la TM (Conway et al. 1997), régulant ainsi indirectement son expression. Ce domaine régule également la croissance de certaines tumeurs (Zhang et al. 1998) et présente des propriétés anti-inflammatoires en contrôlant l'adhésion cellulaire au niveau des cellules endothéliales (Conway et al. 2002). Cette extrémité N-terminale a

une séquence similaire aux lectines, qui sont des protéines de liaisons, et ne joue aucun rôle dans l'activation de la protéine C.

✓ *Domaine de type EGF de la TM :*

Le reste de l'extrémité N-terminale est constitué d'une tige formée de 6 modules de type Epidermal Growth Factor (EGF) (Weisel et al. 1996)(Figure 9). Les modules 4-6 comportent un important site de liaison pour le calcium (Tolkatchev et al. 1998).

Les premières études sur le rôle fonctionnel de la TM ont été réalisées à partir de fragments de TM de lapin digérés par une élastase (Kurosawa et al. 1987). Kurosawa, de l'équipe de C. Esmon, rapportait qu'un fragment comportant les 6 modules EGF provoquait une activation calcium dépendante de la PC et suggérait que les résidus d'acide glutamique de la PC interagissaient avec la TM grâce à la liaison calcium. Le site de liaison pour la thrombine fut précisé également par la même équipe (Kurosawa et al. 1988) au niveau des domaines EGF 5 et 6. Suzuki, l'année suivante (Suzuki et al. 1989) précisait que les domaines 4 à 6 possédaient la même activité anticoagulante que la TM intacte. Pour identifier quel était le nombre minimum de domaine EGF nécessaire pour catalyser l'activation de la protéine C, Hayashi et al. (Hayashi et al. 1990) ont construit une série de protéines mutantes pour la TM. Ils ont démontré que les modules EGF1-6 ou EGF456 avaient quasiment la même activité que la TM intacte et que EGF45 présentait environ 10% de l'activité de EGF456 alors que EGF56 n'avait aucune activité catalysante. A une concentration en calcium de 0.25 – 0.3 mM, l'activation de la PC était augmentée par EGF45, EGF456 et EGF1-6 (Hayashi et al. 1990) et en l'absence d'ions calcium, EGF456 n'avait aucune activité sur l'activation de la PC. De même une PC mutante sans domaine Gla n'était pas affectée par différentes concentrations en calcium. L'activité de cofacteur enzymatique d'une TM mutante sans domaine transmembranaire et sans queue intracytoplasmique était rapidement augmentée par une augmentation en calcium allant jusqu'à 400-500 μ M, puis un effet inverse était observé pour des concentrations supérieures en Ca^{2+} (Zushi et al. 1991). Cette activité de cofacteur de la TM dépendante du Ca^{2+} n'était plus observée lorsqu'une PC mutante sans domaine Gla était utilisée (Zushi et al. 1991). Une TM mutante dans laquelle le résidu Asp349 était manquant montrait une activité coenzymatique effondrée (Zushi et al. 1991).

Ainsi, les modules EGF4 et EGF5 sont essentiels pour l'activation calcium dépendante de la PC par la TM. Johnson et al. (Johnson et al. 1983) ont suggéré que les ions calcium induisaient un changement conformationnel de la PC qui améliorerait son activation par le complexe thrombine- TM et pour Kurosawa et al. (Kurosawa et al. 1987), les ions calcium joueraient un rôle dans l'interaction entre le domaine Gla de la PC et le complexe Thrombine-TM possiblement grâce à une liaison calcium. Le résidu Asp349 serait essentiel au niveau de la TM pour cette liaison calcium avec le domaine Gla de la PC puisque le changement de cette Asp349 par une Alanine modifierait la structure de la TM et inhiberait son activité de cofacteur.

La TM permet également d'optimiser l'activation de TAFI par la thrombine. Les domaines nécessaires pour cette activation sont les domaines EGF3-4-5 et 6 (Kokame et al. 1998). Des études plus précises ont indiqué

que la séquence minimum de TM nécessaire pour l'activation de TAFI s'étendait du domaine EGF3, au niveau de la « c-loop » jusqu'au domaine EGF6. Cette séquence comporte 13 résidus de plus que la séquence primaire requise pour l'activation de la PC (Wang et al. 2000). De plus, l'oxydation du résidu Met 388 présent dans le peptide unissant EGF5 avec EGF6, provoque une diminution significative de l'activation de la PC sans perturber l'activation de TAFI (Wang et al. 2000). Ces résultats suggèrent que des éléments différents de la TM, complexée à la thrombine, interagissent avec la PC et TAFI.

Au total, le domaine EGF-4 permet la liaison avec la protéine C, les domaines EGF3 et EGF4 permettent la liaison avec TAFI et les domaines 5 et 6 se fixent à la thrombine.

✓ *Domaine riche en Sérine-Thréonine*

La région riche en sérine-thréonine s'étend depuis le domaine transmembranaire jusqu'au 6^{ème} EGF domaine (Figure 9). Elle contient plusieurs sites post-translationnelles pour une N- ou O glycolysation, en particulier pour la chaîne de chondroïtine sulfate (Bourin et al. 1986; Bourin et al. 1990). La forme soluble de la TM isolée dans les urines ne comporte pas la chaîne de chondroïtine sulfate (Parkinson et al. 1992; Edano et al. 1998).

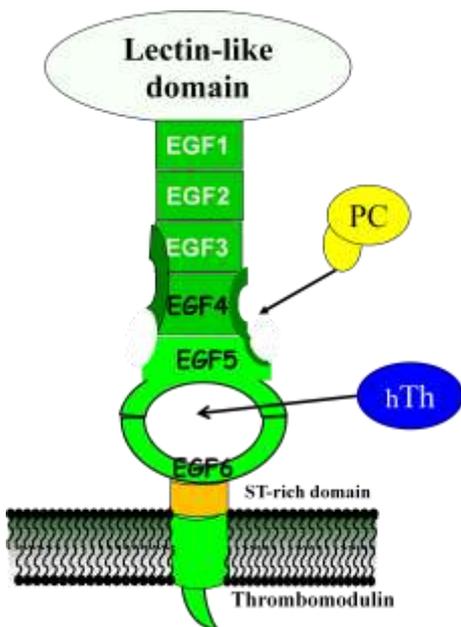


Figure 9 : Structure de la TM. La TM est constituée d'une extrémité N-terminale formée d'un Lectin-like domaine et de 6 modules EGF, suivie d'un domaine riche en sérine- thréonine, d'un domaine transmembranaire, et d'une queue intra-cytoplasmique C- terminale

✓ *Queue intra-cytoplasmique de l'extrémité C terminale*

La queue intra-cytoplasmique ne présente aucune similarité avec celles d'autres protéines ayant des fonctions connues dans la transduction du signal ou dans l'interaction de protéine à protéine.

I.4.3.1.2 Expression et concentration de la TM

La TM est exprimée sur l'endothélium des grands vaisseaux et des capillaires à l'opposé de l'EPCR qui est majoritairement exprimé au niveau de l'endothélium des grands vaisseaux et des veines (Laszik et al. 1997). Bien que le nombre de molécules de TM par cellule endothéliale soit approximativement constant au niveau de l'organisme, il n'en n'est pas de même pour la concentration en TM qui est déterminée par le nombre de cellules endothéliales en contact avec un volume sanguin donné. En effet, puisque la surface endothéliale par unité de volume sanguin est beaucoup plus grande dans la microcirculation (environ 3000-5000cm² d'endothélium/ml sang) que dans les grands vaisseaux (environ 1.5cm²/ml), la concentration en TM est donc proportionnellement très élevée dans la microcirculation (\approx 500nmol/l) par rapport aux grands vaisseaux (\approx 0.1 à 0.2nmol/l). Ainsi la thrombine par sa fixation à la TM est très rapidement éliminée de la microcirculation par rapport à la macrocirculation. Cela suggère que la voie de la PC activée est essentiellement fonctionnelle au niveau de la microcirculation comme en témoigne les lésions histologiques rencontrées chez des enfants atteints d'un déficit homozygote en PC avec le développement de microthromboses vasculaires à type de purpura fulminans. A l'opposé, un déficit en antithrombine III provoque une thrombose au niveau des grands vaisseaux.

I.4.3.2 Composants de la voie de la protéine C : La THROMBINE ou Facteur II activé (FIIa)

La thrombine est une protéine multifonctionnelle aux propriétés procoagulantes et inflammatoires, capable d'activer les plaquettes et les cellules endothéliales lorsqu'elle se lie à des récepteurs spécifiques (PARs) et devenant paradoxalement anticoagulante lorsqu'elle se lie à la thrombomoduline.

I.4.3.2.1 Mécanismes d'activation de la Thrombine

La thrombine est une enzyme protéolytique formée à partir de la **prothrombine** (FII) sous l'action d'un complexe appelé « **prothrombinase** ». Ce complexe est formé par l'association, au niveau des phospholipides anioniques exposés à la surface des plaquettes activées et en présence d'ions calcium, du facteur X activé, supportant l'activité enzymatique du complexe, et du facteur V activé, cofacteur dont la présence accélère la réaction (Figure 10). La prothrombinase catalyse la conversion protéolytique de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) et fragment 1.2 (F1.2).

La thrombine est également formée sur la membrane plaquettaire dès les phases initiales de l'hémostase primaire après adhésion des plaquettes au collagène du sous-endothélium. La transduction du signal d'activation plaquettaire s'accompagne de modifications morphologiques des plaquettes et de la sécrétion

des constituants des granules intra- plaquettaires. Cette sécrétion est initiée par la fusion des membranes des granules denses avec le système canaliculaire ouvert, permettant la sécrétion rapide de substances biologiquement active comme la sérotonine, le GPIIb-IIIa, le vWF et le facteur V qui intervient dans la formation de la prothrombinase.

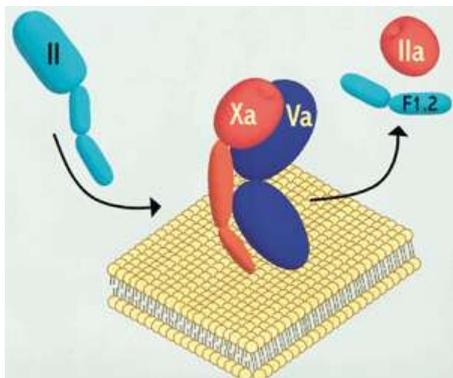


Figure 10 : Complexe prothrombinase formé par l'association du facteur Xa et Va.

I.4.3.2.2 Mécanismes inhibiteurs de la thrombine

Deux systèmes moléculaires inhibent l'activité de la thrombine, ce sont la **thrombomoduline** et l'**antithrombine III**.

✓ *Inhibition et changement structurel induit par la TM*

Une fois liée à la thrombomoduline, la thrombine subit un changement conformationnel qui optimise son activité protéolytique pour la protéine C (Esmon 1987) par un facteur 1000. L'activation de la protéine C par la thrombine seule est en effet spontanément très faible (Esmon 1987). Néanmoins, les changements de spécificité de la thrombine liée à la TM sont complexes.

Les études utilisant des sondes fluorescentes dans le site actif de la thrombine ou bien des substrats chromogéniques de la thrombine, suggèrent que la TM pourrait altérer allostériquement le site actif de la thrombine (Ye et al. 1991; Ye et al. 1992). Ye et al. ont démontré qu'il existait deux changements structurels induits par la TM au niveau du site actif de la thrombine. L'un est situé près de la sérine 195 et le second à plus de 15 Å de la Ser-195. Un fragment contenant l'ensemble des 6 domaines EGF-like induit ces 2 changements sur la thrombine alors que les domaines EGF5 et 6, qui ne permettent pas à eux seuls l'activation de la PC, n'induisent qu'une modification près de la Ser-195. Cela indique qu'il existe deux niveaux d'interactions entre la thrombine et la TM, l'un avec les domaines EGF56 et l'autre à priori avec le domaine EGF4, ce dernier induisant le changement dans le site actif de la thrombine situé à plus de 15 Å de la Ser-195.

La thrombine interagit également avec la chaîne de chondroïtine- sulfate de la région riche en sérine-thréonine de la TM, ce qui accélérerait l'inactivation de la thrombine par l'antithrombine III (Bourin et al. 1986; Hofsteenge et al. 1986; Preissner et al. 1987). Ainsi, il apparaîtrait qu'au moins trois régions distinctes de la TM (EGF5-6, EGF4 et le chondroïtine sulfate) interagissent avec la thrombine.

Cependant, l'étude de la structure cristalline du complexe formé par la thrombine et un fragment de TM ne retrouve que très peu de changement dans la structure de la thrombine liée à la TM (Fuentes-Prior et al. 2000). L'ensemble de ces résultats mène à penser que le principal effet de la liaison de la thrombine sur la TM est d'abroger le clivage du fibrinogène par la thrombine, d'inhiber l'agrégation plaquettaire thrombine-dépendante et de créer un site de liaison optimal pour l'activation de la protéine C.

✓ *Inhibition par l'antithrombine III*

Voir I.4.2.3

I.4.3.2.3 Récepteurs de la Thrombine

La thrombine se fixe soit à des récepteurs de la famille des PARs (Protease Activated Receptors) ou soit à la TM.

✓ *Famille des PARs :*

Parallèlement à ces fonctions hémostatiques et thrombotiques, la thrombine présente également une action directe au niveau cellulaire (cellules endothéliales...), elle est donc à la croisée des chemins entre coagulation et inflammation. Plusieurs années d'investigations ont été nécessaires pour découvrir le premier récepteur fonctionnel de la thrombine. Ce récepteur a été nommé Protease Activated Receptor 1 (PAR-1) parce qu'il nécessite une protéolyse pour être fonctionnel. Plus tardivement, ont été découverts d'autres récepteurs PARs, PAR-2, PAR-3 et PAR-4.

PAR-2 est activé par la trypsine, la tryptase, le facteur Xa et le facteur VIIa mais il n'est pas activé par la thrombine. A l'opposé, PAR-3 et PAR-4 sont activables par la thrombine. Les récepteurs PARs font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux G protéines avec 7 domaines transmembranaires (Figure 11). L'expression des PARs a été détectée dans la plupart des tissus et lignées cellulaires. Ces récepteurs ont été impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques et dans la pathogénie de plusieurs maladies.

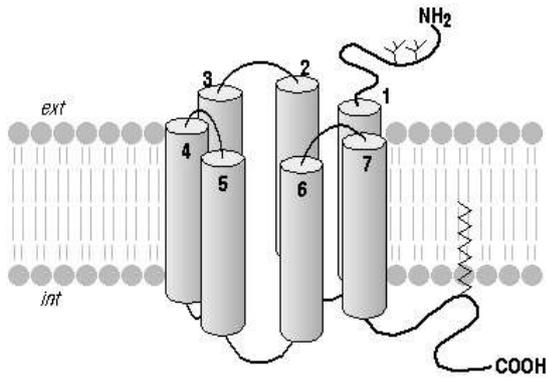


Figure 11 : structure des récepteurs couplés aux G protéines avec 7 domaines transmembranaires

✓ **Domaines EGF-like 5 et 6 de la TM**

La thrombine forme un complexe 1:1 avec la TM. La thrombine fixée à la TM perd son activité procoagulante (activation du fibrinogène, du facteur V plaquettaire et des plaquettes).

Plusieurs études ont montré que la thrombine se fixe sur les domaines EGF-5 et 6 de la TM (Kurosawa et al. 1987; Kurosawa et al. 1988; Zushi et al. 1989; Hayashi et al. 1990). Cependant, Hayashi (Hayashi et al. 1990) a également démontré que la thrombine pouvait se fixer sur EGF45 et qu'un peptide synthétique correspondant à la séquence protidique allant du Glu408 à la Glu426 du module EGF5, inhibait directement l'interaction thrombine-TM. Cependant EGF56 a une plus grande affinité pour la thrombine que EGF45 (Hayashi et al. 1990).

Le site de liaison de la TM pour la thrombine est donc situé sur le module EGF5 et l'affinité de ce module pour la thrombine est augmentée par EGF6.

I.4.3.3 Composants de la voie de la PC : la PROTEINE C

La protéine C a été identifiée la première fois par Johan Stenflo en 1976 à partir de plasma bovin et nommée « C » parce qu'elle était la troisième protéine éluée à partir d'une colonne DEAE-Sépharose (Stenflo 1976). La protéine C est le zymogène inactif d'une sérine protéase vitamine-K dépendante qui est activée par la thrombine liée à la TM sur la surface endothéliale. La PC circule dans le plasma à une concentration de 4 à 5 µg/ml sous la forme de zymogène inactif.

I.4.3.3.1 Structure de la PC

Appartenant à la famille des protéases vitamine K dépendantes, la PC contient donc un domaine phospholipidique de liaison Gla (Figure 12). Ce court domaine est caractérisé par la présence de résidus d'acide glutamique modifiés après translation en résidus d'acide γ -carboxy-glutamique (Gla). Cette modification est essentielle pour la liaison avec le calcium et pour l'architecture de la PC. La fixation de ce domaine Gla à des surfaces phospholipidiques chargées négativement est primordiale pour l'activité anticoagulante de la PCa. La PC est constituée de 2 chaînes, l'une de 21kDa qui contient le domaine Gla et deux modules epidermal growth factor (EGF) et l'autre plus lourde, de 41 kDa formant le domaine de la sérine protéase.

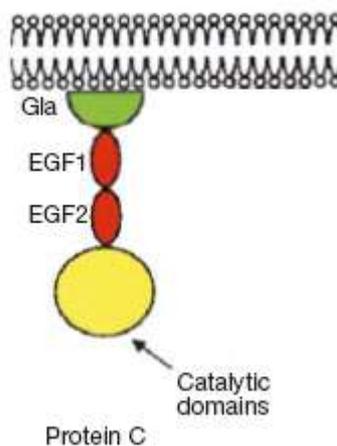


Figure 12 : Structure de la protéine C

I.4.3.3.2 Activation de la protéine C

La protéine C qui circule sous la forme d'un zymogène inactif, est activée par la thrombine liée à la TM exprimée à la surface des cellules endothéliales par une réaction calcium-dépendante (Esmon et al. 1981). La PC n'est pas un substrat « naturel » pour la thrombine libre, mais lorsque la thrombine fixe la TM, cela induit un changement conformationnel dans le centre catalytique de la thrombine qui change sa spécificité macromoléculaire et transforme la thrombine en une enzyme capable d'activer rapidement la PC tout en inhibant son action sur le fibrinogène (Ye et al. 1991; Ye et al. 1992). Dans des conditions physiologiques, l'activation de la PC est au moins 1000 fois plus rapide avec le complexe thrombine-TM qu'avec la thrombine libre (Esmon 1989; Dittman et al. 1990). Il a été démontré que la concentration en calcium était à l'origine de la moitié de l'accélération de la PC par le complexe thrombine-TM. Cette activation de la PC dépendante du calcium est liée à la présence d'un site de liaison pour le calcium au niveau du domaine Gla.

I.4.3.3 Liaisons de la protéine C

Les cellules endothéliales peuvent fixer la PC par 3 sites de liaisons distincts (Fukudome et al. 1994):

- EPCR fixe la PC ou la PCa avec une affinité élevée
- La protéine S peut fixer la PC ou PCa sur des surfaces membranaires chargées négativement mais cette liaison n'est pas spécifique du type cellulaire
- Le complexe thrombine-TM peut aussi fixer la PC

I.4.3.4 Composants de la voie de la PC : EPCR

C'est en 1994, que Fukudome et Esmon (Fukudome et al. 1994) isolent pour la première fois un récepteur protéique permettant la fixation de la PC ou la PCa sur l'endothélium vasculaire. Baptisé Endothelial Protein C Receptor (EPCR), ce récepteur se révèle être un puissant accélérateur de l'activation de la PC par le complexe thrombine- TM (Stearns-Kurosawa et al. 1996).

I.4.3.4.1 Structure de l'EPCR

La structure protéique de l'EPCR est celle d'une glycoprotéine transmembranaire de type I avec 238 acides aminés contenant une séquence signal à l'extrémité NH₂, un domaine transmembranaire, un court cytosolique domaine et 4 potentiels sites de N-glycosylation.

✓ *Homologies avec les molécules du CMH/CD1*

La structure de l'EPCR présente des homologies avec les molécules du CMH/CD1. En effet, dans la famille des CMH/CD1, le domaine extracellulaire est composé de 3 domaines nommés α_1 , α_2 et α_3 (Rothbarth et al. 1993). Dans l'EPCR, la région extracellulaire contient seulement 2 domaines correspondant aux domaines α_1 et α_2 et la 3^{ème} boucle, qui est connue comme étant le domaine immunoglobulinique, est manquante. Ainsi, l'EPCR apparaît être un nouveau membre de cette famille.

✓ *Homologies avec la protéine murine CCD41*

En plus de l'homologie avec les molécules du CMH/CD1, l'ADNc de l'EPCR humain partage 75% d'identités dans sa séquence nucléique et 62% d'identités dans sa séquence protéinique avec une protéine murine, CCD41(Rothbarth et al. 1993). Cette homologie a fait émerger l'idée que l'EPCR pouvait être l'homologue humain du CCD41 bien que les caractéristiques de cette molécule soient assez différentes de celles de l'EPCR. En effet, la molécule CCD41 est classée comme étant une protéine associée au centrosome avec un rôle prévalent à la phase G2/M du cycle cellulaire. La comparaison de la séquence prédite en acides aminés

des 2 molécules a révélé que la région NH₂-terminale et la queue cytosolique étaient assez différents alors que la portion moyenne était quasiment identique. Ainsi, le degré élevé d'homologie entre l'EPCR humain et la protéine murine CCD41 laissai présager que la structure et la fonction de l'EPCR pouvaient être conservées parmi les espèces animales. Pour tenter de résoudre cette hypothèse, Fukudome et Esmon (Fukudome et al. 1995) ont cloné et exprimé l'EPCR murin et bovin et ils ont démontré que la séquence de l'EPCR murin était distincte de celle du CCD41 et que l'EPCR murin pouvait fixer la PCa humaine.

I.4.3.4.2 Fonctions de l'EPCR:

La principale propriété de l'EPCR est d'accélérer l'activation de la PC par le complexe thrombine- TM (Stearns-Kurosawa et al. 1996) en fixant préférentiellement la PC pour la présenter à son complexe activateur. Dans un modèle de culture cellulaire, l'EPCR augmente de 4 à 8 fois l'activation de la PC par le complexe thrombine-TM (Stearns-Kurosawa et al. 1996). Cette augmentation est dépendante de la concentration en EPCR, même si la concentration en EPCR est en excès par rapport à la TM (Taylor et al. 2001). A l'opposé, pré-incuber la culture cellulaire avec un anticorps anti-EPCR diminue de 70 à 80% de l'activation de la PC. *In vivo*, chez la souris et le babouin, l'augmentation de la PC est proche d'un facteur 20 (Taylor et al. 2001).

L'EPCR améliore l'activation de la PC par le complexe thrombine- TM à la condition que ces deux récepteurs soit de localisation proche. L'EPCR fixe la PC ou la PCa avec la même affinité ($K_d \approx 30$ nM).

Etant donné la proche similarité de l'EPCR avec les molécules du CMH de type CD1 et la molécule murine CCD41 qui jouent un rôle important dans la présentation d'antigènes à des récepteurs cellulaires, il est possible que les propriétés anti-inflammatoires de la PC puissent être exercées via EPCR.

I.4.3.4.3 Expression de l'EPCR

✓ Localisation de l'expression de l'EPCR

L'EPCR est majoritairement exprimé à la surface de l'endothélium des artères de gros calibres et dans les veines mais pas dans les petits vaisseaux (Laszik et al. 1997), à l'opposé de la TM qui est exprimée à la fois dans la micro et macrocirculation. Cette particularité suggère que dans les grands vaisseaux où la PC plasmatique ne peut facilement être en contact avec l'endothélium, l'EPCR peut efficacement fixer et concentrer la PC sur l'endothélium de surface et la présenter plus aisément au complexe thrombine-TM. Ainsi, l'EPCR joue un rôle crucial dans la régulation de la coagulation au niveau des grands vaisseaux. D'autres lignées cellulaires expriment également l'EPCR, comme les monocytes-macrophages.

✓ **L'EPCR Soluble**

L'EPCR existe également sous forme soluble. Cette forme soluble a la propriété de fixer la PCa et de bloquer la protéolyse du facteur Va par la PCa sans altérer l'inactivation de la PCa par les protéases inhibitrices (α 1-antitrypsine et Inhibiteur de la Protéine C) (Regan et al. 1996). Cette modulation de l'activité de la PCa est inversée par l'incubation préalable d'un anticorps bloquant le site de liaison de l'EPCR.

Le « shedding » de l'EPCR s'accompagne d'une augmentation en ARNm codant pour l'EPCR et ces deux événements sont médiés par la thrombine. Cette libération d'EPCR soluble pourrait jouer un rôle important, bien que non encore identifié, dans la réponse physiologique aux endotoxines. Dans cette hypothèse, Stearns-Kurosawa (Kurosawa et al. 2000) a retrouvé des sites de fixation pour l'EPCR soluble au niveau des leucocytes activés et il a démontré que cette liaison était médiée par une protéase 3 qui est l'autoantigène retrouvé dans la granulomatose de Wegener.

✓ **Régulation de l'expression de l'EPCR**

Dans des cultures de cellules endothéliales humaines, bovines ou murines, l'expression de l'EPCR obéit à un rétro-contrôle négatif par le TNF- α (Fukudome et al. 1994; Fukudome et al. 1995). Gu et al. (Gu et al. 2000) ont étudié *in vivo* la régulation de l'EPCR au cours d'un modèle de perfusion d'endotoxines. L'analyse de l'extrémité 5' du gène humain ou murin de l'EPCR, a permis d'identifier une séquence, CCCACCCC située dans le promoteur du gène, qui est nécessaire pour l'induction de la synthèse d'ARNm de l'EPCR. Les auteurs de cette étude ont ainsi démontré que les taux d'ARNm de l'EPCR et de l'EPCR soluble augmentent rapidement 3 à 6 heures après perfusions d'endotoxines et cette augmentation pourrait être diminuée par un inhibiteur à thrombine, l'hirudine. A l'opposé, l'injection *in vivo* de TNF- α ne modifie pas les taux en ARNm de l'EPCR. Ces résultats suggèrent que l'expression de l'EPCR au cours de sepsis à gram-négatif est majoritairement médiée par la thrombine et non par le TNF- α . En effet, l'injection sur 3 heures de thrombine chez le rat à une concentration de 5 U/kg provoque un doublement des taux en ARNm de l'EPCR avant la fin de la perfusion de thrombine. Toujours dans la même étude, Gu et al. (Gu et al. 2000) ont démontré *in vitro* que l'incubation de cellules endothéliales d'aorte de rat avec un peptide agoniste PAR-1 (SFFLRNPE) induisait une augmentation des taux en ARNm de l'EPCR similaire à l'injection de thrombine. L'incubation des cellules avec un agoniste PAR-2 n'avait aucun effet sur les taux en ARNm. Ces résultats suggèrent que la régulation de la thrombine sur les taux en ARNm de l'EPCR est médiée par le récepteur PAR-1.

Dans des conditions physiologiques chez le rat, Gu et al. (Gu et al. 2000) ont également montré que les niveaux les plus élevés en ARNm de l'EPCR sont rencontrés dans le placenta, le poumon, le foie et le cœur alors qu'ils sont faibles dans les autres organes.

provoque une inactivation complète du facteur Va. La protéine S agit comme cofacteur de cette protéolyse en augmentant l'affinité de la PCa pour la membrane cellulaire (Walker 1980; Harris et al. 1985; Smirnov et al. 1998) et en augmentant la spécificité du site de clivage protéolytique du FVa au niveau de l'Arginine 306 sans modifier le clivage de l'Arg 506 (Rosing et al. 1995). En effet, lorsque la protéine S se fixe à la PCa, la distance entre le site actif de la PCa et la surface membranaire diminue d'environ 1nm (Yegneswaran et al. 1997). Ce rapprochement de la PCa à la membrane cellulaire est probablement responsable de la capacité de la protéine S à augmenter spécifiquement le clivage au niveau de l'arginine 306.

De plus, la protéine S bloque la propriété du facteur Xa à protéger le FVa de l'inactivation par la PCa et possède une fonction similaire dans l'inactivation du complexe FIXa-FVIIIa (Rosing et al. 1995). En association avec le facteur V, la protéine S facilite la PCa à inactiver le FVIII (Shen et al. 1994; Lu et al. 1996).

Les formes inactives ou actives de la protéine C se lient à l'EPCR avec la même affinité. La protéine C activée (PCa) liée à l'EPCR peut être inactivée par des inhibiteurs de protéases (α 1-antitrypsine et l'inhibiteur de la protéine C) approximativement au même rythme que la PCa libre (demi vie d'environ 15 min) (Regan et al. 1996). Cette lenteur d'inactivation de la PCa fixée à l'EPCR permet la transmission du signal au niveau cellulaire. En comparaison avec la thrombine libre, la thrombine fixée à la TM est inactivée beaucoup plus rapidement par l'antithrombine ou l'inhibiteur de la protéine C avec une demi-vie estimée à 2 secondes (Bourin et al. 1993; Rezaie et al. 1995). Ainsi, dès que la formation de thrombine cesse, le mécanisme d'activation de la protéine C est stoppé.

I.4.3.5.2 Propriétés PROFIBRINOLYTIQUES de la voie de la PC

L'apparente propriété profibrinolytique de la PCa a été rapportée pour la première fois par Taylor et Lockhart (Taylor et al. 1985; Taylor et al. 1985) en 1985. La modeste accélération de la fibrinolyse provoquée par la PCa dans un système non cellulaire était plus prononcée au sein de caillots formés à partir de sang total ou bien déplété en plaquettes mais suppléé en leucocytes. D'autres investigateurs ont montré ensuite que la PCa pouvait induire une consommation du plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (Nesheim et al. 1997). De plus, la PCa agit indirectement comme un profibrinolytique par sa capacité à diminuer la formation de thrombine, ce qui diminue également la formation d'un inhibiteur de la fibrinolyse, TAFI (Bajzar et al. 1996).

I.4.3.5.3 Propriétés ANTI-INFLAMMATOIRES de la voie de la PC

Parallèlement à ses propriétés anticoagulantes, la voie de la protéine C joue un rôle majeur dans le contrôle de la réponse inflammatoire, tout particulièrement en cas de sepsis. Les dommages de la microcirculation sanguine, observés lors de sepsis sévères, sont le reflet de troubles de la coagulation et de la réponse inflammatoire de l'hôte. La morbi-mortalité rencontrée lors de sepsis serait corrélée à l'importance de ces lésions de la microcirculation. Des patients avec des formes sévères de choc septique peuvent développer

des purpura (Powars et al. 1987) similaires à ceux rencontrés chez des enfants atteints d'un déficit homozygote en protéine C. En effet, le tropisme de prédilection de la PCa est localisé essentiellement au niveau de la microcirculation où la concentration en TM est élevée par rapport à la grande circulation. En raison de l'homologie de l'EPCR avec la famille CD1/CMH qui joue un rôle dans la présentation d'antigènes protéiques aux récepteurs cellulaires, il est très probable que les propriétés anti-inflammatoires de la PCa puissent être médiées via EPCR.

✓ ***Histoire de la découverte des propriétés anti-inflammatoires de la protéine C***

Les premières études en 1979, avec un modèle d'injection de doses létales d'E.coli chez des chiens mis sous circulation extra-corporelle, avaient pré-senti que l'activation d'un anticoagulant naturel pouvait avoir un effet protecteur en cas de choc septique (Beller-Todd et al. 1979). Hinshaw et al.(Hinshaw et al. 1982) confirmait en 1982 que des chiens placés sous circulation extra-corporelle (CEC) développaient un anticoagulant naturel qui prévenait la thrombose du circuit. La même équipe découvrait également que ces chiens placés sous CEC devenaient résistant à des doses létales d'E. coli (Beller-Todd et al. 1979; Murphy et al. 1980; Hinshaw et al. 1982).Cet anticoagulant naturel découvert était la protéine C activée. Dans la même année, il était démontré que la thrombine pouvait activer sélectivement la protéine C via le complexe thrombine-TM (Comp et al. 1982). Dès lors, une perfusion de thrombine était réalisée pour activer la protéine C avant d'exposer les animaux avec des doses létales d'E.coli. Là encore les animaux étaient protégés (Taylor et al. 1984). Afin de tester si la PCa pouvait directement protéger d'un choc septique induit à E. coli, de la PCa était transfusée chez des babouins soit avant ou après la transfusion de doses létales d'E.col (Taylor et al. 1987). La encore, la PCa protégeait les deux groupes d'animaux. Néanmoins, ces études n'avaient pas confirmé si la PCa jouait un rôle protecteur naturel lors de sepsis. Pour aborder cette question, l'activation de la protéine C a été inhibée au cours d'une autre étude (Taylor et al. 1987) en utilisant un anticorps monoclonal anti-protéine C. Cet Ac avait la propriété de ne pas se fixer sur la PCa. Avec l'Ac présent, une dose d'E. coli qui normalement provoquait une réponse inflammatoire passagère (10% de la dose létale), devenait une dose toxique à l'origine d'un choc septique sévère avec défaillance multiviscérale et décès. Cette exacerbation des phénomènes inflammatoires induite par l'Ac anti-PC était ensuite prévenue par l'injection de PCa(Taylor et al. 1987).

✓ ***Propriétés anti-inflammatoires de la voie de la PC: études in vitro***

La protéine C et sa forme activée inhibent l'adhésion sélectine-dépendante des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire (Grinnell et al. 1994). Le rôle de la protéine C sur la mobilité des leucocytes a été également confirmé par Sturn (Sturn et al. 2003) dans un modèle *in vitro*. Il a démontré que la PC et la PCa inhibaient, de manière dose-dépendante, le chimiotactisme des neutrophiles induit par l'interleukine 8, le

formyl-Met-LeuPhe, l'antithrombine et le C5a. Ce contrôle du chimiotactisme cellulaire semble être médié par l'EPCR exprimé sur les neutrophiles puisque l'usage d'Ac anti-EPCR diminue l'effet inhibiteur de la PC et PCa sur la migration cellulaire (Sturn et al. 2003). Dans une étude publiée dans le Journal of Immunology, Grey (Grey et al. 1994) a retrouvé que la PCa diminuait la sécrétion de TNF de monocytes- macrophages exposés à des endotoxines.

TAFI, qui est une procarboxypeptidase B considérée comme appartenant à la voie de la protéine C puisque activée par le complexe thrombine-TM, présente également des propriétés anti-inflammatoires. Il a été démontré que TAFI était un puissant inhibiteur du C5a qui est une anaphylatoxine générée lors de l'activation du système du complément (Campbell et al. 2001). Cette inhibition du C5a pourrait protéger la microvascularisation des dommages provoqués par l'activation du complément lors de sepsis ou d'incompatibilité transfusionnelle.

✓ ***Propriétés anti-inflammatoires de la voie de la PC: études in vivo***

Lorsqu'un sepsis sévère s'accompagne d'une diminution en protéine C et d'une diminution d'expression de la TM, les boucles de la coagulation et de l'inflammation, sans rétrocontrôle par la voie de la protéine C, s'activent et s'auto-entretiennent pour potentiellement provoquer des lésions irréversibles. Parallèlement, l'induction de la coagulation secondaire à l'expression du facteur tissulaire par les endotoxines, provoquent l'activation du facteur X qui combiné au facteur Va, convertit la prothrombine en thrombine. D'autres mécanismes viennent également perturber la voie de la protéine C au cours du sepsis :

- Inhibition des fonctions de la TM par un rétro- contrôle négatif médié par des cytokines : interleukine 1(Nawroth et al. 1986), TNF- α (Nawroth et al. 1986) , inhibition de la transcription de la TM par le TNF- α (Conway et al. 1988; Lentz et al. 1991)
- Protéolyse de la TM par des élastase neutrophiles (Takano et al. 1990)
- Protéolyse de la protéine S par la thrombine et autres élastases (Griffin et al. 1982)

Dans un modèle expérimental d'induction de choc septique sur petits animaux, l'injection de TM permet de prévenir la survenue d'une coagulation intra-vasculaire disséminée et d'une défaillance multiviscérale (Gonda et al. 1993; Uchiba et al. 1995; Hasegawa et al. 1996) et de diminuer la synthèse de TNF- α (Hancock et al. 1992; Taoka et al. 1998).

Dans un modèle expérimental d'induction de choc septique sur grands animaux, la PCa permet de bloquer les conséquences fatales d'une transfusion létale d'E. coli chez le babouin (Taylor et al. 1987). A l'opposé, bloquer l'activation de la PC dans un tel modèle, amplifie la réponse d'une transfusion non létale d'E. coli et provoque des lésions inflammatoires et thrombotiques gravissimes (Taylor et al. 1987). L'inhibition de la protéine S provoque une réponse similaire au blocage de l'activation de la PC lors d'un sepsis induit et cette réponse est inversée si la concentration de protéine S est ramenée proche de la normale (Taylor et al. 1991).

Lors d'études cliniques, il a été retrouvé que les taux en protéines C et S diminuent dramatiquement chez des patients en choc septique (Griffin et al. 1982) et en particulier en cas de méningites à méningocoques. Le risque de mortalité est corrélé à l'importance de la diminution de ces deux molécules.

Des études cliniques préliminaires ont ainsi suggéré que l'administration de protéine C pouvait améliorer le pronostic de certains patients en choc septique, notamment lors de purpura fulminans compliqué de CIVD (Gerson et al. 1993; Rintala et al. 1996; Smith et al. 1997).

I.4.3.5.4 Propriétés anti-apoptotiques de la voie de la protéine C :

Le clivage du récepteur PAR-1 par le complexe PCa-EPCR provoquerait un signal cellulaire à l'origine d'une inhibition de l'apoptose (Riewald et al. 2002; Cheng et al. 2003). En effet, Cheng et al. (Cheng et al. 2003), dans un modèle d'anoxie cérébrale *in vitro* et *in vivo*, ont démontré, que la PCa exerçait un effet cytoprotecteur dose dépendante et prévenait les lésions anoxiques dans 60% des cellules. Le blocage des récepteurs PAR-1 annulait l'effet cytoprotecteur de la PCa alors que le blocage de PAR-2 n'avait aucune conséquence.

I.4.1 ROLE DE L'INHIBITEUR DE LA FIBRINOLYSE ACTIVE PAR LA THROMBINE (TAFI)

Le TAFI (Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor) est un inhibiteur de la fibrinolyse découvert dans les années 1990. Son fonctionnement est intimement lié à celui de la voie de la protéine C. Il s'agit d'une carboxypeptidase, synthétisée par l'hépatocyte sous forme de zymogène inactif. Il est activé dans un rapport de concentration 100 pour 2 après formation d'un complexe trimoléculaire avec la thrombine et la TM. TAFI s'oppose à l'action du t-PA sur la fibrine en catalysant le clivage des résidus lysines situées à l'extrémité C-terminale de la fibrine partiellement dégradée par la plasmine.

La PCa limite cependant l'effet de TAFI sur la fibrine et possède ainsi une activité profibrinolytique de cinétique lente. C'est la concentration locale de TM qui semble représenter le facteur régulateur de ces deux actions opposées, car à haute concentration elle diminue l'activation de TAFI et inversement.

L'importance physiologique de TAFI n'a pas encore été pleinement appréciée mais il semblerait que TAFI puisse être un « pont » important entre la coagulation et la fibrinolyse.

I.4.2 ANOMALIES HEREDITAIRES DE LA VOIE DE LA PROTEINE C

L'importance clinique de cette voie physiologique est confirmée par les complications thrombo-emboliques majeures observées chez des enfants avec des déficits complets en protéine C ou protéine S (Reitsma et al. 1993; Gandrille et al. 1997). Les déficits incomplets ou hétérozygotes en protéine C ou protéine S sont par contre plus fréquents avec une incidence de 1 pour 300 individus (Lane et al. 1996; Lane et al. 1996). Ces déficits incomplets représentent un risque modéré de thrombose mais associés à d'autres facteurs de risque, ils peuvent significativement majorer la survenue de complications thrombotiques. La résistance à la protéine C activée, qui est le plus connu des facteurs de risque de thrombose veineuse, est également liée aux anomalies de la voie de la protéine C.

I.4.2.1 Déficit en protéine C

C'est en 1982 que Griffin et al. ont associé pour la première fois un risque de thrombose veineuse à des taux plasmatiques bas en protéine C (Griffin et al. 1981). En 1984, le tableau clinique du déficit homozygote en protéine C est décrit chez des nouveau-nés ayant développés des thromboses au niveau de la microcirculation cutanée à l'origine de purpura fulminans et d'une coagulation intra-vasculaire disséminée (Estelles et al. 1984; Seligsohn et al. 1984). Ces lésions peuvent être prévenues par la perfusion de protéine C mais réapparaissent si le taux en PC redescend à des taux trop bas.

I.4.2.2 Déficiences de l'activation de la PC

Des anomalies dans le processus d'activation de la protéine C et tout particulièrement au niveau de la TM, peuvent également représenter un risque thrombo-embolique. Ainsi plusieurs études ont identifié des mutations et un polymorphisme de la TM pouvant être associées à un risque majoré d'infarctus du myocarde ou de thromboses veineuses (Ohlin et al. 1995; Kunz et al. 2002). Ireland et al. (Ireland et al. 1997) ont également identifié des anomalies dans le promoteur de l'extrémité 5' du gène de la TM chez 5 patients parmi 104 ayant présentés un infarctus du myocarde. Ces mutations pourraient diminuer l'expression de la TM et contribuer à un risque accru d'IdM. Dans un groupe contrôle apparié issu de la population générale, seulement 1 patient sur 104 avait des anomalies comparables de la région 5' de la TM. Chez la souris, des mutations du gène de la TM induisent des complications thrombotiques sévères (Weiler-Guettler et al. 1998).

I.4.2.3 Résistance à la protéine C activée ou Facteur V Leiden

Le facteur de risque de thrombose veineuse le plus fréquent, appelé résistance à la protéine C activée, est également lié à la voie de la PC. Normalement, la PCa inactive le FVa par une première protéolyse au niveau

de l'Arg 506 suivie d'un second clivage au niveau de l'Arg306 (Egan et al. 1997; Mann et al. 1997). Le mécanisme le plus commun pour la résistance à la PCa est une mutation du facteur V, avec remplacement de l'Arg506 par un résidu Gln. Cette substitution rend la liaison résistante au clivage par la PCa (Dahlback 1994). Cette mutation du facteur V est également appelée Facteur V Leiden parce que les bases moléculaires de la résistance à la PCa ont été identifiées dans la ville de Leiden (Bertina et al. 1994). En conséquence l'inactivation du FVa Leiden par la PCa est seulement possible au niveau de l'Arg306, qui est un clivage plus lent par rapport à la protéolyse de l'Arg506. Heureusement, la protéolyse au niveau de l'Arg306 est améliorée par la protéine S. (Rosing et al. 1995). Cette observation explique pourquoi un déficit en Protéine S associé à un facteur V Leiden soit à l'origine d'un risque significativement plus élevé de thrombose.

I.4.3 INCOMPATIBILITE DE LA VOIE DE LA PROTEINE C EN XENOTRANSPLANTATION

Le rejet lors des xénotransplantations est marqué par des lésions vasculaires associées à des dépôts de fibrine et une activation plaquettaire à l'origine d'un infarctus du greffon (Bach et al. 1994). L'activation de la thrombine, générée au cours de ces rejets, pourrait être favorisée par la perte du rétro-contrôle assuré par la TM secondaire à l'activation des cellules endothéliales en réponse à des stimuli pro-inflammatoires tels que le TNF- α (Nawroth et al. 1986), l'interleukine-1 (Nawroth et al. 1986) ou des lipopolysaccharides (Moore et al. 1987) et par la lyse cellulaire provoquée par l'activation du complément. La perte de fonction de la TM provient à la fois de la diminution de la transcription de la TM (Conway et al. 1988; Kapiotis et al. 1991) et de sa propre dégradation. En xénotransplantation, une incompatibilité entre la TM porcine et les facteurs de la coagulation du primate pourrait contribuer à amplifier ces troubles de la thrombo-régulation (Lawson et al. 1996). Cette incompatibilité moléculaire d'espèce serait d'autant plus pernicieuse en xénotransplantation car les voies physiologiques procoagulantes à l'origine de l'activation de la thrombine semblent être compatibles et même « hyperfonctionnels » (Siegel et al. 1997) alors que les voies de rétro-contrôle semblent être déficientes.

I.4.4 ROLE DU FACTEUR WILLEBRAND EN XENOTRANSPLANTATION

Il a été démontré que le facteur von Willebrand (vWF) du porc et en particulier le domaine A1 se lie à la molécule GPIb des plaquettes humaines en dehors de tout stress de cisaillement normalement nécessaire (Pareti et al. 1992; Mazzucato et al. 1996). Cette interaction du vWF porcin avec le GPIb plaquettaire humain pourrait induire une activation plaquettaire non régulée. La libération de multimères de haut poids moléculaires du vWF porcin associée à une activation des cellules endothéliales pourrait ainsi engendrer la formation de microthrombi plaquettaires menant à l'infarctus du xénotgreffon.

I.5 XENOTRANSPLANTATION: BARRIERE INFECTIEUSE

La xénotransplantation comporte un risque de transmission de virus d'origine animale à l'homme. Ce risque est tel qu'il a écarté définitivement le singe comme animal donneur d'organes xénogéniques. En effet le Syndrome d'Immuno- Déficience Acquise Humaine (SIDA) serait une zoonose transmise par les primates non humains (Hahn et al. 2000). Le VIH du groupe M qui est responsable de la grande majorité des infections à VIH proviendrait d'une transmission animale à l'homme en raison d'une réactivité croisée entre les deux espèces (Gao et al. 1999). Le singe est un hôte naturel et un porteur sain pour ces virus de la famille des lentivirus. Le choix du porc n'a pas écarté non plus le risque de zoonose car il est porteur de rétrovirus endogènes porcins appelés PERV (Porcine Endogenous Retrovirus) qui sont intégrés au génome de leur hôte sous forme d'ADN proviral et transmis de façon mendélienne. Il existe au moins 50 copies de PERV dans les chromosomes porcins qu'il est donc impossible d'éliminer par méthode d'élevage indemne de pathogènes. Ainsi la xénotransplantation de porc sur homme se ferait- elle avec des organes porteurs de PERV.

Puisqu'il a été montré récemment par différentes équipes que les PERV pouvaient infecter des cellules humaines *in vitro* (Jackman et al. 1987), il est fondamental que ce risque soit recherché chez l'homme. Cependant, des études menées *in vivo* sur des séries limitées de patients ayant eu un contact avec du tissu porcine n'ont pas retrouvé de transmission de PERV. L'étude la plus importante, d'échelle internationale, a analysé 160 patients ayant été exposés à des tissus porcins par des perfusions avec des organes de porcs (foie, rein...), par des greffes d'ilôts de Langerhans ou encore par des greffes de peau (Paradis et al. 1999). Aucune infection à PERV n'a été retrouvée et de manière surprenante, un microchimérisme (consistant en la persistance de cellules porcines vivantes chez le receveur) a été détecté chez certains patients. Cette absence de transmission de PERV à l'homme s'expliquerait par l'expression d'épitopes Gal sur ces particules virales qui seraient ainsi reconnues et éliminées par les anticorps naturels.

I.6 XENOTRANSPLANTATION : BARRIERE PHYSIOLOGIQUE

Un obstacle important au succès de la xénotransplantation pourrait être une inadéquation physiologique des organes porcins une fois transplantés chez l'homme. L'évaluation de la fonction des greffons bute sur les courtes survies des organes xénogéniques porcins chez le singe.

D'un point de vue théorique, sur plus de 130 espèces de mammifères, seuls l'homme et le porc partagent le même type anatomique de rein. Il s'agit d'un rein multipyramidal avec un cortex indivisé et plusieurs

structures médullaires (Valentin et al. 1999). Anatomiquement, l'implantation chirurgicale d'un rein de porc en fosse iliaque chez l'homme est techniquement réalisable. Le poids et la taille sont comparables à ceux de l'homme. Le porc présente une protéinurie physiologique moyenne de 0,4 mg/mn avec une concentration maximale de 2,7 g/l. L'existence d'une faible sudation, associée à une moindre capacité à concentrer les urines expliquent une relative polyurie du porc de 2 à 4 l/24h. Ce phénomène pourrait être amplifié par le fait que l'hormone antidiurétique (HAD) humaine serait moins efficace sur le rein porcin. L'équilibre acido-basique est différent de celui de l'homme avec un pH plus alcalin (7,48 vs 7,42 chez l'homme). La pression artérielle du porc est supérieure à celle de l'homme, tout comme la température corporelle: 38,5°C vs 37,0°C. Cette notion laisse supposer que les cinétiques enzymatiques pourraient être différentes si un rein de porc était placé dans un environnement humain. Les valeurs des électrolytes et métabolites plasmatiques (glucose, urée, créatinine) sont quant à elles identiques chez les deux espèces.

En pratique la transplantation de rein de porc chez le singe n'induit pas de modifications physiologiques majeures (Zaidi et al. 1998; Yamada et al. 2005)(Zaidi et al. 1998), cependant des primates greffés avec un rein porcin développent une anémie marquée, soulevant la possibilité d'une incompatibilité de l'érythropoïétine porcine chez le primate. Dans les cas passés de xénotransplantation de foie de singe chez l'homme, il a pu être noté chez les receveurs humains des hypocholestérolémies correspondant en fait à un taux normal de singe.

I.7 XENOTRANSPLANTATION : RECOMMANDATIONS DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS)

Une importante réunion visant à établir des recommandations et une régulation d'éventuels essais cliniques en xénotransplantation (2009) a eu lieu en novembre dernier à Changsha en Chine. Cette réunion a permis de réunir sous l'égide de l'organisation mondiale de la santé, des autorités chinoises et de l'association internationale de xénotransplantation, les experts de chaque pays impliqués dans le domaine de la xénotransplantation. La France a ainsi été représentée par le Pr Gilles Blancho (Figure 14). L'objectif de cette réunion était de dresser l'état des lieux de la xénotransplantation au niveau international et d'établir des recommandations encadrant la recherche et d'éventuels essais cliniques en xénotransplantation. Plusieurs recommandations ont ainsi été établies, destinées aux états et aux investigateurs d'éventuels essais cliniques. Elles ont fait l'objet de deux articles dans la revue *Xenotransplantation* publiés en 2009 (2009; Cooper 2009).

Il est ainsi demandé, à titre d'exemple, aux états membres de l'OMS d'identifier et de répertorier toutes les activités pratiquées dans leur territoire ayant attrait à la xénotransplantation, de s'assurer que les organes de santé publique en ont évalué le risque infectieux et que ces activités soient encadré par un cadre juridique.



Figure 14 : Photo officielle des experts réunis à Changsha sous l'égide de l'OMS.

II. MATERIELS et METHODES

II.1 MATERIELS :

II.1.1 SOLUTES

Tampon TE	10 mM Tris-HCL (pH 7.4), 1 mM EDTA
Gel d'agarose 1.5 %	1.5 g DNA grade agarose in 100 ml of 0.5x TBE with 0.5 µg/ml
Eau purifiée Milli Q Ultra	MQ-H ₂ O (Millipore, USA)
Tampon TBE (5x)	0.5 Tris, 20 mM sodium acetate, 20 mM EDTA, pH 8.2 with glacial

II.1.2 MATERIELS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Produits	Fournisseurs
Agar	Bio 101 ® systems, Q Biogene USA
Ampicilline	Sigma, Australia
Bromure d'Ethidium	Sigma chemical Co.
L-Broth	Bio 101®systems, Q BIOGENE, USA
QUIAGEN gel extraction kit	QUIAGEN GmbH (Hilden, Germany)
QUIAGEN Maxi-prep Purification Kits	QUIAGEN Gmch (Hilden, Germany)
Oligonucleotide primers	Sigma Genosys
pBlunt-Vector	Invitrogen
pBos-Flag-Vector	
pIRES-Vector	Invitrogen
Dideoxynucleotides (dATP, dCTP...)	Amersham Pharmacia Biotek, UK
Restriction Enzymes and Buffers	Promega, Boehringer Mannheim, New England
DNA sequencing reactions	BIGDYE Terminator Cycle Sequencing Ready

II.1.3 MATERIELS DE BIOCHIMIE

Produits	Fournisseurs
Benchmark ® Prestained protein ladder	Invitrogen
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Bio-Rad laboratories (Hercules,CA,USA)
Ammonium persulphate (APS)	Bio-Rad laboratories (Hercules,CA,USA)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad laboratories (Hercules,CA,USA)
Acrylamide, bisacrylamide	Bio-Rad laboratories (Hercules,CA,USA)
PVDF membrane	Bio-Rad laboratories (Hercules,CA,USA)
Tween 20	BDH Laboratory Supplies, Poole, England
Triton X-100	Bio-Rad laboratories (Hercules,CA,USA)

II.1.4 MATERIELS DE CULTURE CELLULAIRE

Produits / Equipment	Fournisseurs
Flasques pour tissus cellulaires	TPP (Switzerland)
Dulbecco's Modified Eagles (DME)	GIBCO BRL Life Technologies Inc (Gaithersburg,
Sérum de veau foetal (SVF)	Invitrogen
N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-	Invitrogen
Dimethylsulphoxide (DMSO)	BDH Chemicals (Kilsyth, Victoria, Australia)
Cuvettes d'électroporation	Gene Pulser®/ E.Coli Pulser™ Cuvettes (Bio-Rad)

II.1.5 LABORATOIRE DES GRANDS ANIMAUX (LGA) DE L'UNITE INSERM 643

Toutes les expérimentations *in vivo* se sont déroulées au LGA qui est spécialement dévolu à la prise en charge de porcs et de primates, avec des salles d'hébergement par espèces et un bloc opératoire.

II.1.6 LES ANIMAUX

Les porcs transgéniques pour la molécule CD 55 humaine ont été fournis par le laboratoire Imutran. Ces animaux étaient de groupe sanguin O. Des porcs non transgéniques mais de même fond génétique ont été utilisés en tant que groupe contrôle (France Hybride). Pour des raisons de compatibilité de taille entre donneur et receveur, leur poids variait entre 15 et 20 kg.

Les babouins de race Papio Anubis, de 8 à 15 kg, provenaient du centre d'élevage du CNRS de Rousset (France). Ils étaient sélectionnés sur leur séronégativité pour les virus suivants : simian immunodeficiency virus (SIV), simian T cell leukemia virus (STLV1 et 2), simian retrovirus (SRV), cercopithecine herpes virus 1 et 2 puis admis dans notre laboratoire trois semaines avant l'expérimentation et mis en quarantaine.

II.1.7 PROCÉDURE CHIRURGICALE ET IMMUNOSUPPRESSION

Trois semaines avant la greffe, les babouins subissaient un protocole d'autotransfusion (prélèvement de 10% de leur masse sanguine sur poches citratées) avec compensation par de l'érythropoïétine à la dose de 400 U/semaine en sous-cutané, afin de pouvoir traiter toute hémorragie ou anémie post-opératoire. Avant la transplantation, un cathéter jugulaire interne tunnellisé sous la peau était positionné afin de passer les perfusions de solutés d'hydratation et les traitements intraveineux.

L'anesthésie était induite par injection intra- musculaire d'un mélange de filetamine/zolazépam (Zolétil®) à la dose de 20 mg/kg et maintenue par inhalation d'isoflurane, d'oxygène et d'azote après intubation. Ce même protocole était utilisé à la fois pour le donneur (porc) et pour le receveur (babouin). Après dissection du rein du donneur, l'anticoagulation était assurée par de l'héparine (300UI/kg). Une fois l'aorte abdominale canulée, les reins étaient perfusés par du liquide de conservation à 4°C. Ensuite la transplantation rénale était faite en position hétérotopique en intra-abdominale suivie d'une binéphrectomie des reins propres du receveur.

Quatre séries de xénogreffes ont été effectuées :

- Une série contrôle avec des animaux non transgéniques (n=8) (**série A**)
- Une série avec des organes transgéniques pour la molécule humaine CD55 (n=5) (**série B**)
- Une série avec des organes transgéniques pour hCD55 mais avec un protocole d'immunosuppression renforcé avec de la cyclophosphamide débutée 24h avant la xénotransplantation (n=4) (**série C**)
- Une série avec des organes transgéniques pour hCD55 avec le même protocole d'immunosuppression que la série C mais avec en plus des immunoabsorption (**série D**)

II.1.7.1 Immunoabsorption

Les immunoabsorptions étaient réalisées sur une colonne d'immuno-affinité Ig-Therasorb (immunoglobulines anti-humaines de mouton) pour les séries A, B et D. Elles étaient prévues à J-1 et à J5. La seconde immunoabsorption était suivie d'une perfusion d'immunoglobulines intraveineuse (IVIg) à dose immunomodulatrice de 1g/kg pendant deux jours. Ces IVIg étaient déplétées auparavant des Ig anti-Gal en utilisant une colonne de disaccharide synthétique (Bdi-Bio). La série C ne comportait pas d'immunoabsorption.

II.1.7.2 Immunosuppression

Le traitement immunosuppresseur comprenait:

- **Cyclophosphamide (CyP)** : administré par voie intraveineuse (IV) à une dose de 40 mg/kg à J0 puis 10 mg/kg à J2 et J4 pour les séries A et B. Le cyclophosphamide était administré à J-1, J0, J2 et J4 aux doses de 40, 20, 20 et 10 mg/kg pour les séries C et D.
- **Cyclosporine A (CsA)** : administrée par voie IV à 3 mg/kg/j initialement pour atteindre un niveau sanguin autour de 1 µg/ml
- **Mycophénolate mofétil (MMF)** : administré per os à 70 mg/kg/j
- **Corticoïdes** : administrés IV à 1 mg/kg/j initialement puis à dose dégressive de 0,05 mg/kg/j pour atteindre un plateau à 0,2 mg/kg/j à J18.

II.1.7.3 Monitoring des animaux

Le monitoring quotidien des animaux comprenait l'aspect clinique, la diurèse, la biologie de la fonction rénale (urée, créatinine), ionogramme, numération formule sanguine, cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges de porc et la titration des anticorps anti-Gal. Une biopsie rénale était prévue une fois par semaine à partir de J5 pour les groupes A, B et C.

II.1.7.4 Biopsie des greffons

Les biopsies de greffon étaient effectuées par voie chirurgicale, afin d'examiner macroscopiquement l'aspect du greffon et de prélever suffisamment de tissu pour une analyse histologique classique (coloration hématoxyline-eosine), des analyses immunohistochimiques et des congélations en vue de différentes études transcriptionnelles.

II.2 METHODES:

II.2.1 METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

II.2.1.1 Préparation des boîtes d'agarose et Milieu de culture

Les boîtes d'agarose étaient préparées en mélangeant 10 g d'agarose à culture (BD Biosciences), 10 g de bactotryptone (BD Biosciences), 5 g d'extrait de levure (BD Biosciences) et 10 g de NaCl dans un volume final de 500ml d'eau purifiée mis ensuite à l'autoclave. L'antibiotique souhaité était ajouté pendant la phase de refroidissement. L'antibiotique pour sélectionner le vecteur pBos, était l'ampicilline (100µg/ml) et la kanamicine pour le vecteur pCR-Blunt (50µg/ml). Les boîtes étaient stockées à 4°C pendant un mois.

Le liquide de culture L-Broth était préparé dans 500 ml d'eau purifiée en ajoutant 5 g de bactotryptone, 2,5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl puis autoclavé.

II.2.1.2 Préparation de cellules compétentes d'E. coli

Les cellules compétentes d'E. coli étaient préparées selon le protocole de Inoue et al (Inoue et al. 1990) avec quelques modifications. Les cellules compétentes étaient maintenues en culture dans des boîtes d'agarose supplémentées en tétracycline à la concentration de 50µg/ml. Une seule colonie était inoculé dans 250 ml de L-Broth et mise en culture à température ambiante avec agitation puis incubée sur de la glace pendant 10 min. Après centrifugation, le culot était resuspendu dans 80 ml de tampon de transformation et incubé sur de la glace pendant 10 min puis recentrifugé. Le culot était finalement resuspendu dans 7 ml de tampon de transformation. Du DMSO était rajouté à une concentration finale de 7%. Les cellules étaient aliquotées dans des flacons adaptés pour un stockage dans du nitrogène liquide.

II.2.1.3 Transformation bactérienne

Les bactéries compétentes étaient dégelées sur de la glace et des aliquots de 20 ou 100 µl étaient transférés dans des tubes stériles à centrifugation contenant le plasmide. Le mix était incubé sur de la glace pendant 30 min puis chauffé à 42°C pendant 90 secondes et réincubé sur de la glace pendant 5 min. Du liquide de culture L-Broth (900µl pour 100µl de cellules compétentes) était ajouté et les tubes étaient incubés à 37°C avec agitation pendant 45 min. Le mix était étalé sur des boîtes à agarose et incubées à 37°C toute la nuit. Les colonies positives étaient ensuite identifiées par digestion enzymatique.

II.2.1.4 Isolation des plasmides à DNA

II.2.1.4.1 Isolation par Miniprep

3,5 ml de milieu de culture L-Broth était inoculé par une seule colonie bactérienne avec l'antibiotique approprié et incubé à 37°C pendant toute la nuit dans un incubateur à agitation. L'ADN plasmidique était

isolé de la culture en utilisant un kit à haute pureté d'isolation (Eppendorf High pure plasmid isolation kit) et stocké à 4°C ou -20°C jusqu'à utilisation.

II.2.1.4.2 Isolation par Maxiprep

100 ml de liquide de culture L-Broth était inoculé par une seule colonie bactérienne avec l'antibiotique adapté et incubé à 37°C pendant toute la nuit dans un incubateur à agitation. L'ADN plasmidique était isolé en utilisant le kit QIAGEN pour isolation d'ADN plasmidique à grande échelle (QIAGEN Plasmid Maxi Kit). Le plasmide purifié était précipité en utilisant 0,7 volume d'isopropanol à température ambiante et centrifugé pendant 30 min. Le culot à ADN était lavé avec 1 ml d'éthanol à 70% et séché à l'air libre avant resuspension dans du tampon TE. L'ADN obtenu était quantifié par électrophorèse et spectrophotométrie puis stocké à -20°C.

II.2.1.5 Préparation d'ADN et d'ARN

II.2.1.5.1 Isolation de l'ADN génomique

L'ADN génomique était extrait en utilisant le kit QIAamp ADN (Qiagen – Australia)

II.2.1.5.2 Extraction d'ARN

✓ Préparation des échantillons :

Les biopsies étaient conservées dans de l'azote liquide à l'intérieur d'ampoules adaptées. Le jour de la manipulation, la biopsie était déposée dans un flacon de 50 ml dans lequel était ajoutés 9,5 ml d'isothiocyanate de guanidium (GSCN) et 0,5 ml de 2-βmercaptoéthanol. Le GSCN cassait les protéines et provoquait un effet chaotrope, le βmercapotéthanol cassait les ponts disulfures des protéines. Ainsi l'utilisation des deux produits permettait d'optimiser la dégradation des RNAses. La biopsie était ensuite fragmentée, mixée avec un « mixeur » ultra-TURAX. Le rotor était lavé entre chaque mixage. Le flacon de 50 ml était ensuite centrifugé 5 min à 2000 tpm (tours par minutes).

✓ Ultracentrifugation :

Dans un tube à ultracentrifugation (tube UC)(Beckman®) contenant 1 ml de chlorure de Césium, 3 ml de surnageant étaient déposés doucement sur le CICs pour ne pas mélanger les deux phases. Le reste du surnageant était stocké à -20°C. Le CICs de part sa densité permettait uniquement à l'ARN de plonger au fond du tube. Après équilibrage du poids des tubes, deux par deux en ajoutant du sarkosyl 10% si nécessaire, les tubes étaient ultracentrifugés : 17 heures à 36000 tours par minutes (tpm) (20°C), accélération maximale et décélération lente.

✓ *Préparation de l'ARN :*

Le surnageant du tube UC est vidé à l'aide d'une pompe à vide en aspirant verticalement. Le tube UC est coupé avec une lame de bistouri à 1 cm du fond. Le culot d'ARN est resuspendu dans 100 µl de TR (Tris HCL 10 mM pH8 + EDTA 1mM + SDS 0,1%). La solution est transvasée dans un eppendorf et le culot resuspendu dans 100 µl de TR. Puis 20 µl d'acétate de sodium 5M et 550 µl d'éthanol absolu froid sont ajoutés. L'eppendorf est déposé 1 heure à -80°C ou toute la nuit à -20°C.

II.2.1.5.3 Préparation de l'ADNc

L'ADNc était préparé par PCR après transcription inverse à partir ARN total en utilisant une Superscript III reverse transcriptase (RT) (Invitrogen). Pour chaque réaction, 2µg d'ARN, 1 µl d'oligoDT (Promega), 1 µl de random hexamers (Promega), 1 µl de 10 mM dNTPs (Invitrogen) et d'eau distillée étaient mélangés dans un volume final de 13 µl. Le mix était incubé pendant 10 min à 65°C dans un thermocycler puis 1 min sur de la glace. 4µl de tampon x5 (Invitrogen), 1 µl de (R,R)- dithiothreitol (DTT) (Promega), 1 µl de RNase out (Invitrogen) et 1 µl de Superscript III RT étaient ajoutés à chaque réaction pour un volume total de 20µl. Le mix était incubé pendant 5 min à 25°C dans un thermocycler puis 50 min à 50°C et finalement à 70°C pendant 15 min.

II.2.1.5.4 Amplification rapide des extrémités d'ADNc.

La technique d'amplification rapide des extrémités d'ADNc (rapid amplification of cDNA ends, RACE) permet de déterminer les extrémités 5' (incluant le site de transcription) ou 3' d'un ADNc. Cette technique amplifie un ADNc issu d'un ARN entre une localisation de séquence connue et l'extrémité inconnue 5' (5'-RACE) ou 3' (3'-RACE). Dans les deux cas, une connaissance limitée de la séquence d'ARNm suffit. La séquence connue sert à choisir des amorces spécifiques orientées vers l'extérieur de la séquence et qui produisent des fragments d'ADNc chevauchants. Les kits RACE utilisés dans notre étude proviennent de Invitrogen™.

Dans la technique 3'-RACE, la queue poly(A) d'un ARNm représente une séquence simple pour une alorçe de PCR. Dans ce cas, l'ARNm est transformé en ADNc par la reverse transcriptase en utilisant une amorce oligo(dT) à laquelle est ajouté un adaptateur de séquence connue. L'ADNc est ensuite amplifiée par PCR en utilisant une amorce complémentaire d'une séquence connue de l'ADNc et une autre amorce complémentaire de l'adaptateur. La séquence 3' de l'ADNc (et donc de l'ARNm) peut ensuite être facilement déterminée.

Dans la technique 5'-RACE, plusieurs variantes techniques existent. Celle utilisée lors du clonage de gène porcin est la suivante. Une amorce spécifique antisens (GSP) de l'ARNm permet de réaliser une reverse transcription. Après obtention de l'ADNc et purification de ce dernier (l'ARNm est détruit par une RNase H et RNase TA), une queue poly(C) est ajoutée à l'aide de la TdT (terminal deoxynucléotidyl transferase) en

ajoutant du dCTP. Une PCR est ensuite effectuée à l'aide d'une amorce complémentaire de la queue polyC additionnée d'un adaptateur et d'une autre amorce située dans l'ADNc de séquence connue.

II.2.1.6 Electrophorèse d'ADN

L'électrophorèse d'ADN était réalisée avec des gels d'agarose/TBE. La concentration en agarose variait entre 0,8 et 2% dans 0,5X TBE et dépendait de la taille des fragments d'ADN à migrer. La quantité d'agarose appropriée était mélangée avec du TBE 0,5X et chauffée dans un micro-onde jusqu'à dissolution de l'agarose. Après un refroidissement partiel, 1 µl d'ethidium bromide en solution (10 mg/ml) était ajouté et mélangé. Le mélange était ensuite coulé dans un moule avec peigne jusqu'à solidification du gel. Les échantillons d'ADN étaient mélangés avec 1,5 µl de marqueur à ADN et étaient transférés dans les puits du gel pour être séparés par électrophorèse à 80-110 volts pendant 30 à 60 min. Les fragments à ADN étaient visualisés dans une chambre à ultra-violet et la taille des fragments était estimée par comparaison avec les marqueurs de taille Lambda DNA/Hind III combiné avec X174 DNA/HaeIII (Invitrogen).

II.2.1.7 Extraction d'ADN à partir de gels d'agarose

Après électrophorèse, les fragments d'ADN étaient excisés du gel à agarose. L'ADN était isolé des bandes d'agarose en utilisant le kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). A la dernière étape, l'ADN était dilué dans 50 ou 30 µl de tampon TE et stockée à -20°C.

II.2.2 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

II.2.2.1 Amplification par PCR

L'ADN génomique, l'ADN complémentaire et l'ADN plasmidique étaient amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) en utilisant 1 U de Taq ADN polymérase (Invitrogen) et le tampon de la Taq polymérase (X 1) avec les amorces appropriées. La PCR était réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 200 µM de dNTPS, le tampon Taq (x1), l'amorce spécifique 5' (à une concentration finale de 0,5 pmol), l'amorce 3' (à une concentration finale de 0,5 pmol), l'ADNc et la Taq polymérase. Les étapes typiques d'amplification étaient: 2 min à 94°C / 30 secondes à 55°C / 1 minute à 72°C pendant le premier cycle, 94°C pendant 30 secondes / 55°C pendant 30 secondes / 1 minute à 72°C pendant 5 cycles puis 94°C pendant 10 secondes / 55°C pendant 10 secondes / 45 secondes à 72°C pendant les 24 à 29 cycles suivis d'un cycle final à 72°C pendant 5 min. Les réactions étaient réalisées dans un thermocycler à ADN (MJ Research, Watertown, MA, USA).

Pour le clonage des gènes codant pour l'EPCR humain et porcine ainsi que pour la thrombomoduline humaine et porcine, une enzyme de haute fidélité platimium Pfx (Invitrogen) était utilisée.

Le système Failsafe PCR (Epicentre – USA) a été utilisé pour l'amplification de la thrombomoduline porcine en raison de la difficulté à obtenir une amplification avec la Pfx DNA polymérase. Le kit Failsafe est constitué

de 12 pré-mixtes avec un mixte de polymérase de haute fidélité. Ces pré-mixtes forment 12 cocktails avec des concentrations variables de MgCl₂ et de Failsafe facilitateurs contenant de la bétaine ayant la propriété d'améliorer l'amplification PCR d'ADNc riches en bases G-C ou avec une forte structure secondaire. Les 12 cocktails du kit Failsafe étaient utilisés avec 17 µl d'H₂O, 1 µl d'amorce sens et anti-sens à la concentration de 10 µM, 1 µl d'ADNc, 0,5 µl de la polymérase Failsafe et 10 µl du cocktail Failsafe. Le cocktail G a été utilisé dans les majorités des amplifications de la TM.

II.2.2 Amorces pour PCR

II.2.2.1 Création d'amorces dégénérées pour le gène de la Thrombomoduline porcine

L'élaboration des amorces dégénérées pour l'amplification de la TM porcine a été basée sur l'alignement des séquences nucléiques de l'ADNc codant pour la TM de plusieurs espèces, humaine (Jackman et al. 1987; Suzuki et al. 1987; Wen et al. 1987), de souris (Dittman et al. 1988; Dittman et al. 1989), de lapin (Deming et al. 2003), de rat (Wang et al. 1999) et de l'extrémité 3' de la TM bovine (Jackman et al. 1986). Cinq amorces 5' ont été conçues sur des séquences conservées entre espèces :

5' TM 182	5' TRA TGA CMG TGC GCT CCT C 3'
5' TM 320	5' TGC GCG GCT TCC AGT GGG TTA 3'
5' TM 1620	5' TCT CTG GTC GTG GCG CTT 3'
5' TM 1630	5' TTT GGC GCT TCT GTG TCA 3'
5' TM 1660	5' AAG AAG CAA GGC ACC TCA A 3'

Les amorces 3' ont été également élaborées à partir de régions conservées entre les 5 espèces animales disponibles :

3' TM 987	5' RCA GTC RTC CAC GTC CTC 3'
3' TM 1691	5' CGC ACT TGT ACT CCA GCT C 3'
3' TM 3504	5' CTG ACT TGG CCT GCT ACT TAT 3'
3' TM 3537	5' AAT TCC TCA GTT TCT TGA 3'

Plusieurs amorces antisens spécifiques aux séquences humaines et bovines ont été également créées:

hTM 1750	5' CTC AGA GTC TCT GCG GCG TCC GCT C 3'
bTM 1750	5' CTC AGA CTT TCT GAG GTG TGC GCT C 3'
3' hTM STOP	5' CCA GCT AAG GTG CTT TGG 3'
3' bTM STOP	5' CCA GCT AAG GTG CTT GGG 3'
3' hTM	5' GCA AGG ATT TTG CCT GTG TTC TAG 3'
3' bTM	5' GCA GGA GTT TTG CCC GTG TTC TAG 3'

II.2.2.2 Création d'amorces dégénérées pour l'amplification du gène porcin de l'EPCR

L'amplification PCR de l'EPCR porcin a été réalisée à partir d'amorces dégénérées dont les séquences ont été élaborées à partir des séquences de l'EPCR bovin (Fukudome et al. 1995), humain (Fukudome et al. 1994) et de souris (Fukudome et al. 1995). Après alignement des séquences nucléiques, les régions conservées entre espèces ont été sélectionnées pour créer les amorces suivantes :

Amorces « sens »	
5' EPCR 0	5' ATG TTG ACA ACA YTG CTG CC 3'
5' EPCR 195	5' CCT RAC GCA CGT GCT GGA AGG C 3'
5' EPCR 440	5' TCT TCG AWG TGG CTG GTG AAT GG 3'
Amorces "Anti-sens"	
3' EPCR 683	5' CAY CAG GAC GCC CAG GAC CAG 3'
3' EPCR 734	5' ACY TGT GCA CAG GAA GAT GCC 3'

Deux amorces spécifiques ont été conçues à partir des séquences humaines et bovines en amont du codon start :

5' hEPCR UTR	5' CGA GCC AGG AAC CCA GGT 3'
5' bEPCR UTR	5' AGA GCC AAG AGC CCA GGT 3'

II.2.2.3 Création d'amorces spécifiques pour le gène humain codant pour l'EPCR

Afin d'isoler le cadre de lecture du gène humain de l'EPCR pour exprimer la molécule fonctionnelle, les amorces 5' et 3' suivantes ont été conçues :

hEPCR-F1	5' TTC TCG AGC AAC TTC AGG ATG TTG AC 3'
hEPCR-R1	5' TTG CGG CCG CGG AGA GTA ATT AAC ATC GC 3'

Afin d'intégrer deux sites de digestion **SpeI** et **MfeI** aux extrémités 5' et 3' du cadre de lecture de l'EPCR humain, les amorces hEPCR-F3 et hEPCR-R3 ont été réalisées :

hEPCR-F3	5' GGA CTA GTC AAT TGC AAC TTC AGG ATG TTG AC 3'
hEPCR-R3	5' GGA CTA GTC AAT TGG AGA GTA ATT AAC ATC GC 3'

II.2.2.4 Création d'amorces spécifiques pour l'amplification rapide des extrémités du gène porcin de l'EPCR

Des amorces spécifiques de gènes (Gene specific primers GSPs) ont été conçues pour l'amplification rapide des extrémités du gène de l'EPCR porcin à partir de la séquence amplifiée par les amorces dégénérées. Les amorces étaient préférentiellement d'une longueur de 23 à 28 nucléotides, avec une proportion de bases GC de 50 à 70% et une température d'hybridation supérieure à 70°C pour permettre la réalisation d'une PCR

« touchdown ». Les GSPs pour l'amplification 5' RACE ont été désignées GSP1 et GSP2 pour l'amplification de l'extrémité 3' RACE.

EPCR GSP1	5' CGC CGT CCA CCT ACA TAC AGG AAG ATG C 3'
EPCR GSP1B	5' CGT CTC TGG CTG GAA ACT CAT GAA GGA G 3'
EPCR GSP1C	5' TAG GTG ACC ACT CTG GAG GCC GCC TGA G 3'
EPCR GSP2	5' GAG CTC CTT CAT GAG TTT CCA GCC AGA G 3'
EPCR GSP2B	5' TCC TGT ATG TAG GTG GAC GGC GGC GAT G 3'
EPCR GSP2C	5' CAT CAT CGC AGG AGT GGC TCT ATG CAT C 3'

II.2.2.2.5 Création d'amorces spécifiques pour l'amplification rapide des extrémités du gène porcine de la Thrombomoduline

Les amorces pour l'amplification RACE de l'extrémité de l'ADNc codant pour la TM ont été créés dans la séquence connue de la TM porcine amplifiée par les amorces dégénérées. Les amorces antisens GSP1 pour l'amplification 5' RACE étaient les suivantes :

TM GSP1	5' GGT AGC CCG CCT CGC AAA AGC ATG TGT 3'
TM GSP1B	5' GCT GCC ACC GAG GAG CGC ACT GTC ATG A 3'
TM GSP1C	5' TCG CCG CTC AGT AGC AGG GAG ATG A 3'
TM GSP1D	5' GCC ATC GCC TTC GCC GCT CAG TAG C 3'

Les amorces pour l'amplification 3'RACE de la TM étaient :

TM GSP2	5' CTC GGT GGC AGC AGA GGT CAT CTC CCT 3'
TM GSP2B	5' ATC GGT GCG AGG ACG TGG ACG ACT GCA A 3'
TM GSP2C	5' GCA TCG GTG CGA GGA CGT GGA CGA C 3'
TM GSP2D	5' CTG CAG GAG GAT GGG CGT TCT TGC G 3'
TM GSP2E	5' GTG TCA CCT GCG CAA GAA GCA AGG CAC C 3'
TM GSP2F	5' TGC ATT CGG GCG TGC TGG CTG GCA TCT C 3'

II.2.2.2.6 Création d'amorces dégénérées pour l'amplification du gène porcine codant pour la prothrombine porcine

Une paire d'amorces dégénérées (pPT-F1 et pPT-R1) a été créée sur la base de séquences de régions très conservées entre l'ADNc de la prothrombine humaine, bovine, de rat et de souris. Une seconde paire de primers pPT-F2 et pPT-R2 a ensuite été conçue à partir du fragment d'ADNc de la prothrombine de porc séquencé à partir des amorces pPT-F1 et pPT-R1.

Amorces	Séquences
pPT-F1	CCCAGGAGCTGACACACYATG
pPT-R1	TGAGCTTCAGTAGGGCGATGTC
pPT-F2	GACATCGCCCTACTGAAGCTCA
pPT-R2	TAGAAACAAACCACAAAAATAWTTTC

II.2.2.2.7 Création d'amorces spécifiques pour la construction de variants de la TM avec des domaines EGF permutés entre la TM humaine et la TM porcine

Amorces	Séquence (5' à 3')
pTMLec-F	CACGCGTCCTGAAGCGCAGCCCCTAGGCA
pTMEGF5-F	CCGCACAGGTGCCAGATGTT
pTMST-F	GACCCCATCCAGGAGAACAGCCGC
pTMEGF6-R	CGTCCACCTTGCCGGAGTCGCAGTCTGTGCCGG
pTMCyt-R	CACGCGTTTAGAGTTTCTGAGGCATCTGCCCA
hTMLec-F	CACGCGTGCACCCGCAGAGCCGCAG
hTMEGF4-F	GAGCCCGTGGACCCGTGCTTC
hTMEGF5-F1	CCGCACAGGTGCCAGATGTTTTGC
hTMEGF5-F2	CCGCACAGGTGCCAGATGTT
hTMEGF6-F	ATCTGCACGGACATCGACGAGTGC
hTMST-F	GACTCCGGCAAGGTGGACGGT
hTMEGF3-R	GAAGCACGGGTCCACGGGCTC
hTMEGF4-R	AACATCTGGCACCTGTGCGG
hTMEGF5-R	GCACTCGTCGATGTCCGTGCAGAT
hTMEGF6-R	GTTCTCCTGGATGGGGTCACAGTCGGTGCCAAT
hTMCyt-R	CACGCGTGCTTTGGTAGCAAAGCTG

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la création de variants de la TM avec des domaines EGF permutés entre la TM humaine et la TM porcine.

Variant	PCR 1	PCR 2	PCR 3
pTM-hEGF4	pTMLec-F/hTMEGF3-R	hTMEGF4-F/hTMEGF4-R	pTMEGF5-F/pTMCyt-R
pTM-hEGF5	pTMLec-F/hTMEGF4-R	hTMEGF5-F1/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/pTMCyt-R
pTM-hEGF6	pTMLec-F/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/hTMEGF6-R	pTMST-F/pTMCyt-R
pTM-hEGF56	pTMLec-F/hTMEGF4-R	hTMEGF5-F2/hTMEGF6-R	pTMST-F/pTMCyt-R
hTM-pEGF4	hTMLec-F/hTMEGF3-R	hTMEGF4-F/hTMEGF4-R	hTMEGF5-F/hTMCyt-R
hTM-pEGF5	hTMLec-F/hTMEGF4-R	pTMEGF5-F/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/hTMCyt-R
hTM-pEGF6	hTMLec-F/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/pTMEGF6-R	hTMST-F/hTMCyt-R
hTM-pEGF56	hTMLec-F/hTMEGF4-R	pTMEGF5-F/pTMEGF6-R	hTMST-F/hTMCyt-R

Tableau 7 : Amorces utilisées pour générer des variants de la TM avec des domaines EGF permutés entre la TM humaine et porcine.

II.2.2.3 Séquençage double-brin d'ADN

II.2.2.3.1 Technique de séquençage

Les réactions pour le séquençage d'ADN ont été réalisées en utilisant le kit BIGDYE Terminator cycle sequencing Ready Reaction (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) en suivant les recommandations de la compagnie. Après précipitation, l'électrophorèse des échantillons d'ADN était effectuée par le service de biologie moléculaire de l'université de Melbourne. Les deux brins d'ADN étaient séquencés en utilisant les amorces M13F et M13R et d'autres amorces internes si nécessaire.

II.2.2.3.2 Analyse des séquences

L'analyse et l'alignement des séquences étaient réalisés en utilisant le logiciel DS Gene suite (Accelrys Inc, San Diego CA, USA) ou Accelrys Gene 2.0 (Accelrys, Tokyo, Japan). Les séquences peptiques étaient analysées pour rechercher la présence d'un signal peptide et des sites de glycosylation en utilisant le programme SignalP 3.0 (Bendtsen JD, Nielsen H, von HG, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol 2004; 340: 783) et NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).

II.2.3 BIOLOGIE MOLECULAIRE

II.2.3.1 Déphosphorylation des vecteurs digérés

	REAGENTS
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fournie à 500 U; M820 A
Tampon x 10	100 mM Tris-HCl (pH=8)
Stop Buffer	200 mM EDTA (pH 8.0)

La déphosphorylation de l'extrémité 5' des vecteurs à ADN était réalisée afin de prévenir la religation des vecteurs. Pour un volume de réaction de 20µl, le vecteur était incubé avec 1µl (1U/µl) de SAP, 2µl de tampon x10 dans un volume approprié d'eau distillée à 37°C pendant 30 min. La réaction était stoppée par une incubation à 65°C pendant 15 min suivi de l'ajout de 2µl de tampon stop et une seconde incubation à 65°C.

II.2.3.2 Ligature d'ADN

La ligature de l'ADNc dans le vecteur plasmidique approprié était réalisée en associant le vecteur plasmidique "ouvert" par l'enzyme de restriction et le fragment d'ADNc à cloner à un ratio 1 :3 avec 1 U de ligase à ADN (Boehringer Mannheim), 5 à 10 µl de tampon à ligase X 2 et de l'eau distillée, pour un volume final de réaction de 10 ou 20 µl. Le mix à ligature était incubé à 16°C pendant 30 min. Le mix final était ensuite incubé avec des cellules compétentes pour transformation.

II.2.3.3 Blunt-ending des fragments d'ADNc

Les extrémités des fragments d'ADNc étaient émoussées selon la technique suivante : 2µg d'ADNc, 2 µl d'enzyme Klenow (Promega M220A), 10 µl de tampon Klenow, 5 µl de 10 mM dNTPs et de l'eau distillée étaient mélangés dans un volume total de 100 µl. Ce mix était incubé à 37°C pendant 30 min et la réaction stoppée avec 5 µl de 0,2 M d'EDTA. L'enzyme était inactivée après une incubation à 65°C pendant 20 min.

II.2.4 CONSTRUCTIONS DE VECTEURS PLASMIDIQUES

II.2.4.1 Construction de vecteurs plasmidiques exprimant la TM

L'expression cellulaire de la TM était obtenue en utilisant un vecteur plasmidique d'expression mammifère pEF-BOS-FLAG, qui contenait le promoteur EF-1α en amont d'une région codant le signal séquence de l'interleukine-3 et de l'épitope FLAG, suivi d'un site de restriction *MluI* pour l'intégration dans le cadre de lecture de l'ADNc d'intérêt (Kawakatsu et al. 2005). Les ADNc des TM humaine et porcine (1.7 kpb) ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces hTMLec-F/hTMCyt-R et pTMLec-F/pTMCyt-R respectivement et liés dans un premier vecteur à clonage pCR-Blunt (Invitrogen). Les fragments de 1.7 kpb libérés par digestion partielle des plasmides par *MluI* (pour éviter la digestion d'un site *MluI* interne de la TM) étaient ensuite clonés dans pEF-BOS-FLAG. L'intégrité de tous les vecteurs avec leur insert était confirmée par séquençage.

II.2.5 CONSTRUCTION DE VARIANTS DE LA TM AVEC DES DOMAINES EGF PERMUTES

La permutation des domaines EGF entre la TM humaine et porcine a été réalisée par une méthode de chevauchement de 3 fragments à PCR. Par exemple, la séquence codant pour la TM porcine contenant le domaine EGF4 humain (pTM-hEGF4) a été construite selon la manière suivante (Figure 15). En premier, amplification isolée des 3 fragments en utilisant des amorces présentant une séquence commune identique d'un vingtaine d'acides nucléiques pour permettre un chevauchement lors de la PCR de la deuxième étape: PCR-1) du domaine de la lectine jusqu'au domaine EGF3 de la TM porcine, PCR- 2) EGF4 de la TM humaine PCR-3) du domaine EGF5 jusqu'à la queue cytoplasmique de la TM porcine. La seconde étape consistait utiliser un mixte de ces 3 fragments à PCR comme substrat pour amplifier l'ADNc de la pTM-hEGF4 avec les amorces externes pTMLec-F/pTMCyt-R. Très fréquemment cette étape nécessitait une amplification intermédiaire en amplifiant d'abord les fragments 1 et 2 puis le fragment 1+2 avec le fragment 3. Lors de la 3^{ème} étape, le produit de PCR final de 1.7 kpb était cloné dans pCR-Blunt puis pEF-BOS-FLAG selon la technique décrite précédemment. La même procédure était suivie avec les amorces et substrats adéquates pour générer les autres variants avec des domaines EGF permutés (Tableau 6 et Tableau 7).

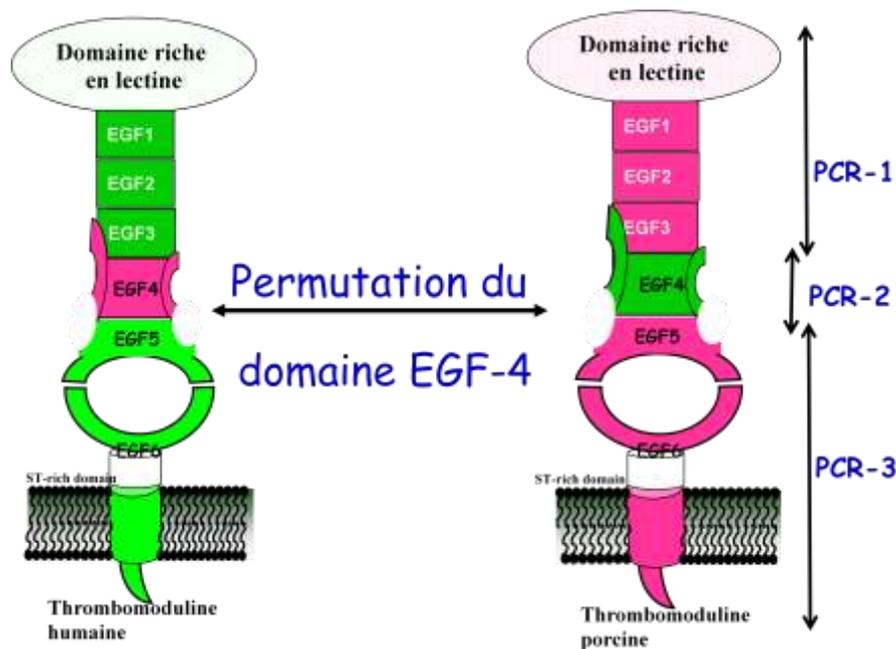


Figure 15 : schématisation de la permutation du domaine EGF4 entre la TM humaine et la TM porcine. Pour la construction de chaque variant, 3 PCR initiales étaient réalisées (PCR-1, PCR-2, PCR-3) séparément soit à partir de l'ADNc de TM humaine ou à partir de l'ADNc de TM porcine.

II.2.6 ENZYMES DE RESTRICTION

Les enzymes de restriction provenaient de Promega, New England Biolabs et Invitrogen. Une digestion par enzyme de restriction était classiquement réalisée en utilisant 1 µg d'ADN, 1 µl de tampon 10x, 1 U d'enzyme de restriction dans un volume final de 20 µl. Les mixtes étaient incubés à la température recommandée par la compagnie, c'est-à-dire de 30 min à 2 heures. La digestion était considérée comme complète seulement après vérification par gel d'électrophorèse.

II.2.7 IMMUNOHISTOCHEMIE

II.2.7.1 Préparation des tissus

Les tissus étaient fixés dans du Tissue-tek® (Sakura, USA) puis plongés dans du méthylbutane préalablement refroidi dans l'azote liquide. La fixation était réalisée très rapidement après le prélèvement. Les échantillons étaient conservés au congélateur à -70°C. Des coupes d'une épaisseur de 6 µm furent réalisées sur un cryomicrotome (Leica®) et recueillies sur des lames en verre. Après séchage à l'air pendant une nuit, un bain d'acétone (10min) permettait la fixation des lames qui pouvaient alors être utilisées ou conservées à -20°C.

II.2.7.2 Protocole de marquage par immunohistochimie

Les différentes étapes du marquage immunologique étaient séparées d'un triple lavage au PBS et comportaient :

- Réhydratation pendant 5 min avec du phosphate buffer salin (PBS)
- Blocage des peroxydases endogènes avec de l'eau oxygénée H₂O₂ diluée au 1/6 dans du méthanol. Cependant cette étape nous est apparue agressive pour la qualité du marquage et par suite n'a pas été poursuivie.
- Saturation des sites non spécifiques par du sérum de porc dilué à 2% dans du PBS-BSA (bovine serum albumine) 1% pendant 30 min.
- Blocage des biotines endogènes par le kit Dako®
- Incubation du premier anticorps dilué dans du PBS-BSA 1% pendant 1 heure
- Incubation d'un second anticorps biotinilé (anti-souris) pendant 30 min et dilué dans du PBS-BSA 1% au 1/500 le plus souvent
- Incubation de la streptavidine couplée à la peroxydase (STPO) diluée au 1/500 dans du PBS-BSA 1% pendant 30 min
- Révélation des anticorps fixés par le substrat VIP (Very Important Purple) (Vector®, USA) pendant 5 min.
- La réaction était stoppée en plongeant les lames 2 à 3 min dans de l'eau distillée.
- Contre- coloration des structures cellulaires par de l'hématoxyline (1 min) puis après rinçage par du carbonate de lithium (10 sec).
- Une lamelle glycérolée était enfin déposée sur la lame, prête alors à être lue au microscope.

II.2.7.3 Immunofluorescence

Afin de rechercher les dépôts d'anticorps, un marquage par immunofluorescence était réalisé. Des anticorps anti-IgM, anti-IgG, anti-C3 et anti-C4 humains fluorescents ont été utilisés. Le protocole appliqué était le suivant :

- Fixation par un bain d'acétone pendant 5 min
- Saturation des sites non spécifiques par du sérum de porc dilué à 2% dans du PBS-BSA pendant 30 min
- Incubation de l'anticorps fluorescent pendant 1 heure
- Protection par une lamelle

II.2.7.4 Coloration à l'Hématoxyline et Eosine

Les lames étaient plongées dans de l'hématoxyline pendant 1 min, lavées à l'eau du robinet puis replongées dans de l'alcool puis relavées à l'eau. Les lames étaient placées dans de l'eau de Scott's pendant 20 secondes, lavées puis replongées dans de l'alcool à 70% pendant 30 secondes puis plongées dans un mélange d'éosine, d'alcool absolue et d'histol. Une lamelle était appliquée sur la lame par un automate coverslipper (Tissue Tek).

II.2.7.5 Immunomarquage de l'apoptose (effet TUNEL)

La détection des cellules apoptotiques était réalisée grâce au kit Apoptag® (Intergen, Oxford, RU) après fixation des coupes 10 min dans du paraformaldéhyde (PFA) 1% et saturation des peroxydases endogènes. Les réactifs de ce kit avaient pour objet de marquer les extrémités 3'OH laissées libres par le clivage internucléosomal de l'ADN, qui se produit lors de l'apoptose. Des nucléotides couplés à la digoxigénine étaient ajoutés à l'extrémité 3'OH grâce à l'activité de la terminale déoxynucléotidyl transférase (TdT). Les oligomères ainsi marqués étaient reconnus par un anticorps anti-digoxigénine conjugué à une peroxydase, puis révélés à l'aide du diaminobenzidine (DAB).

II.2.8 CULTURES CELLULAIRES

Les lignées cellulaires utilisées au cours de ces expériences étaient disponibles dans le département d'immunologie de St Vincent (Melbourne) et stockées dans du nitrogène liquide. Les cellules étaient maintenues dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suppléé avec 10% de sérum de veau fœtal et 7,5 ml d'Hepes à 1M. Les cellules étaient maintenues en culture dans des flasques de 75 cm³ ou des boîtes de 10 cm de diamètre dans une atmosphère enrichie en oxygène (95%) et en CO₂ (5%) à 37°C dans un incubateur humidifié. Une fois confluente, les cellules étaient recueillies après trypsinisation et lavées avec du PBS stérile avant d'être ensemencées dans une nouvelle flasque.

II.2.8.1 Transfection temporaire

II.2.8.1.1 Transfection avec la Lipofectamine

Une première solution était préparée avec 800 µl d'OPTI-MEN, 1 µg d'ADN et 3 µl de Plus Reagent. Dans un second flacon, 800 µl d'OPTI-MEN était ajouté à 4,5 µl de lipofectamine. Après 15 minutes d'incubation, les 2 solutions étaient mélangées à un ratio de volume 1 :1 et incubées pendant 15 minutes supplémentaires. Des cellules COS-7 en culture dans des boîtes à 6 puits étaient lavées au PBS. Un ml de la solution combinée était ajouté à chaque puits. Après une incubation de 3 heures à 37°C, les cellules étaient lavées au PBS et

cultivées pendant 48h. Après ce temps de culture, les cellules étaient trypsinisées puis préparées pour analyse en cytométrie de flux ou pour des tests fonctionnels.

II.2.8.1.2 Transfection par Electroporation

Après culture, les cellules COS-7 étaient trypsinisées, lavées dans du PBS puis resuspendues dans 300 µl de PBS auquel on ajoutait 10 µg d'ADN. Les cellules subissaient une électroporation à 0,2 volt et étaient ensemencées dans des boîtes à culture de 10 cm² et incubées pendant 24 à 28 heures selon confluence cellulaire post-électroporation. Les cellules étaient ensuite analysées par FACS ou utilisées pour des tests fonctionnels.

II.2.8.2 Analyse par Cytométrie de Flux

L'analyse de l'expression cellulaire du gène après transfection par électroporation ou électroporation était réalisée par cytométrie de flux. Celle-ci était réalisée avec un appareil FACSCalibur cell sorter (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) et les résultats analysés en utilisant le logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

Après transfection, les cellules étaient trypsinisées, lavées puis incubées avec le premier anticorps approprié pendant 30 minutes sur de la glace. Si ce premier anticorps n'était pas fluorescent, une seconde incubation avec un anticorps secondaire marqué FITC était réalisée. La dilution des Ac et les lavages étaient réalisés avec du BSA à 1%. Après le second Ac, les cellules étaient resuspendues dans du BSA à 1% associé avec du propidium iodide (Sigma chemical CO. St Louis. MO) pour marquer les cellules mortes.

II.2.8.3 Immunoprécipitation

Les cellules adhérentes étaient lavées avec du PBS puis lysées avec du tampon de lyse et raclées manuellement au fond de la boîte. Le lysat était incubé avec 2-5 µg d'anticorps primaire à 4°C avec agitation douce pendant 2 heures. 40 µl de protéine A sépharose était ajouté et le mixte était incubé à 4°C pendant toute la nuit avec agitation douce. Le jour suivant, le lysat était lavé 6 fois avec du Tris-saline/1% Triton-X. Après le lavage final, le surnageant était enlevé et 30 µl de marqueur non réduit était ajouté. Le mixte était alors incubé à 100°C pendant 2-5 minutes avant d'être utilisé pour un western blot.

II.2.9 WESTERN BLOT

Tampons	Solutions
10 x SDS Running Buffer	0.25 M Trizma base, 1.92 M Glycine, 1% SDS
Western Transfer Buffer	0% (v/v) methanol, 192 mM glycine, 25 mM Trizma base
4 x non-reducing buffer	0.8 ml 10% SDS, 4.0 ml glycerol, 2.4 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8),
5% blotto	2.5 g of skim milk powder to 50 ml of TRIS-saline

Un gel SDS-PAGE était réalisé selon le système de Laemmli. Le poids moléculaire attendu de la protéine déterminait le pourcentage de gel acrylamide utilisé.

Gel %	7.5%	10%	12.5%
0.75 M TRIS Ph 8.8 (ml)	2.5	2.5	2.5
30% Acrylamide (ml)	1.25	1.67	2.08
Water (ml)	1.16	0.74	0.33
10% SDS (μ l)	50	50	50
10% APS (μ l)	25	25	25
TEMED (μ l)	10	10	10

Un gel de concentration à 4% (1.25 ml 0.25 M Tris pH 6.8, 0.33 ml 30% acrylamide, 0.873 ml d'eau, 25 μ l 10% SDS, 12.5 μ l 10% APS, 10 μ l TEMED) était ajouté au gel de séparation avant de mettre les échantillons à analyser. Après électrophorèse dans des conditions non-réduites, le lysat cellulaire, tissulaire ou l'immunoprécipitation étaient transférés à une membrane PVD (Hybond – P, Amersham Pharmacia Biotech). La membrane PVD était pré-humidifiée dans du méthanol à 100% et rincée à l'eau ou dans du tampon à transfert. Le transfert était réalisé en utilisant un appareil Bio-Rad Mini- Transblot. Les mousses ainsi que la membrane en nitrocellulose et le papier 3MM Whatman étaient saturés avec du tampon de transfert à Western. Le gel et la membrane étaient positionnés en sandwich entre le filtre en papier et les éponges dans l'appareil à transfert de telle sorte que le gel était du côté de l'électrode négative et la membrane de transfert du côté de l'électrode positive. Les protéines étaient transférées à 250 mA pendant 60 min. Le système était refroidi par un pack de glace et un stirrer afin de prévenir toute surchauffe. Après le transfert, l'appareil était démonté et la membrane placée dans une solution de saturation constituée de lait écrémé dissout dans du PBS x1 pendant 1 heure.

Après saturation de la membrane en nitrocellulose, l'Ac primaire était ajouté à une dilution de 1/2000 dans la solution de saturation et incubé à 4°C toute la nuit avec une agitation douce. Les Ac non fixés étaient lavés de la membrane par 5 lavages de 4 min au PBSx1/0,05 Tween -20 avant que le second Ac conjugué ne soit rajouté et incubé pendant 45 min à température ambiante et agitation.

La membrane était lavée comme précédemment avant que l'Ac fixé ne soit détecté. Le signal était développé en utilisant les solutions A et B (Pierce SuperSubstrate) qui étaient mélangées à un ratio 1 :1 et

utilisées pour recouvrir la membrane de nitrocellulose pendant 3 min à température ambiante. La membrane était ensuite séchée avant d'être exposée à un film autoradiographique.

II.3 TRANSGENESE:

II.3.1 PREPARATION DES VECTEURS

II.3.1.1 Micro-injection Nucléaire

Le construct était séparé du vecteur et purifié par un kit (QIAquick) d'extraction pour gel [QUIAGEN, Australie]. L'ADN purifié était resuspendu dans de l'eau stérile à une concentration finale de 10 ng/μl. Avant micro-injection, les échantillons étaient centrifugés à 15 000 tours et aliquotés dans des tubes Eppendorf. Les micro-injections étaient réalisées par Mme Helen Barlow du centre de recherche en Immunologie.

II.4 DEPISTAGE DES SOURIS TRANSGENIQUES :

II.4.1 PREPARATION DE L'ADN GENOMIQUE

L'ADN génomique était extrait d'un prélèvement de la queue des souris après sevrage maternel en utilisant le kit QIAamp DNA Mini Kit [QUIAGEN, Clifton Hill, Victoria, Australia]. Pour l'analyse par Southern Blot, l'ADN était précipité dans de l'éthanol et dilué dans 35 μl d'eau.

II.4.2 ANALYSE PAR CYTOMETRIE DE FLUX A PARTIR DE CELLULES SANGUINES PERIPHERIQUES

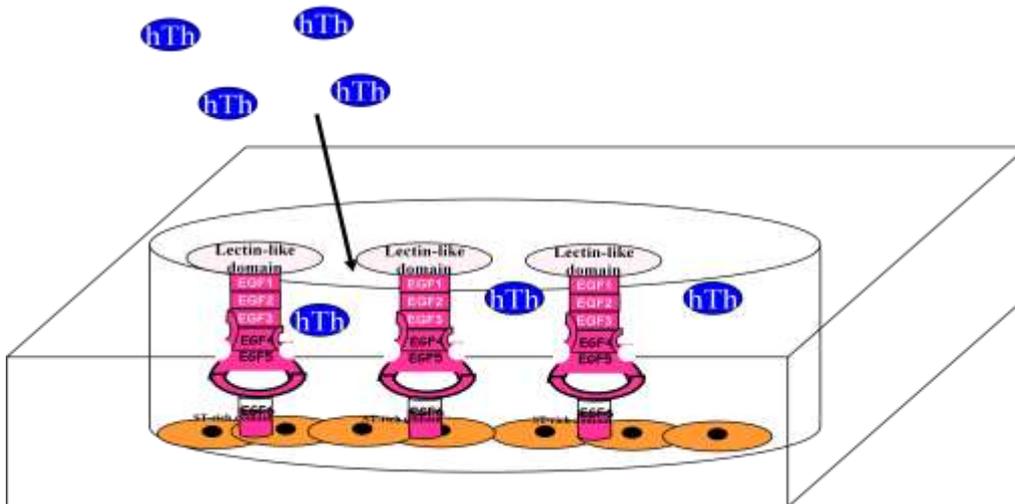
50 à 100μl de sang périphérique était prélevé au niveau du sinus orbital des souris. Les globules rouges étaient lysés dans du chlorure d'ammonium à 0,9% et chauffé à 42°C pendant 10 min. Les leucocytes étaient collectés par centrifugation à 1500 tours/min à 4°C, lavées avec du PBS- BSA à 2% et incubés avec un Ac anti CD201 humain (PE conjugué) à la dilution de 1/250 pendant 30 min. Les cellules marquées étaient analysées en cytométrie de flux.

II.5 ETUDES FONCTIONNELLES :

II.5.1 ETUDE DE LA LIAISON THROMBINE – THROMBOMDULINE

II.5.1.1 Etude par Spectrophotométrie (Spectrozyme TH)

Afin d'évaluer la liaison de la thrombine à la TM, 150µl de thrombine humaine (Merck, Kilsyth, Australia) ou de thrombine porcine (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN) à la concentration de 1U/ml dans un tampon d'HBSS modifié, était incubé 10 min à 37°C avec des cellules COS-7 exprimant la TM porcine ou humaine après transfection et culture dans des plaques à 12 puits. Le supernageant était ensuite récupéré puis transféré dans une plaque à 96 puits (Figure 16). Cent cinquante µl de 1mM de Spectrozyme TH (American Diagnostica, Stamford, CT) était ajouté dans chaque puits et le niveau d'absorbance à 405 nm était mesuré à 37°C par un lecteur à spectrophotométrie (FLUOStar Galaxy kinetic palte reader, BMG Labtech, Offenburg, Allemagne). La concentration de la thrombine libre contenue dans le supernageant était calculée en utilisant une courbe standard allant de 0 à 2U/mL de thrombine. La diminution de la concentration en thrombine libre était considérée comme le reflet de la liaison de la thrombine à la TM.



(Figure 16)

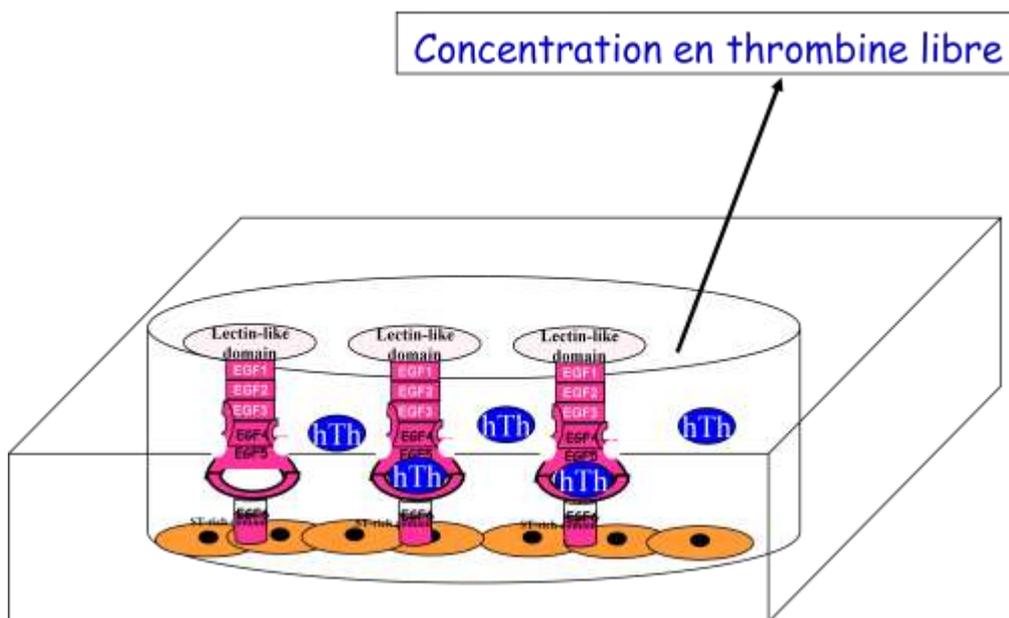


Figure 16 : schématisation de l'évaluation de la liaison de la thrombine à la TM en mesurant la concentration en thrombine libre résiduelle après incubation pendant 10min de thrombine avec des cellules COS-7 exprimant la TM (humaine ou porcine). La diminution en thrombine libre était considérée comme un reflet de la fixation de la thrombine sur la TM.

II.5.2 ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA THROMBOMODULINE

L'activité de la TM était évaluée indirectement en mesurant la quantité de protéine C activée produite lorsque de la protéine C était incubée avec de la thrombine et des cellules exprimant la TM.

II.5.2.1 Quantification de l'activation de la protéine C humaine

Vingt quatre heures après transfection, des cellules COS-7 exprimant la TM étaient mise en culture pendant 24 heures à 37°C dans des plaques à 96 puits (10^4 cellules/puits). De la thrombine humaine (Calbiochem#605190) et de la protéine C humaine (Merck) mélangées dans un tampon Tris- Imidazole étaient ensuite ajoutées à la concentration de 0.1U/mL et 150nM respectivement, dans un volume final de 100µl. Après incubation à 37°C pendant 30 min, la réaction était stoppée en ajoutant 4µl d'hirudine à la concentration de 2U/ml (Merck) et 100 µl de surnageant était transféré dans une plaque à 96 puits. Cent microlitres de Spectrozyme APC (American Diagnostica) à une concentration de 1mM était ensuite ajouté. Le niveau d'absorbance pouvait alors être mesuré à 405 nm en utilisant un lecteur spectrophotométrique (FLUOStar Galaxy kinetic plate reader). La concentration en PCa générée était calculée en utilisant une courbe standard de 0 à 60 nM de PCa (American Diagnostica). Toutes les mesures ont été réalisées en dupliquat et avec des doses croissantes en protéine C.

II.5.2.2 Quantification de l'activation de la protéine C porcine

Quarante huit heures après transfection, 5×10^5 cellules COS-7 exprimant la TM humaine ou porcine resuspendues dans 50 μ l de tampon HBSS modifié contenant 0.2 U/mL de thrombine porcine étaient laissées incubées à 37°C pendant 10 min placées dans des puits d'une plaque à 96 puits. Un volume égal de plasma porcin pauvre en plaquettes, dilué au 1/5 dans du tampon était ensuite ajouté et incubé à 37°C pendant 10 min supplémentaire. La réaction était stoppée et la concentration en PCa générée était déterminée comme décrit précédemment pour la PCa humaine.

II.5.2.3 Tampon au Tris-Imidazole

Le tampon Tris- Imidazole à pH 8.4 était formé à partir de deux solutés. Solution A: 3.03 g Tris, 1.7 g imidazole et 50 ml de NHCl dans un volume total de 100ml d'eau distillée. Solution B: 4.04 g Tris, 2.27g imidazole et 1.95 g de NaCl dans un volume total de 100 ml d'eau distillée. Les solutions A et B étaient mélangées et ajustées à un pH de 8.4 à 25°C. A cette solution finale était ajouté 23.4 g de NaCl pour obtenir une concentration à x10. Le stock de tampon était conservé à 4°C après filtration et un aliquot était dilué à 1/10 avant chaque utilisation.

II.5.3 DETECTION DE L'ACTIVATION DE TAFI

Cinq microgrammes de TAFI purifié (Haematologic Technologies, Essex Junction, VT) étaient incubés avec 2×10^4 cellules COS-7 transfectées et exprimant la TM pendant 15 à 30 min à 37°C dans un tampon (5mM CaCl₂, 50 mM Hepes, 100 mM NaCl₂) contenant 2 U/ml de thrombine humaine. La réaction était stoppée en ajoutant un inhibiteur à thrombine, le D-Phe-Pro-Arg-Chloromethyl Ketone (PPACK, 1 μ M ; Haematologic Technologies). Un tampon non réducteur était ensuite ajouté et les échantillons étaient chauffés pendant 5 min à 100°C avant électrophorèse sur un gel Tris-Glycine à 4-20% (invitrogen) et visualisé selon la méthode de coloration rapide Coomassie.

II.5.4 TEMPS DE SAIGNEMENT

Les souris étaient anesthésiées avec de la kétamine et de la xylazine à la posologie de 0,1 ml/g. La queue des animaux était sectionnée à 5 mm de son extrémité et était placée au-dessus d'un bain de sérum physiologique à 37°C afin d'éviter tout phénomène vasoconstrictif lié au froid. Le temps de cessation du saignement était ensuite chronométré. A la fin du saignement, la queue était maintenue dans du sérum physiologique tiède pendant plus de 30 secondes pour s'assurer de l'arrêt complet du saignement et de l'absence de conséquence sur les fonctions vitales de l'animal (Dejana et al. 1979).

II.5.5 ETUDES DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

II.5.5.1 Agrégation plaquettaire sur plaquettes isolées

Tampons	Réactifs
ACD (acide-citrate-dextrose)	90mM de citrate de sodium, 7mM d'acide citrique (pH = 4,6), 140 mM dextrose, 70 mM de théophylline
Tampon de lavage	43 mM Na ₂ HPO ₄ , 24,3 mM NaH ₂ PO ₄ , 4,3 mM K ₂ HPO ₄ , 113 mM NaCl, 5,5 mM glucose
Tyrodes	137 mmol NaCl, 2mmol KCl, 12 mmol NaHCO ₃ , 1 mmol MgCl ₂ .6H ₂ O, 5,5mmol de glucose, 5 mmol Hepes à PH 7,3

Les souris étaient anesthésiées à l'hydrate de chlorure (0,1 ml/g) et par inhalation de penthrane. 600 µl de sang était obtenu par ponction de la veine cave inférieure par une seringue 25G contenant 100 µl de tampon ACD à 37°C. Le sang était centrifugé à 200 tours pendant 2 min à 37°C et le surnageant (plasma riche en plaquette) prélevé. 200 µl de tampon de lavage était ajouté et le mixte était centrifugé. Cette procédure était répétée une seconde fois. Le plasma riche en plaquette était centrifugé à 2000 tours pendant 2 min puis le surnageant était aspiré. Le culot plaquettaire était resuspendu dans 500 µl de tampon Tyrodes. Les plaquettes étaient ensuite « mises au repos » pendant 30 min à 37°C pour récupérer de cette procédure. Le nombre de plaquettes était déterminé et standardisé pour obtenir une concentration de plaquettes de 2 x 10⁵/µl de tampon Tyrodes. Les plaquettes étaient reconstituées avec du fibrinogène (400µg/ml) et du calcium (0,1 mM). L'agrégation plaquettaire était mesurée par un agrégomètre chromogénique (PACKS-4, Helena Laboratories, Beaumont, TX).

II.5.6 MODELE EXPERIMENTAL D'ISCHEMIE REPERFUSION RENALE

II.5.6.1 Protocole expérimental

Des souris males âgées de 10 à 14 semaines, anesthésiées avec de la kétamine (100mg/kg en intrapéritonéal) associée à de la xylazine (10mg/kg intrapéritonéal) étaient sujets à une incision abdominale médiane. Le pédicule rénal droit était lié et une néphrectomie droite était ensuite réalisée. Le pédicule rénale gauche était libéré pour être clampé par un micro-clamp vasculaire. Après 18 minutes d'ischémie, le clamp était enlevé. La cavité abdominale était ensuite refermée après vérification de la bonne reperfusion du rein droit et après irrigation de la cavité abdominale avec 1 ml de sérum physiologique stérile. La température corporelle était maintenue à 37°C jusqu'à récupération complète d'une activité normale des animaux.

II.5.6.2 Evaluation de la fonction rénale et histologie

Vingt quatre heures après la reperfusion, la fonction rénale était évaluée par la mesure de la créatininémie et de l'urémie. Les animaux étaient anesthésiés avec de la kétamine et xylazine injectées en intra-péritonéal et la cavité abdominale était exposée. Le prélèvement sanguin était réalisé à l'aiguille après ponction de la veine cave inférieure et envoyé au laboratoire d'analyse de l'hôpital St Vincent.

Le rein gauche était prélevé et conservé dans du formol à 10% et fixé dans de la paraffine. Des sections de 4 μ étaient coupées au microtome et fixées sur lames pour étude histologique. Les lames étaient colorées à l'hématoxyline – éosine selon le protocole usuel et un marquage TUNEL était également réalisé suivant les recommandations du fabricant.

II.5.6.3 Analyse et évaluation histologique des lésions rénales d'ischémie- reperfusion

▪ *Coloration à l'hématoxyline – éosine*

Les lésions rénales d'ischémie- reperfusion étaient quantifiées « en double aveugle » par deux anatomo-pathologistes indépendants en utilisant un score qui reflétait le pourcentage de dommages observés dans le cortex, la jonction cortico- médullaire et la médulla.

▪ *Marquage TUNEL*

L'apoptose tubulaire était quantifiée selon le même protocole en double aveugle par deux anatomo-pathologistes indépendants. Dix champs microscopiques à une amplification x200 étaient choisis de manière randomisée à la jonction cortico- médullaire et le nombre de nucléi apoptotiques était compté.

II.5.7 MODELE EXPERIMENTAL D'INDUCTION DE THROMBOSE EMBOLIQUE DE L'ARTERE PULMONAIRE

Des vieilles souris femelles âgées de 10 à 12 semaines étaient anesthésiées avec de la kétamine et du xylazine. La veine jugulaire était disséquée pour être exposée et pour permettre l'injection de collagène avec ou sans ADP (200 μ M) (Fabre et al. 1999). Juste après l'injection de collagène, les souris étaient réanimées pendant 2 minutes puis placées sur une plaque chauffante à 37°C pendant une heure pour monitorer la survie et laisser aux animaux le temps de récupérer. Le poumon des souris décédées était prélevé pour étude histologique et des souris transgéniques ont été euthanasiées 1 heure après injection pour étudier également l'histologie des poumons. Les biopsies étaient fixées dans du formol à 10% et inclus dans de la paraffine. Des sections de 4 μ m étaient réalisées au microtome et fixées sur lames pour une coloration

standard afin de détecter les embolies pulmonaires et quantifier le nombre de vaisseaux occlus au microscope à un grossissement de x20 et dans 8 champs quadrillés.

II.5.8 STATISTIQUE

Les variables continues étaient exprimées en moyenne \pm écart-type et les variables non continues en pourcentage. Pour les analyses univariées, les variables continues étaient analysées en utilisant un test de Mann-Whitney et les variables non continues par un test du Chi-2 ou test exact de Fisher. Un $p < 0.005$ était considéré comme significatif.

III. PROJET I: Etude *in vivo* du Rejet Vasculaire Aigu dans une combinaison porc sur primate.

III.1 PREFACE

Cette étude sur grands animaux a été possible grâce au travail et à l'engagement de plusieurs personnes dont surtout le Pr Gilles Blancho qui a conçu entièrement le Laboratoire des Grands Animaux (LGA) du CHU de Nantes dans les années 1995. Il est important de souligner que c'est actuellement la seule structure scientifique en France capable de travailler sur des primates non-humains. La combinaison porc-primate en xénotransplantation est considérée comme un modèle pré-clinique indispensable avant tout essai sur l'homme. Ce laboratoire est donc un atout majeur pour la recherche dans ce domaine précis de la médecine. Grâce également aux talents chirurgicaux du Pr Karam, plusieurs séries de xénotransplantations rénales ont pu être réalisées chez le babouin avec très peu de complications post- opératoires liées directement à la chirurgie. Les différentes séries de xénotransplantation ont ensuite bénéficié du travail d'analyse de Joana Ashton qui a travaillé dans l'unité INSERM dépendante du LGA.

III.2 XENOTRANSPLANTATION D'ORGANES PORCINS TRANSGENIQUES POUR LA MOLECULE HUMAINE CD55 CHEZ LE BABOUIN :

III.2.1 EFFETS DE L'IMMUNOADSORPTION D'ANTICORPS NON- SPECIFIQUES SUR LE DEVENIR DE XENOTRANSPLANTATION D'ORGANES PORCINS CHEZ LE PRIMATE

III.2.1.1 Informations Générales:

Jusque dans les années 1995-1998, le rejet hyperaigu apparaissait être l'obstacle qu'il fallait à tout prix vaincre pour espérer ensuite obtenir un cursus de transplantation quasi classique. Ainsi, toute action visant à contrôler l'activation du complément par les Ac naturels était considérée comme salvatrice. En 1997, plusieurs équipes démontraient qu'il était possible de contrôler le RHA en éliminant les Ac anti-Gal par immunoadsorptions (IA) spécifiques ou non spécifiques des ces Ac en pré et post-transplantation (Leventhal et al. 1995; Lin et al. 1997). Dans le même temps, l'obstacle du RHA était également franchi par l'emploi d'organes porcins transgéniques pour des molécules humaines régulatrices du complément (Byrne et al. 1997; Waterworth et al. 1997). Les équipes découvraient alors qu'un autre type de rejet, appelé rejet vasculaire aigu, survenait au décours des xénotreffes. La stratégie pour contrer ce RVA était en pleine évaluation et à l'époque la physiopathologie de ce rejet mettait en jeu des mécanismes a priori non lié aux anticorps et non liés au complément (Bach et al. 1996). Néanmoins, étant donné les résultats très encourageant publiés avec l'emploi d'immunoadsorption ou l'emploi d'organes porcins transgéniques, notre programme s'appuya sur l'association de ces deux stratégies pour prévenir le RVA. Les porcs transgéniques ont été obtenus grâce à une collaboration avec Imutran et notre laboratoire possédait déjà une colonne

d'immunoabsorption non-spécifique. Le premier groupe (groupe A) a reçu des porcs non-transgéniques avec une IA pré et post- transplantation associée à une immunosuppression. Pour le second groupe (groupe B), la xéno greffe a été réalisée avec des organes transgéniques pour la molécule humaine CD55 mais avec le même protocole immunosuppresseur (IA et immunosuppression). Le niveau d'immunosuppression était calqué sur les travaux réalisés par Imuntran à partir de macaques. L'IA était réalisée la veille de l'intervention puis au 5^{ème} jour post-transplantation, date à laquelle notre laboratoire avait remarqué une réascension des Ac.

Comme l'emploi d'organes transgéniques associée à une IA ne s'est pas traduit par un gain de survie et que l'histologie des biopsies était en faveur d'un RVA, nous avons pensé que soit l'IA pouvait avoir un effet délétère (effet rebond ou déplétion d'Ac facilitant ?) ou que le niveau d'immunosuppression n'était pas assez élevé. Afin d'explorer ces deux hypothèses, notre étude s'est prolongée par la réalisation de deux autres groupes d'animaux (groupes C et D) avec une immunosuppression plus forte mais avec des IA seulement pour le groupe D.

III.2.1.2 Article I: "The effect of immunoglobulin immunoabsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons" *Xenotransplantation* 2003;10:552-561

The effect of immunoglobulin immunoadsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons

Ashton-Chess J, Roussel J-C, Bernard P, Barreau N, Karam G, Dantal J, Moreau A, Letessier E, Nagasaka T, Cozzi E, Minault D, Soullillou J-P, Blancho G. The effect of immunoglobulin immunoadsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons.

Xenotransplantation 2003; 10: 552–561. © Blackwell Munksgaard, 2003

Abstract: Delayed xenograft rejection (DXR) remains a major obstacle in discordant xenotransplantation. As strategies of complement inhibition and xenogeneic natural antibody (Ab) removal have been shown to give prolonged xenograft survival, we endeavored to determine whether combining these two strategies would lead to an additive effect in terms of graft survival. The study was initiated with two groups, A and B, where group A received normal kidneys and group B received hCD55 transgenic kidneys. Both groups underwent pre-transplant (day – 1) total immunoglobulin (Ig) immunoadsorption (IA) and received an immunosuppression of cyclophosphamide, cyclosporine A, mycophenolate mofetil and corticosteroids. Two subsequent groups (C and D) receiving hCD55 transgenic pig kidneys were then performed with an 'optimized' immunosuppression (Cyclophosphamide starting 1 day earlier) but only group D recipients were immunoadsorbed. Biopsies taken during the post-transplantation period were analyzed for Ab deposition, complement activation and cellular infiltration. No hyperacute rejection was observed. In the initial immunoadsorbed groups A and B, all baboons underwent DXR, which started surprisingly early (day 5 in most cases). In the subsequent two groups, the immunoadsorbed group D baboons also underwent DXR, again as early as day 5. In contrast, group C baboons did not show any signs of DXR on their day 6 biopsy or at their time of death. Analysis of graft biopsies from the kidneys undergoing rejection or with stable function showed strong deposition of anti-Gal IgM in all cases whereas strong complement C5b-9 deposits were only observed in biopsies at rejection. Cellular infiltration consisted mostly of monocytes/macrophages, was more pronounced in biopsies taken at rejection and was associated with a pro-inflammatory environment involving interleukins 1 α , 6 and 8. Our findings suggest that non-specific Ig (anti-Gal and non-Gal Ig of all isotypes) IA or even incomplete IA in immunosuppressed baboon recipients of transgenic pig kidneys is detrimental to graft survival by being associated with an Ab and complement driven rejection. We speculate that the IA were insufficient in terms of Ig depletion or frequency inducing an Ab rebound or that this total Ig depletion also removed components facilitating graft survival.

**Joanna Ashton-Chess,¹
Jean-Christian Roussel,¹
Pierre Bernard,¹ Nathalie
Barreau,¹ Georges Karam,²
Jacques Dantal,^{1,3} Anne Moreau,⁴
Eric Letessier,⁵ Takaharu
Nagasaka,¹ Emanuele Cozzi,⁶
David Minault,¹ Jean-Paul
Soullillou^{1,3} and Gilles Blancho^{1,3}**

¹INSERM U437: Immunointervention en allo et xénotransplantation, ²Service d'Urologie, Hôtel Dieu, ³Service de Néphrologie/Immunologie clinique/Transplantation, Hôtel Dieu, ⁴Laboratoire d'anatomopathologie, ⁵Clinique Chirurgicale A, Hôtel Dieu, ⁶Imutran Ltd., (A Novartis Pharma AG Company, Cambridge, UK)

Key words: complement – immunoadsorption – pig – primate – transgenic – xenotransplantation

Abbreviations: Ab: antibody; ABTS: 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals; CS: corticosteroids; CsA: cyclosporin A; CyP: cyclophosphamide; DAF: decay acceleration factor; DIC: disseminated intravascular coagulation; DXR: delayed xenograft rejection; EPO: erythropoietin; FITC: fluorescein isothiocyanate; HAR: hyperacute rejection; hCD55: human CD55; HPRT: hypoxanthine phosphoribosyl transferase; IL: interleukin; IA: immunoadsorption; Ig: immunoglobulin; IV: intravenous; MMF: mycophenolate mofetil; MST: mean survival time; OD: optical density; PBS: phosphate-buffered saline; PO: per os; RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction; XNA: xenogeneic natural antibodies.

Address reprint requests to Gilles Blancho, ITERT/INSERM U437, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes cedex, France (E-mail: gblancho@chu-nantes.fr)

Received 27 December, 2001;
Accepted 25 June, 2002

Introduction

Interest in xenotransplantation has considerably increased over the last decade, because this latter strategy represents a potential solution for the present overall organ shortage, which limits allotransplantation. The first obstacle to the success of xenotransplantation is the existence, in humans and primates (old World primates), of preformed antibodies (Ab), also called xenonatural Ab (XNA). Most of these Ab are directed against a specific epitope, Gal α 1-3 Gal [1, 2], present in other species including the pig. Specific binding of preformed Ab, in particular the immunoglobulin (Ig) M isotype, to their target leads to complement activation with characteristic membrane attack complex (C5b-9) deposition, followed by endothelial activation and damage, hemorrhage, and thrombosis [3]. This reaction is so rapid (minutes to hours) that it is called hyperacute rejection (HAR). Strategies to avoid HAR consist of Ab depletion, inhibition of complement [4], or the use of genetically modified donor pigs expressing human complement inhibitory molecules such as CD55 decay accelerating factor (DAF) [5], able to inhibit the activation of human complement (see [6] for review).

Once HAR is prevented, a second onset of rejection, called acute vascular rejection or delayed xenograft rejection (DXR) occurs in a time range of days to weeks. DXR has been extensively studied in concordant rodent models and is considered as a different phenomenon to HAR, being mainly characterized by so called "type II" endothelial activation, edema, hemorrhage, thrombosis and cellular extravasation [7]. In discordant combinations, the mechanisms involved in DXR seem to be different because the binding of anti-donor Ab to the endothelium is considered to play an important role in the initiation of the reaction, as suggested by the efficacy of strategies of Ab depletion, in preventing DXR development [8, 9]. As complement inhibition [10–13] and immunoadsorption (IA) [8, 14], when used separately, have given rise to prolonged xenograft survival, our aim was initially to determine whether combining these two strategies would have an additive effect on graft survival. Pertaining to this hypothesis, we additionally set out to define the mechanisms involved in any subsequent rejection occurring in the context of Ab depletion and complement inhibition, including any cellular involvement, which may occur under these conditions.

Materials and methods

Animals and treatments

A series of renal xenotransplantations was performed in baboons using as donors either normal pigs (EARL du Pont Romain, Surzur, France) or hCD55 transgenic pigs (heterozygous for hCD55 with a high level of expression in the endothelium, arterial smooth muscle and connective tissue of ear skin biopsies, provided by Imutran Ltd, Cambridge, UK [5]). The recipients were allocated to groups receiving different treatment protocols (see below for details).

Animals were prepared 3 weeks before transplantation with an auto-transfusion protocol with erythropoietin (EPO, Eprex® at 400 U/week subcutaneously). Prior to transplantation, baboons were fitted with an internal jugular catheter for future perfusions and IV treatments. Kidney transplantation consisted of a heterotopic graft followed by a bilateral nephrectomy as described in detail [15]. Monitoring of clinical aspect, blood biochemistry, urea and creatinine, hematology tests, clotting parameters, cyclosporin A (CsA) levels and anti-Gal Ab levels was carried out daily. Kidney biopsies were taken on day 5 or 6 and also in the case of acute renal failure and prior to killing. Biopsies were either fixed in 10% formalin (for histologic analysis) or snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (for RNA extraction) or surrounded in Tissue Tek (Miles, Elkhart, IN, USA) before being snap frozen as above (for immunohistochemical analysis). No post-mortem biopsies were used for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical analysis. Autopsies were systematically performed.

The study was initiated with two groups; group A ($n = 7$) received non-transgenic pig kidneys and group B ($n = 4$) received pig kidneys transgenic for hCD55. Both groups underwent total Ig IA on Therasorb immunoaffinity columns (Excorim, Gambro Instrumenta AB, Lund, Sweden) the day before transplantation and a second IA was scheduled for day 5 provided the animal was considered, on clinical grounds, as being able to tolerate the procedure. Both groups also underwent the following immunosuppression: cyclophosphamide (CyP) IV at a dose of 40 mg/kg at day 0, 10 mg/kg at day 2, and 10 mg/kg at day 4; CsA IV at a starting dose of 3 mg/kg/day to reach a blood trough level of around 1000 ng/ml; mycophenolate mofetil (MMF) PO at a dose of 70 mg/kg/day (as described previously [10]) and corticosteroids (CS)

IV at a starting dose of 1 mg/kg/day followed by a progressive decrease of 0.05 mg/kg/day to reach a plateau of 0.2 mg/kg/day at day 18.

Based on the outcome of groups A and B, two further groups of xenotransplants were performed (groups C and D). In groups C and D, all animals received hCD55 transgenic kidneys and underwent an 'optimized' immunosuppressive protocol where the CyP was initiated 1 day earlier (day - 1) and given four times as described by others [16]. Group C animals were *not* immunoadsorbed, however, group D underwent IA on day - 1 only. A summary of the four groups and their respective treatments can be found in Table 1.

Rejection was suspected in the case of acute renal failure defined by a serum creatinine increase of 20% above baseline levels or in the case of oligo/anuria, after ruling out obstructive or functional causes, and was confirmed by a surgical biopsy.

Measurement of serum total Ig before and after IA

The IgG, IgA and IgM levels were measured via immuno-nephelometry with a BN II Dade Behring machine (Marburg, Germany) with reagents (standard, controls and anti-sera) provided by the manufacturer. Measurements were made immediately before and after IA.

Measurement of anti-Gal Ab

Anti-Gal Ab in baboon sera were measured semiquantitatively via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described in

detail [17]. Briefly, serially diluted sera samples including a human positive control (a serum sample provided by the local blood bank, previously tested and found to have high levels of anti-Gal Ab) were incubated in polyacrylamide-linked Gal α 1-3 Gal (Bdi-Bio-PAA; Syntesome, Munich, Germany)-coated 96 well plates (Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark). Gal α 1-3 Gal bound IgG and IgM Ab present in the sera were then revealed via incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (γ specific; Sigma, Saint Quentin, Fallavier, France) and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgM (μ specific; Dako, Glostrup, Denmark), respectively, and revealed with peroxidase substrate ABTS (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Optical densities (OD) were read at 405 nm and the results were expressed as arbitrary units with 100 arbitrary units defined as 50% of the maximum OD of the positive control.

Histology

Renal biopsies fixed in 10% formalin were embedded in paraffin. Four-micrometer thick sections were then cut, stained with hematoxylin and eosin and analyzed via light microscopy.

Immunohistochemical analysis

Five-micrometer tissue sections were prepared from frozen, Tissue Tek (Miles, IN, USA) embedded biopsies taken from each group as well as naive, normal and hCD55 transgenic pig kidneys. For

Table 1. Summary of treatment protocols

	Day 1	Day 0	Day 2	Day 4	Day 5	Day 6
Group A	IA ^a	CyP 40 mg/kg CsA 3 mg/kg/day IV MMF 70 mg/kg/day PO CS 1 mg/kg/day IV then decreased by 0.05 mg/kg/day	10 mg/kg	10 mg/kg	IA ^a /Biopsy	
Group B (hCD55)	IA ^a	CyP 40 mg/kg CsA 3 mg/kg/day IV MMF 70 mg/kg/day PO CS 1 mg/kg/day IV then decreased by 0.05 mg/kg/day	10 mg/kg	10 mg/kg	IA ^a /Biopsy	
Group C (hCD55)	CyP 40 mg/kg	20 mg/kg CsA 3 mg/kg/day IV MMF 70 mg/kg/day PO CS 1 mg/kg/day IV then decreased by 0.05 mg/kg/day	20 mg/kg	10 mg/kg		Biopsy
Group D (hCD55)	IA ^a CyP 40 mg/kg	20 mg/kg CsA 3 mg/kg/day IV MMF 70 mg/kg/day PO CS 1 mg/kg/day IV then decreased by 0.05 mg/kg/day	20 mg/kg	10 mg/kg	Biopsy	

^aFor actual immunoadsorptions please refer to Table 2.

fluorescent Ab, sections were acetone fixed and stained with the baboon cross-reacting fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Ab; rabbit anti-human IgG and IgM, and monoclonal mouse anti-human C5b-9 (DAKO). For the remaining Ab, sections were fixed in acetone, blocked with H₂O₂, saturated with pig serum, and endogenous biotin was blocked using the DAKO Biotin Blocking System® (DAKO). Sections were then incubated with the baboon cross-reacting primary Ab; CD68 (DAKO), CD11b (Immunotech, Marseille, France), CD4 (Immunotech) and CD8 (Pharmingen, Heidelberg, Germany), rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), incubated with biotin-conjugated F(ab')₂ goat anti-murine primary Ab (Immunotech), rinsed with PBS and incubated with avidin conjugated horseradish peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) then Peroxidase Substrate Kit Vector® VIP (Very Important Purple, Vector Laboratories Inc.). Sections were then counterstained with hematoxylin and lithium carbonate.

Real time quantitative RT-PCR

Real time quantitative RT-PCR was performed on biopsies taken at day 6 (group C) or at rejection (group D) as described in detail [18]. Briefly, RNA prepared via the guanidium isothiocyanate procedure and purified on a caesium chloride gradient according to Chirgwin [19] was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA). Standards were constructed via PCR amplification of the target sequence from concavalin A-activated peripheral blood mononuclear cells, using the forward and reverse primers given below. Ten microliters of

serially diluted standard and 1/10 diluted (in purified water) cDNA from sample biopsies were amplified in duplicate in Sybr Green® PCR core reagents (Perkin Elmer Biosystems, Warrington, UK) in an ABI Prism 7700-Perkin Elmer Sequence Detection System. Levels of target sequence in samples were calculated according to the standard curve, normalized against the levels of the house-keeping gene hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) and expressed as a ratio of target/total HPRT. Species specificity of primers was predetermined via sequence homology analysis using 'BLAST' on the National Center of Biotechnology Information (NCBI) internet database (www.ncbi.nlm.nih.gov) for pig and human sequences and also via PCR analysis of pig and baboon tissue. Primers amplified baboon cDNA with the exception of the HPRT primers, which amplified baboon and porcine HPRT. Primer sequences were as follows (5'-3'): baboon/porcine HPRT: 5': ATTGACACTGGCAAAACAATGC; 3': TCCAACACTTCGTGGGGTCC; baboon interleukin (IL) 1α: 5': GGAGATGCCTGAGATACCCAA; 3': TGAGACTCCAGACCTACGCCT; baboon IL6: 5': CACAGACAGCCACTC-ACCTCTT; 3': GCAAGTCTCCTCATTGAATC-CA; baboon IL8: 5': GCCAAGGAGTGCTAAA-GAACT; 3': AGCTCTCTTCCATCAGAAAGC.

Results

Graft and animal survival and incidence of DXR

Animals from all four groups developed a severe leukopenia of < 1000 cells/mm³ from day 5, which

Table 2. Animal survival and xenograft outcome

Group	Kidney type	Animal	IA	Immuno- suppression	Biopsy: Day	Diagnosis	Survival (days)	Cause of death
A	Normal	AP923	Day - 1	Less intensive ^a	5	DXR	6	DXR
A	Normal	AP922	Day - 1	Idem	5	DXR	5	DXR
A	Normal	V951	Day - 1	Idem	5	DXR	6	DXR
A	Normal	V952	Day - 1, 5	Idem	5	DXR	8	DXR
A	Normal	V942	Day - 1	Idem	4	DXR	4	DXR
A	Normal	V965	Day - 1	Idem	5	DXR	5	DXR
A	Normal	V968	Day - 1	Idem	5	DXR	5	DXR
B	hCD55	V9413	Day - 1	Idem	5	DXR	5	DXR
B	hCD55	V9518	Day - 1, 5	Idem	6	DXR	9	DXR
B	hCD55	V9517	Day - 1, 5	Idem	5	DXR	5	DXR
B	hCD55	V9519	Day - 1, 5	Idem	5	DXR	5	DXR
C	hCD55	V9516	None	More intensive ^b	6	Subnormal	12	Septicemia
C	hCD55	PA965	None	Idem	6	Subnormal	7	Unknown
C	hCD55	PA962	None	Idem	6	Subnormal	8	Septicemia
C	hCD55	V9622	None	Idem	6	Subnormal	10	DIC
D	hCD55	V9625	Day - 1	Idem	5	DXR	6	DXR
D	hCD55	V9626	Day - 1	Idem	5	DXR	5	DXR
D	hCD55	PA972	Day - 1	Idem	5	DXR	7	DXR
D	hCD55	PA973	Day - 1	Idem	5	DXR	10	DXR

^aLess intensive: CyP days 0, 2 and 4; CsA/MMF/CS.

^bMore intensive: CyP days -1, 0, 2 and 4; CsA/MMF/CS.

lasted around 3 days. Moreover, despite EPO treatment, all animals developed a progressive anemia.

Graft survival in the four groups A, B, C and D is summarized in Table 2. No HAR was observed in any baboon; however, all baboons in the immunoadsorbed groups (A and B; only one animal in group A and three animals in group B were able to undergo a second IA on day 5) underwent DXR according to histologic analysis (see below), the mean survival time (MST) being $5.6 (\pm 1)$ and $6 (\pm 2)$ days, respectively. Furthermore, all baboons showed signs of rejection on the day 5 biopsy. Due to the poor outcome of these two groups of transplants, two further groups of transplants were carried out with an optimized immunosuppression (see above) without IA (group C) or with IA (group D). The MST did not differ significantly between these two groups (MST group C: 9.3 ± 2 days vs. 7 ± 2 days in group D) or from the two previous groups A and B. However, all group D baboons underwent DXR

as assessed by the day 5 biopsy, whereas in group C two baboons died as a result of septicemia (V9516 and PA962), one of an unknown cause (PA965) and one (V9622) of a disseminated intravascular coagulation (DIC). None of these group C baboons showed any histologic signs of rejection on the day 6 biopsy or at the time of death although rejection could not be ruled out in the baboon that died from a DIC (see below for details).

Graft histology

Graft histology is shown in Fig. 1 with one representative photo for each group. Group A, B and D animals showed histopathologic changes compatible with DXR. Biopsies always displayed focal or widespread hemorrhage associated with areas of cortical necrosis, without obvious lesions in large vessels. However, the microvasculature showed severe injury with non-specific ischemic

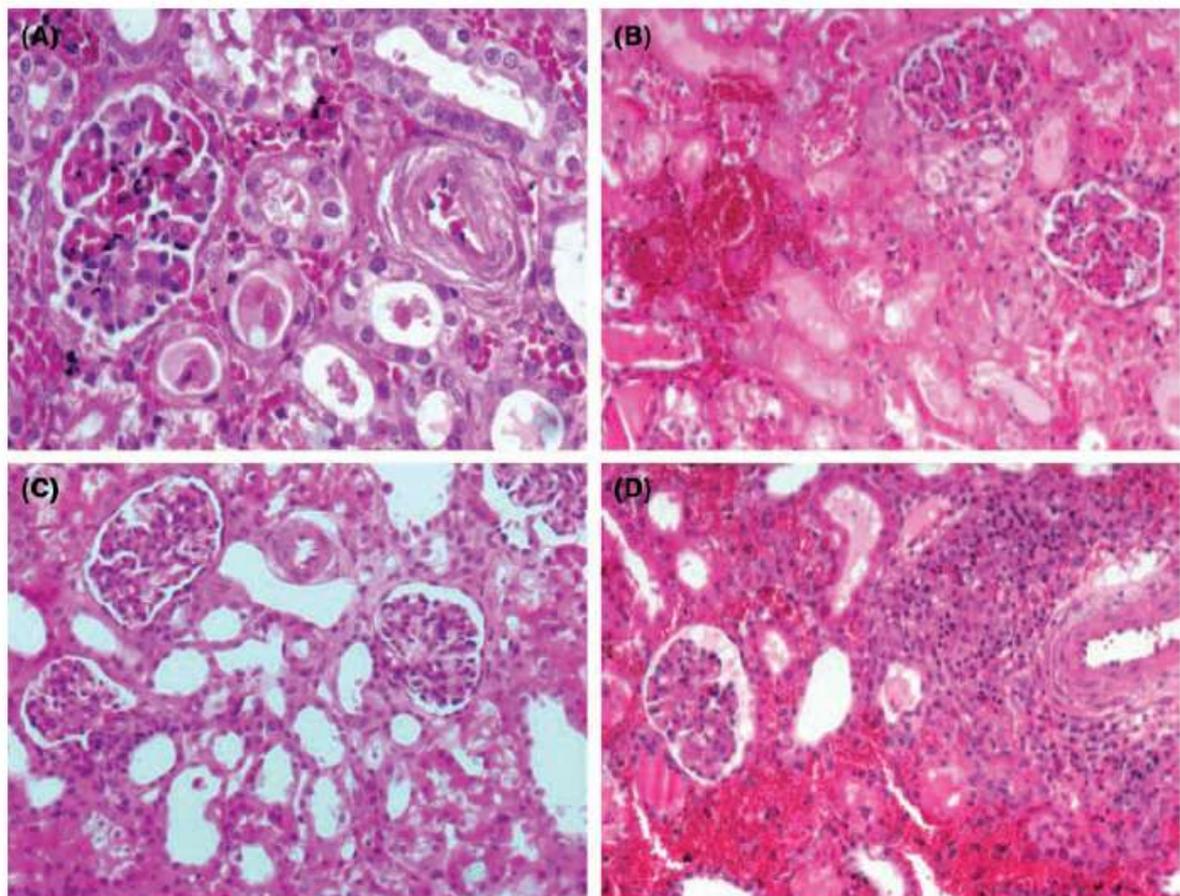


Fig. 1. Graft histology at rejection for the immunoadsorbed groups A, B and D and at day 6 for the non-immunoadsorbed group C with stable renal function. One representative photo is shown for each group. Magnification $\times 200$ is shown for group A in order to observe lesions in more detail, whereas groups B and D with similar abnormalities are shown at $\times 100$ in order to observe a more general aspect. Group C with no lesions or only acute tubular necrosis is also presented at $\times 100$.

lesions in the glomeruli with congestion and retracted tufts or changes reminiscent of lesions of hemolytic uremic syndrome (group B). Focal perivascular infiltrates of lymphocytes and macrophages were seen in biopsies of animals in groups B and D. In contrast, group C kidney biopsies, despite being taken at day 6 and not day 5 due to technical reasons, showed either no significant lesions or slight acute tubular necrosis not consistent with DXR.

Effect of IAs and anti-gal IgM and IgG Ab evolution

Immunoadsorption at day - 1 in groups A, B and D depleted on average 77 (± 15)% total IgM and 93 (± 9)% total IgG. The evolution of serum anti-gal IgM Ab levels from the day prior to

transplantation and throughout the post-transplant period is shown in Fig. 2. Following the pre-transplant IA in groups A, B and D, serum measurements of anti-gal IgM Ab showed a tendency toward a gradual increase until rejection, although often remaining below the pre-IA baseline level. In contrast, IgM levels in group C decreased from the pre-transplantation baseline and remained low with little fluctuation until the time of death, except for baboon V9622 who suffered from a DIC. This baboon can be easily distinguished from the others due to a pronounced increase in IgM levels, markedly during the last few days before death, raising suspicions of a DIC-related rejection in this animal. Among the immunoadsorbed baboons, only one animal in group A (V952) and three animals in group B (V9517,

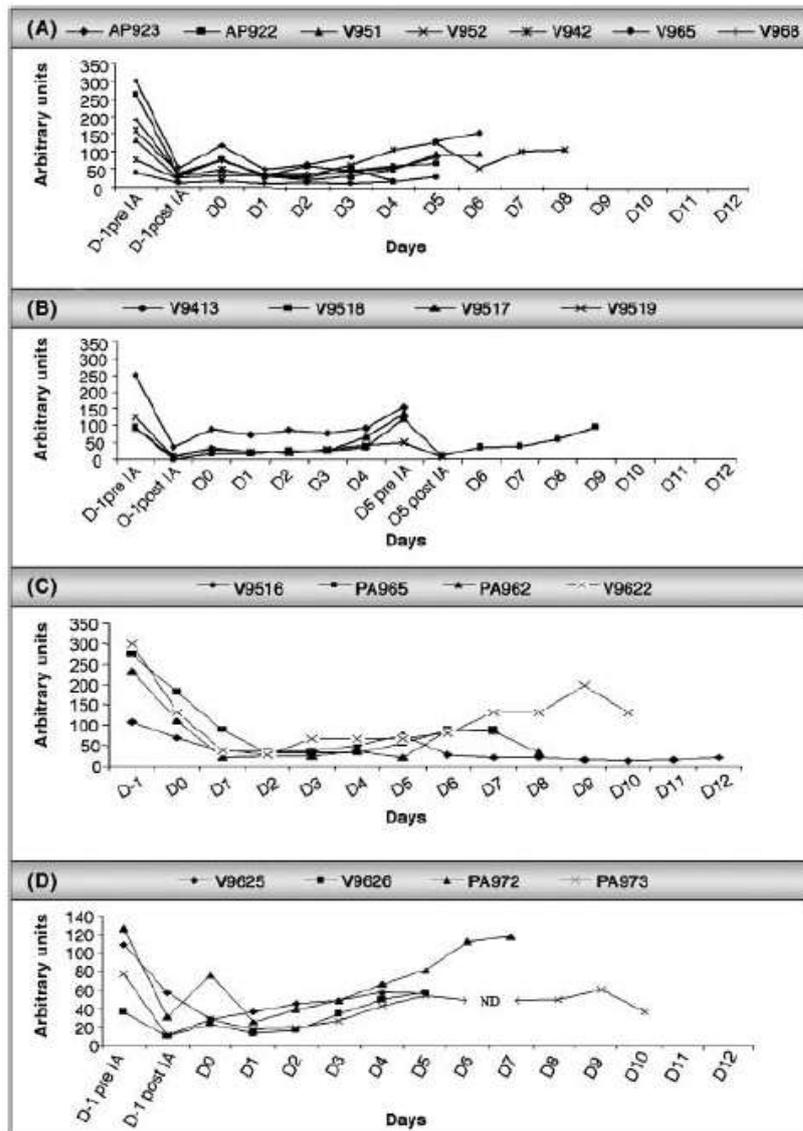


Fig. 2. Anti-gal IgM Ab evolution pre- and post-IA for groups A, B and D and from the day of transplantation for the non-immunoadsorbed group C, as measured in daily serum samples via ELISA. ND: not done.

V9518 and V9519) were clinically able to withstand an IA on day 5 and one of them (V9517) died during the procedure. The severity of such IA has been described previously [8]. In the three baboons immunoadsorbed at day 5 rejection occurred not long after: later on the same day for two animals and 3 days later for the third. Thus, although effective in reducing serum anti-gal IgM levels, IA at day 5 was unable to reverse the ongoing rejection. Group D animals were not immunoadsorbed at day 5 due to their poor clinical condition. Regarding anti-gal IgG, levels of this isotype remained low and unchanged throughout the post-transplantation period in all immunoadsorbed groups, and did not show significant variation in group C, even during DXR (data not shown).

Intra-graft Ab deposition and complement activation

Biopsies taken at rejection (the first biopsy) or in the absence of rejection (for group C animals) or from naive porcine kidneys, were studied for IgM and IgG deposition and complement activation through to C5b-9. The results displayed in Fig. 3 highlight interesting differences between the rejecting and non-rejecting animals. In all animals (A, B, C and D), IgM deposition was clearly detectable

(Fig. 3, panel 1) whereas IgG deposits were rare (data not shown). In contrast, C5b-9 deposits were present in all rejecting biopsies, i.e. in biopsies from groups A, B and D but absent in the non-rejecting group C biopsies (Fig. 3, panel 2).

To look in more detail at the evolution of complement deposition and activation, we compared biopsies taken from naive kidneys or at the early phase of rejection (the day 5 biopsy) or at advanced rejection (the biopsy taken just prior to sacrifice) in groups A, B and D. We observed an apparent correlation between the degree of rejection and C5b-9 deposition with an increase in deposition as rejection progressed (results for group D animals V9625 and PA972 are shown; Fig. 3, panel 3), as opposed to its absence in naive or non-rejected kidneys. Rejection therefore was clearly associated with complement activation, even in the presence of the hCD55 transgene.

Xenograft cellular infiltration

Cellular infiltration, as assessed by immunohistochemistry, in biopsies from kidneys undergoing rejection or not, is shown in Fig. 4. The infiltrate was seen to consist predominantly of monocytes/macrophages as determined by CD68 staining (groups C and D only; panel 1) and CD11b staining

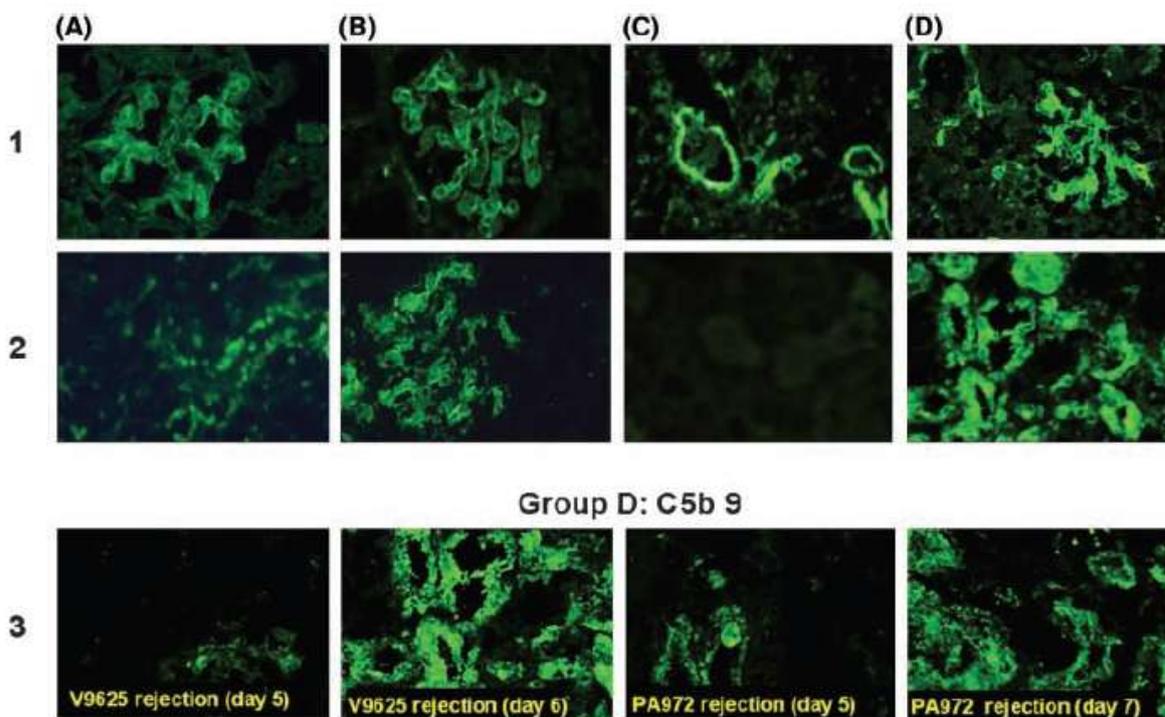


Fig. 3. Immunofluorescence staining in biopsies from kidneys of groups A, B, C and D. Panel 1: IgM; panel 2: C5b-9 (one representative photo is shown for each group) and panel 3: C5b-9 at the early or advanced phases of rejection for two animals of group D, illustrating the increasing complement activation observed in DXR progression. Magnification $\times 200$.

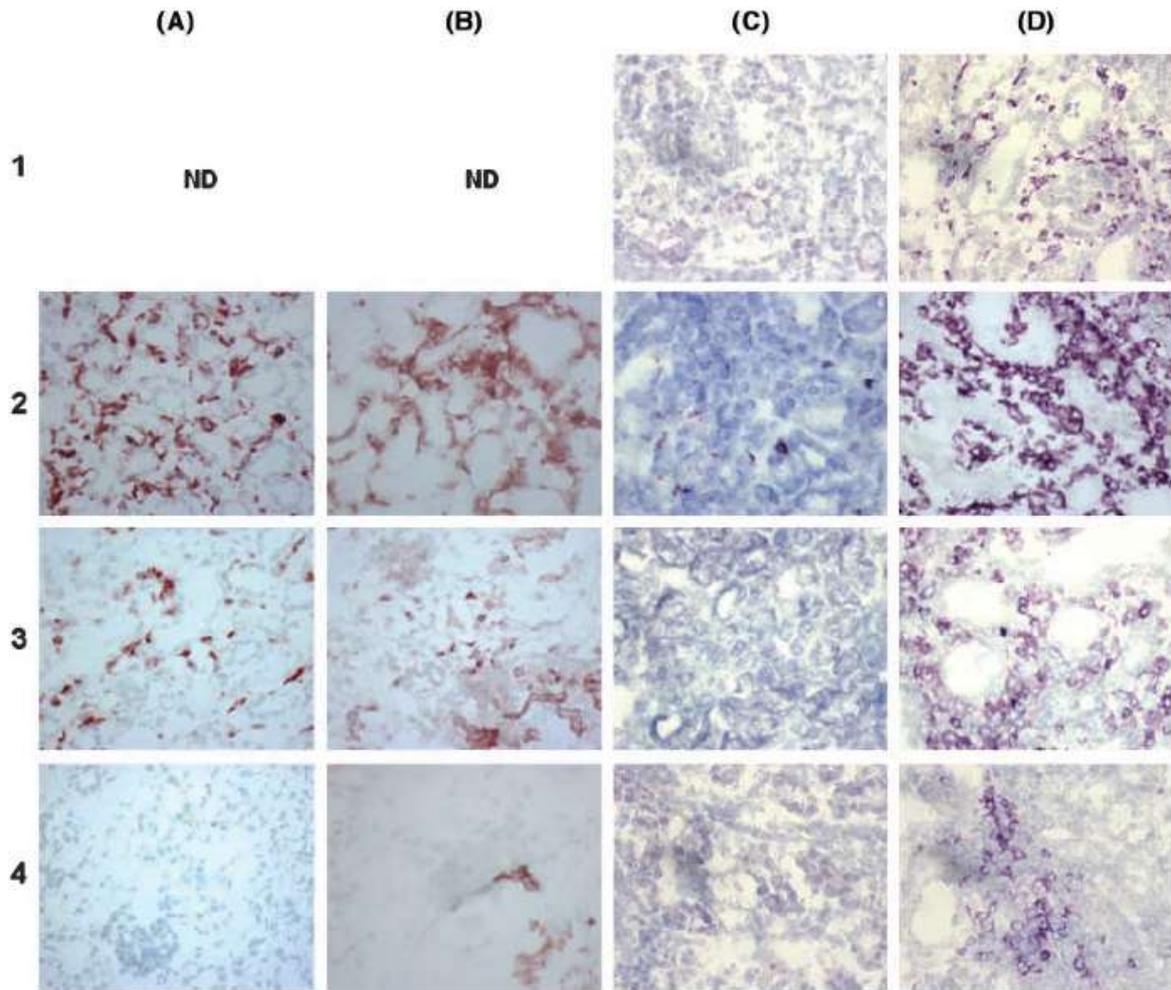


Fig. 4. Immunohistochemical staining in biopsies from kidneys of groups A, B, C and D. Panel 1: CD68 (groups C and D only), panel 2: CD11b, panel 3: CD4, panel 4: CD8. One representative photo is shown for each group. Magnification $\times 400$.

(panel 2). CD4 cells were also present although to a lesser extent (panel 3), and CD8 cells were rare (panel 4). The non-rejecting group C animals tended to show fewer cells (less dense CD11b+ and CD4+ staining and no CD8+ cells). The predominant infiltrating cell population seemed to be monocytes/macrophages, and to assess their local activity, quantitative RT-PCR for the baboon pro-inflammatory cytokines IL1 α , IL6 and IL8 was performed on biopsies from non-rejected kidneys (the day 6 biopsy of group C animals with stable renal function and no signs of rejection) and biopsies from rejected kidneys (group D biopsies taken at rejection). The C and D animals were comparable in that they had received the same immunosuppression and hCD55 kidneys and thus differed only in the presence/absence of IA. The results of this analysis are shown in Table 3. Indeed, mRNA transcripts for the baboon-derived pro-inflammatory cytokines IL1 α , IL8 and IL6

were significantly up-regulated in the biopsies from group D taken at rejection compared with the biopsies from group C without signs of rejection, thus confirming the apparent difference in cellular infiltration between the two groups observed in immunostaining.

Discussion

We studied the outcome of xenotransplantation in immunosuppressed baboons receiving normal or transgenic pig kidneys with or without total Ig IA. Our aim was to analyze whether combining these

Table 3. Quantitative RT-PCR analysis

Cytokine	Group C median (range)	Group D median (range)	P
IL1 α	0.219 (0.094–0.419)	3.891 (0.469–9.469)	< 0.05
IL6	0.039 (0.015–0.081)	11.033 (7.345–25.321)	< 0.05
IL8	0.020 (0.003–0.020)	7.218 (1.862–7.527)	< 0.05

two strategies would lead to an additive effect in terms of graft survival and consequently the mechanisms involved in rejection under such circumstances. The poor outcome of the immuno-adsorbed, transgenic xenotransplanted group (group B), which is in discordance with the literature [10], led us to perform transplantations without IA in order to investigate their possible detrimental effect. As the transgene seemed to prevent HAR and as there is evidence in the literature that transgenic pig organs are superior to normal organs in preventing HAR in immunosuppressed baboons [20], we decided to focus our study on transgenic organs by comparing two groups of animals treated with or without IA. In these latter groups, we optimized our immunosuppression regimen by starting CyP treatment 1 day earlier as used by others [16].

The outcome of these transplantations reinforced our previous findings because the immuno-adsorbed group (D) again rejected the grafts within the same time frame as the two previous immuno-adsorbed groups (A and B), whereas the non-immuno-adsorbed group C animals did not, at least at this early time point. However, even without IA, this immunosuppressive regimen appeared to expose the recipients to serious infectious complications, emphasizing its current non-applicability in clinical transplantation. The reason for the rapid rejection in the immuno-adsorbed groups is surprising and not clear.

One possibility is that our IA regimen was not optimal. In our study, Ig depletion using Therasorb columns at day - 1 depleted both IgM and IgG significantly but not completely, comparable with previous studies with the same columns [21]. Repeated pre-graft IA could have led to a better depletion. Although this level of IgM depletion may not have been optimal, it remains unclear why removal of Ab would be more detrimental in terms of graft survival than no removal at all. One possibility is that the pre-transplant IA disrupted the equilibrium of Ab production leading to a rebound Ab production, which was uncontrollable by the immunosuppression and would have necessitated sequential IA during the post-transplant period for an extended depletion. However, such an Ab rebound was not visible in the animal serum, possibly due to immediate trapping within the graft.

A second possibility is that the removal of all IA from the graft recipient could also lead to the removal of 'facilitating' Ab. The existence of such Ab has so far only been demonstrated in rodent models of concordant xenotransplantation in the context of accommodation [22] and thus remains

hypothetical in large animal models. However, in the recent literature, selective depletion of anti-gal Ab has been shown to significantly prolong transgenic pig xenograft survival in baboons [9]. Given these findings, our results suggest that removal of other Ig including non-anti-gal Ab could be deleterious to graft survival, leading to a rapid onset of DXR.

On analysis of biopsies taken from rejecting and non-rejecting kidneys, we observed interesting differences in terms of Ab deposition, complement activation and cellular infiltration. Regarding the humoral response, whereas IgM deposits were found in all biopsies irrespective of rejection, C5b-9 was detected only in biopsies taken at rejection and was absent in biopsies from animals not rejecting their grafts. Furthermore, C5b-9 staining appeared to be a marker of rejection in that it was lacking in naive biopsies, weak in biopsies taken at the onset of rejection and increased as rejection progressed. Additional differences were observed in terms of cellular infiltration, which was pronounced at rejection and created a predominant pro-inflammatory environment within the graft. The modest T cell involvement was not surprising given the pharmacological immunosuppression of the graft recipients. Surprisingly we did not observe any granulocyte infiltration as often described in other models.

These findings confirm a pivotal role for IgM (and therefore natural xenogeneic Ab) and complement activation in the DXR observed in this model, with complement activation through to the C5b-9 being necessary and characteristic of this rejection, even in the presence of hCD55 transgenic organs. The predominance of IgM over IgG in DXR is in agreement with recent observations by Bühler et al. [23]. The weak intragraft IgG deposition together with the scarce T cell infiltration in the rejection observed in our study reinforces the idea of a T cell-independent natural Ab response as opposed to an induced response at this early stage of DXR, which might occur a few days later. Interestingly, the fundamental role of complement activation in DXR that we observe here is in accordance with a recent study by Vangerow et al. [24] where, in a similar model, DXR was effectively treated by the complement inhibitor C1. As in our study, this group also detected C5b-9 deposition in hCD55 transgenic organs of the same origin. This means that complement activation is possible, even in the context of the hCD55 transgene, which appears to be eventually overcome.

Furthermore, given these results, in our model DXR looked like a delayed and less violent form of HAR, held back by the transgene but eventually

emerging due to an ever increasing intragraft IgM deposition overriding the transgene and driving complement activation with an associated pro-inflammatory cellular infiltration.

Further exploration of our hypotheses, including the existence of anti-pig anti-non-Gal Ab, will necessitate selective and repetitive removal of anti-Gal Ab, unless the emergence of Gal knockout pigs [25,26] could solve this problem. In any case, even in the context of Gal knockout pig organs, the existence of putative facilitating Ab and/or the knowledge of the best prevention of anti-pig-induced Ab would remain of great importance.

Acknowledgments

The authors thank Jeanne Naulet for technical assistance and Nelly Guillard for animal care.

References

1. GOOD AH, COOPER DK, MALCOLM AJ, et al. Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc* 1992; 24: 559.
2. COOPER DK, GOOD AH, KOREN E, et al. Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol* 1993; 1: 198.
3. PLATT JL, FISCHER RJ, MATAS AJ, REIF SA, BOLMAN RM, BACH FH, et al. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 1991; 52: 214.
4. LEVENTHAL JR, SAKIYALAK P, WITSON J, et al. The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates. *Transplantation* 1994; 57: 974.
5. COZZI E, WHITE DJ, et al. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1995; 1: 964.
6. LAMBRIGTS D, SACHS DH, COOPER DK, et al. Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation* 1998; 66: 547.
7. BACH FH, ROBSON SC, WINKLER H, et al. Barriers to xenotransplantation. *Nat Med* 1995; 1: 869.
8. LIN SS, WEIDNER BC, BYRNE GW, et al. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J Clin Invest* 1998; 101: 1745.
9. LIN SS, HANAWAY MJ, GONZALEZ-STAWINSKI GV, et al. The role of anti-Galalpha1Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation* 2000; 70: 1667.
10. VIAL CM, OSTLIE DJ, BHATTI FN, et al. Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 224.

11. BHATTI FN, SCHMOECKEL M, ZAIDI A, et al. Three-month survival of HDAFF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc* 1999; 31: 958.
12. KOBAYASHI T, TANIGUCHI S, NEETHLING FA, et al. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation* 1997; 64: 1255.
13. CHEN RH, KADNER A, MITCHELL RN, ADAMS DH, et al. Mechanism of delayed rejection in transgenic pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *J Surg Res* 2000; 90: 119.
14. PASCHER A, POEHLEIN C, STANGL M, et al. Application of immunoadsorption for delaying hyperacute rejection during isolated xenogeneic pig liver perfusion. *Transplantation* 1997; 63: 867.
15. ZAIDI A, SCHMOECKEL M, BHATTI F, et al. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation* 1998; 65: 1584.
16. COZZI E, BHATTI F, SCHMOECKEL M, et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 2000; 70: 15.
17. BARREAU N, GODFRIN Y, BOUHOURS JF, et al. Interaction of anti-HLA antibodies with pig xenoantigens. *Transplantation* 2000; 69: 148.
18. GAGNE K, BROUARD S, GIRAL M, et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000; 164: 1553.
19. CHIRGWIN JM, PRZYBYLA AE, MACDONALD RJ, RUTTER WJ, et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294.
20. SCHUURMAN HJ, PINO-CHAVEZ G, PHILLIPS MJ, THOMAS L, WHITE DJ, COZZI E, et al. Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplantation* 2002; 73: 1146.
21. LEVENTHAL JR, JOHN R, FRYER JP, et al. Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies. *Transplantation* 1995; 59: 294.
22. LIN Y, SOARES MP, SATO K, et al. Accommodated xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts. *J Immunol* 1999; 163: 2850.
23. BUHLER L, YAMADA K, KITAMURA H, et al. Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal (alpha) 1Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation. *Transplantation* 2001; 72: 1743.
24. VANGEROW B, HECKER JM, LORENZ R, et al. C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation* 2001; 8: 266.
25. DAI Y, VAUGHT TD, BOONE J, et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 251.
26. LAI L, KOLBER-SIMONDS D, PARK KW, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089.

III.2.1.3 Discussion (complémentaire à l'article)

De manière surprenante, l'utilisation d'organes transgéniques associée à une IA dans le groupe B n'a pas permis un meilleur contrôle du rejet par rapport au groupe A. Il est probable que le potentiel bénéfique du transgène humain CD55 ait été masqué soit par un régime immunosuppresseur insuffisant ou par un effet délétère de l'IA. Pour tester ces deux hypothèses, deux séries supplémentaires de xéno greffes ont été réalisées avec un protocole d'immunosuppression plus intense (groupe C et D) par l'ajout de cyclophosphamide débuté à J-1 de l'intervention et par la réalisation d'une IA dans le groupe D. Malgré ces modifications thérapeutiques, l'IA semble encore avoir été délétère puisque tous les animaux du groupe D sont décédés d'un RVA alors que la biopsie des animaux du groupe C était sub- normale. Cet effet délétère de l'IA pourrait avoir deux explications. La première serait que l'IA élimine des anticorps considérés comme « protecteurs » comme l'a défini Dorling dans un modèle concordant et dans un modèle *in vitro* (Dorling et al. 1996; Delikouras et al. 2001). Bien que les IA et les organes transgéniques aient montré un effet bénéfique sur le contrôle du rejet hyperaigu et le RVA (Leventhal et al. 1995; Lin et al. 1998), Gonzalez-Stawinski (Gonzalez-Stawinski et al. 2002) a reporté que des poumons porcins transgéniques pour la molécule humaine CD46 étaient plus rapidement rejetés par des babouins après IA que par rapport à un groupe contrôle. L'efficacité des IA sur l'élimination des Ac antiGal est indéniable mais Lambrigts (Lambrigts et al. 1998) a démontré qu'il était ensuite difficile de maintenir des taux très faible d'Ac par une immunosuppression standard. Il est donc possible d'envisager que l'IA pré-opératoire dans notre étude était un puissant inducteur stimulant la production d'Ac qui n'était ensuite pas contrôlé par le régime immunosuppresseur. C'est en effet après avoir majorer l'IS que nous avons pu contrôler la survenue du RVA (groupe C) et cet effet positif a disparu après la réalisation d'IA (groupe D).

Le mycoférolate mofétyl, puissant inhibiteur de la prolifération lymphocytaire B et T (Sollinger 2004) et dont l'action dans ce contexte de rejet humoral est primordial, n'a peut être pas été administré à des doses assez élevée comme dans d'autres études (Cozzi et al. 2003) où la posologie du MMF était de 100mg/kg/j avec des survies de xéno greffons rénaux ayant pu atteindre 50 jours. De plus, il n'était pas possible, à l'époque où les procédures ont été réalisées dans notre laboratoire, de doser les taux sanguin du MMF et donc de contrôler l'efficacité de cet immunosuppresseur qui était administré à la posologie de 70mg/kg/j.

Cette incapacité à contrôler la réponse humorale dans les groupes A, B et D était ainsi corrélée dans notre étude au retour des IgM anti-Gal à partir du 4^{ème}-5^{ème} jour et à la détection dans les biopsies de greffons de dépôts d'IgM et de C5b-9 associé à un infiltrat cellulaire.

III.2.2 ETUDE DE L'INFILTRAT CELLULAIRE DES XENOGREFFONS LORS DU REJET AIGU

III.2.2.1 Informations générales

Bien que la physiopathologie des rejets hyperaigus et vasculaires aigus mettait en jeu principalement des mécanismes humoraux, la participation cellulaire avait été peu étudiée dans une combinaison porc-primate. Aucune étude n'avait au début des années 2000, quantifié l'activité de cet infiltrat cellulaire. De plus la différence de profil d'expression des cytokines pro-inflammatoires retrouvée dans notre étude précédente, nous avait convaincu de continuer à explorer cette voie. Ainsi, grâce à une collaboration avec Rafael Mañez en Espagne qui avait déjà réalisé de nombreuses greffes cardiaques en position hétérotopiques (Manez et al. 2000), nous avons pu analyser des biopsies issues d'animaux receveurs ayant rejetés leur xéno greffon malgré une immunosuppression ou sans immunosuppression. De plus la série de Rafael Mañez nous permettait également d'étudier un troisième groupe de receveurs n'ayant eu que des immunoabsorptions sans immunosuppresseur.

III.2.2.2 Article II: "Cellular participation in Delayed Xenograft Rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons" *Xenotransplantation* 2003;10; 446- 453.

Cellular participation in delayed xenograft rejection of hCD55 transgenic pig hearts by baboons

Ashton-Chess J, Roussel J-C, Manez R, Ruiz C, Moreau A, Cozzi E, Minault D, Souillou J-P, Blancho G. Cellular participation in delayed xenograft rejection of hCD55 transgenic pig hearts by baboons. *Xenotransplantation* 2003; 10: 446–453. © Blackwell Munksgaard, 2003

Abstract: Delayed xenograft rejection (DXR) of pig organs by baboons currently represents the major obstacle to successful xenotransplantation. Although antibodies (Abs) are believed to play a fundamental role in this form of rejection, so far little is known concerning the potential cellular component. Biopsies taken during DXR of human CD55 transgenic pig hearts by non-treated ($n = 2$), α -Gal immunoadsorbed ($n = 2$), or immunosuppressed ($n = 9$) baboons were studied. The cellular element was explored by determining not only its phenotype by classical immunohistochemical techniques but also its activity in terms of cytokines, cytolytic enzymes and other mediators using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. All porcine xenografts underwent DXR; within 5 days in non-treated and immunoadsorbed animals but significantly delayed (6 to 29 days) in immunosuppressed animals. Cellular infiltration in non-immunosuppressed grafts consisted predominantly of monocytes/macrophages, CD8 cells and a few CD4 T-cells. The predominant baboon transcripts detectable were the pro-inflammatory cytokines interleukin- α and tumor necrosis factor- α , the lymphokine interferon- γ and the cytotoxic enzyme granzyme B. However, these cellular components were lacking in the immunosuppressed animals. Despite these differences, strong immunoglobulin M (IgM) and C5b-9 complement deposition was observed in all animals at rejection. Together our findings suggest that although the humoral response plays a predominant role in DXR through IgM Abs and complement activation, there is a clear cellular infiltrate in DXR in this model that is likely to contribute to rejection through a strong pro-inflammatory and cytotoxic environment, necessitating substantial immunosuppression for a prolonged graft survival.

Joanna Ashton-Chess¹, Jean-Christian Roussel¹, Rafael Manez², Carmen Ruiz², Anne Moreau³, Emanuele Cozzi⁴, David Minault¹, Jean-Paul Souillou¹ and Gilles Blancho¹

¹INSERM U437, Immunointervention in allo and xenotransplantation, and ITERT, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France, ²Juan Canalejo Medical Center and University of La Coruna Health Institute, 15006 La Coruna, Spain, ³Laboratoire d'anatomopathologie, Hôtel Dieu, Nantes, France, ⁴Imutran Ltd (a Novartis Pharma A.G. company), Cambridge, UK

Keywords: cytokines – infiltrating cells – primate – xenotransplantation

Abbreviations: HAR: hyperacute rejection; DXR: delayed xenograft rejection; Abs: antibodies; NK: natural killer; RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction; IA: immunoadsorption; NT: no treatment; IS: immunosuppression; IV: intravenous; FITC: fluorescein isothiocyanate; HPR: hypoxanthine phosphoribosyl transferase; IFN: interferon; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin; RANTES: regulated upon activation T-cell expressed and secreted; Ig: immunoglobulin; Th: T-helper; hCD55: human CD55; SD: standard deviation.

Address reprint requests to Gilles Blancho, ITERT/INSERM U437, Immeuble Jean Monnet, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes cedex, France (E-mail: gblancho@chu-nantes.fr)

Received 28 April 2002;

Accepted 05 September 2002

Introduction

In discordant large animal models of xenotransplantation such as the pig to primate combination, hyperacute rejection (HAR) has become a controllable phenomenon. This has come through the development of various strategies including xenogeneic antibody (Ab) removal via immunoadsorption (IA) [1] and complement inhibition via the use of pig donors transgenic for human complement

regulatory proteins such as CD55 [2]. Nevertheless, xenografts that are not hyperacutely rejected are subsequently faced with a second onset of rejection, referred to as delayed xenograft rejection (DXR). DXR currently represents a major obstacle to successful xenotransplantation and the precise mechanisms of this form of rejection remain to be fully characterized.

As for HAR, antibodies (Abs) and complement activation are believed to play a fundamental role

in DXR [1, 3, 4]. Besides this humoral response, however, much less evidence concerning the cellular participation in DXR is available in large animal models. In concordant rodent models, the absence of XNA has allowed the cellular component of xenograft rejection to be investigated in more detail and studies in such models underline a pivotal role for T-cells [5–7] at least in part through their generation of helper-dependent xeno-Abs [7]. In discordant rodent models, immunohistochemical studies have shown a predominantly monocyte/macrophage infiltrate with some NK cells and few or no T-cells [8–10]. In large animal models such as the pig-to-baboon combination, fewer detailed studies have been performed. Via immunohistochemistry, a predominantly T-cell mediated immune response has been described during DXR [11], whereas other studies have identified a macrophage/NK predominance [12, 13] and one study showed both macrophage and T-cell involvement [14].

Cellular involvement is a phenomenon which in the future is likely to become fundamental in its own right as well as through its role in the induced humoral response, in particular with the development of Gal knockout pigs [15, 16]. We therefore aimed to investigate this aspect in DXR of human CD55 (hCD55) pig hearts in baboons under different conditions [no treatment, IA and immunosuppression (IS)]. In particular, we extended our study by exploring more precisely the environment created by the infiltrating cell population in terms of cytokines, cytolytic enzymes and other mediators by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in addition to the classical immunohistochemical technique.

Materials and methods

Animals and biopsies

Hearts from heterozygote hCD55 transgenic pigs (Imutran Ltd, Cambridge, UK) were transplanted heterotopically [17] into baboons that either received no treatment (NT; $n = 2$) or underwent repeated IAs with an α -Gal column (Novartis Pharma A.G., Basle, Switzerland) pre- and post-transplantation at days -3, -2, -1, 3 and 5 (IA; $n = 2$) or underwent an IS (IS; $n = 9$). IS consisted of cyclosporin A IV at 10 mg/kg/day from day -1 to reach trough levels of 1500 ng/ml then orally at 100 mg twice daily to achieve the previous trough levels, cyclophosphamide IV at 40 mg/kg on day -1, 20 mg/kg on day 0 up to 30 mg/kg on days 2 and 4 to reach a white blood cell count of 2000/mm³, ERL (enteric-coated sodium salt of

mycophenolic acid, Novartis Pharma A.G.) orally at 35 mg/kg twice daily from day -1 to achieve trough levels of mycophenolic acid of 4 to 6 μ g/ml and methylprednisolone IV at 1 mg/kg on days 0 to 2, reducing by 0.05 mg/kg/day to a maintenance dose of 0.2 mg/kg from day 18. Xenograft function was assessed by palpation every 8 h and rejection was suspected when a profound reduction in beating was observed. At this point, biopsies were taken, the animals were sacrificed and rejection was subsequently confirmed via classical histology. No biopsies were taken post-mortem, so as to avoid performing our analysis on necrotic tissue. The quality of the tissue was confirmed by its intact architecture as observed by immunohistology and the intact, non-degraded RNA which was extracted for RT-PCR. Biopsies were either fixed in 10% formalin (for histologic analysis) or snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (for RNA extraction) or surrounded in Tissue Tek (Miles, Elkhart, IN, USA) before being snap-frozen as above (for immunohistochemical analysis).

Immunohistochemical analysis

Six micrometer sections were cut, fixed in acetone, blocked with H₂O₂, saturated with pig serum and stained with the primary Abs: CD3, CD4 and CD8 (DAKO, Glostrup, Denmark) and CD11b (Immunotech, Marseille, France) followed by a biotin-conjugated F(ab')₂ anti-primary Ab (Immunotech) then avidin conjugated horseradish peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and Peroxidase Substrate Kit Vector® VIP (very important purple, Vector Laboratories Inc.). Sections were counterstained with hematoxylin and lithium carbonate. For immunofluorescence analysis, frozen 5- μ m tissue sections were acetone fixed and stained with rabbit anti-human immunoglobulin G (IgG), rabbit anti-human immunoglobulin M (IgM) and fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated Abs (DAKO).

Real time quantitative RT-PCR

Real time quantitative RT-PCR was performed on RNA, extracted from xenograft biopsies as described in detail [19]. Briefly, RNA prepared via the guanidium isothiocyanate procedure and purified on a caesium chloride gradient according to Chirgwin [18] was reverse transcribed into cDNA. Standards were constructed via PCR amplification of the target sequence from Concanavalin A-activated peripheral blood mononuclear cells and baboon heart biopsies, using the respective forward and reverse primers. Ten microliter of serially diluted

standard and 1/10 diluted (in purified water) cDNA from sample biopsies were amplified in duplicate in Sybr Green[®] PCR core reagents (Perkin Elmer Biosystems, Warrington, UK) in an ABI Prism 7700-Perkin Elmer Sequence Detection System. Levels of target sequence in samples were calculated according to the standard curve, normalized against the levels of the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) and expressed as a ratio of target/total HPRT. Species-specificity of primers was pre-determined via sequence homology analysis using 'BLAST' on the National Center of Biotechnology Information (NCBI) internet database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for pig and human sequences and also via PCR analysis of pig and baboon tissue. HPRT primers amplified baboon and porcine HPRT equally.

Measurement of anti-Gal IgM and IgG Abs and hemolytic anti-pig xenoantibodies

Anti-Gal (IgM and IgG) Abs and hemolytic anti-pig xenoantibodies in baboon sera pre- and post-transplantation were measured via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a complement dependent cytotoxicity assay, respectively, as previously described in detail [20].

Results

Xenograft survival

Xenograft survival is shown in Fig. 1. All xenografts underwent DXR. Mean survival time was

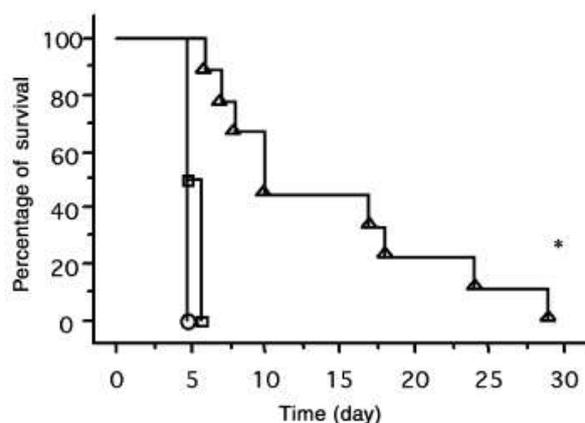


Fig. 1. Kaplan-Meier analysis of hCD55 transgenic pig heart survival in non-treated (O), α -Gal immunoadsorbed (□) or immunosuppressed (Δ) baboons. Significant prolongation of survival (*) in the immunosuppressed recipients is seen compared with both the non-treated ($P = 0.0016$) and the immunoadsorbed animals ($P = 0.0004$) as determined by log rank analysis.

4.7 days in non-treated baboons, 5.2 ± 0.7 days in α -Gal immunoadsorbed baboons and 14.3 ± 8.1 days in immunosuppressed baboons [a significant prolongation compared with both the non-treated ($P = 0.0016$) and the immunoadsorbed groups ($P = 0.0004$)].

Xenograft cellular infiltration

Cellular infiltration of the xenografts was assessed via staining of CD11b, CD3, CD4 and CD8 (Fig. 2). CD11b staining (a monocyte/macrophage/NK marker) was dense in the non-treated and immunoadsorbed groups and more or less absent in the immunosuppressed group (panel A). Similarly, CD3, a component of the T-cell receptor, was also found to be abundant in the non-treated group, but rare in the immunoadsorbed group and absent in the immunosuppressed group (panel B). Moderate levels of CD8 T-cells were detected in both the non-treated and immunoadsorbed groups with no detection in the immunosuppressed group (panel C) and few CD4 cells were detectable, mainly in the non-treated group and were rare or absent in the other two groups (panel D).

Intragraft accumulation of mRNA for cytokines and other mediators

The DXR of porcine hCD55 transgenic cardiac xenografts by baboons was accompanied by accumulation of pro-inflammatory monocyte/macrophage/NK derived cytokines of baboon origin (Fig. 3). In biopsies from non-treated and immunoadsorbed animals, substantial transcript levels of baboon interleukin1- α (IL1- α) were detected as well as intermediate levels of baboon interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) transcripts and were significantly decreased in the immunosuppressed group as compared with the immunoadsorbed group ($P < 0.05$). Baboon IL6 was present at intermediate levels in all animals as was baboon IL8, albeit at fairly modest levels. Finally, the baboon costimulatory molecule CD80, a marker of infiltrating antigen presenting cells (APC) and their activation, was abundant in the non-treated and immunoadsorbed group and significantly decreased in the immunosuppressed group as compared with the immunoadsorbed group ($P < 0.05$).

No T-helper (Th) cytokine profile was able to be distinguished in porcine cardiac xenografts during DXR as baboon IL10 and IL13 transcripts were barely detectable in any of the three groups and IL12 was undetectable. This apparent lack of a

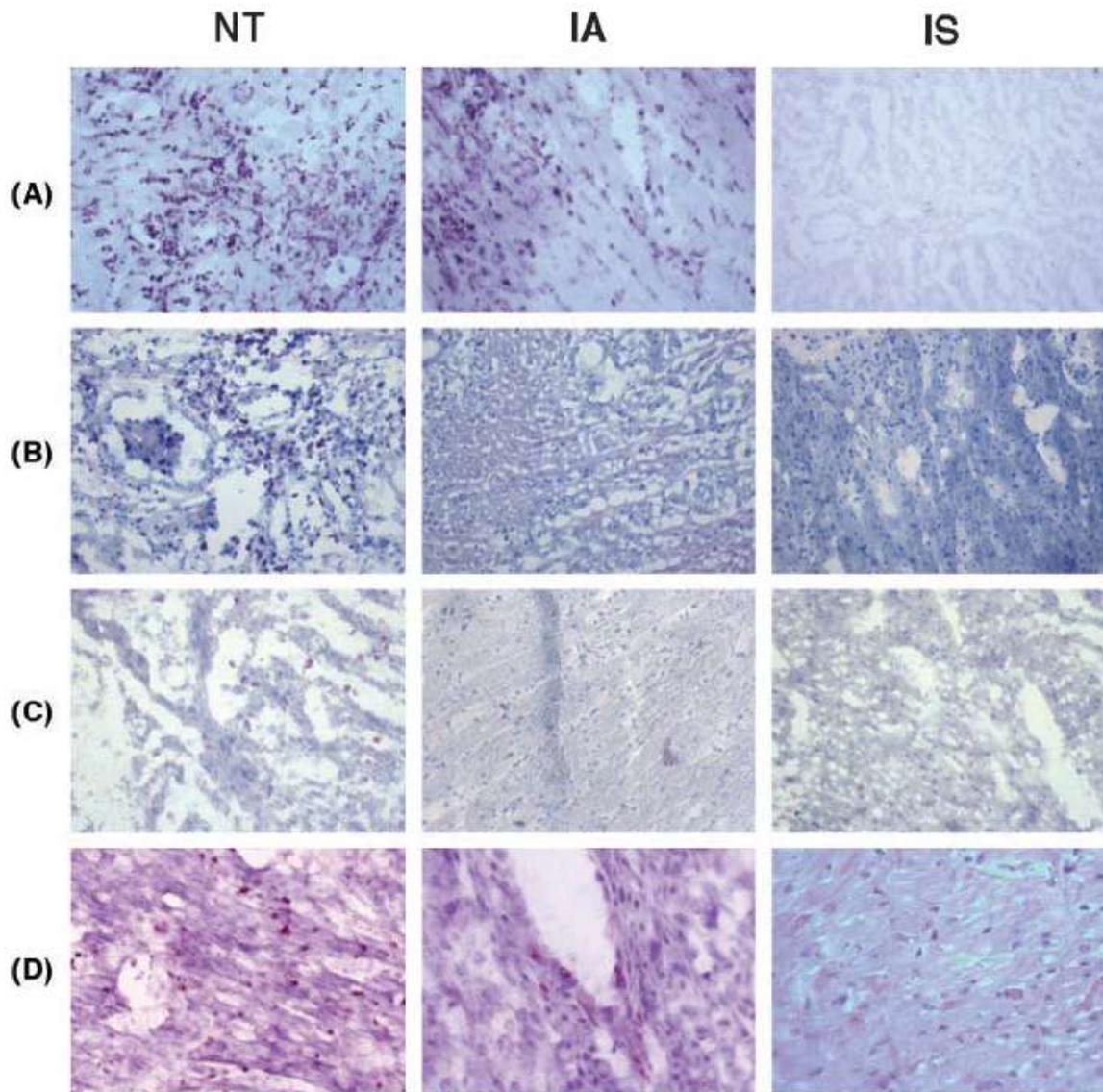


Fig. 2. Staining of hCD55 transgenic pig hearts undergoing DXR in non-treated (NT), α -Gal immunoadsorbed (IA) or immunosuppressed (IS) baboons. A: CD11b; B: CD3; C: CD4; D: CD8. Magnification $\times 20$.

This profile was not surprising considering the low level of CD4 staining by immunohistochemistry. However, intermediate levels of transcripts for the baboon T-cell chemokine RANTES were present in the non-treated group but to a lesser extent in the other two groups, although this difference was not statistically significant (Fig. 3). The presence of RANTES transcripts in the non-treated group correlates with the presence of CD3 and CD8 staining found by immunohistochemistry. Transcripts associated with cytotoxic cells were also clearly detectable and mostly concerned the granzyme pathway rather than the Fas/Fas ligand pathway. Transcript levels of the cytotoxic enzyme,

granzyme B, were found to be extremely high in the non-immunosuppressed groups and were significantly decreased in the immunosuppressed group compared with the immunoadsorbed group (Fig. 3). On the contrary, FasL transcripts were barely detectable in all three groups.

Evolution of serum complement-dependant cytotoxicity and anti-Gal Abs and intragraft IgM and IgG Ab and complement deposition

The DXR in all groups correlated with an increase in blood anti-pig xeno-Ab cytotoxicity and anti-Gal IgM whereas anti-Gal IgG remained low and

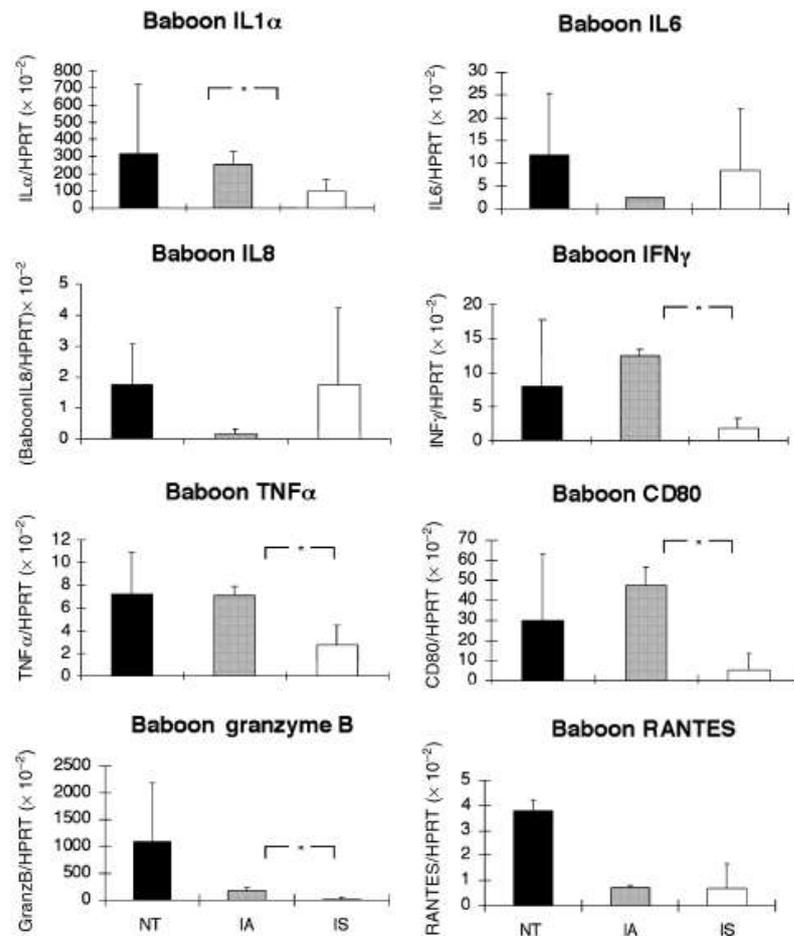


Fig. 3. Quantification of cytokine mRNA accumulation by baboon cells infiltrating hCD55 transgenic porcine cardiac xenografts in non-treated (NT), α -Gal immunoadsorbed (IA) or immunosuppressed (IS) animals. Results are expressed as a ratio of baboon mRNA/total tissue HPRT \pm SD. *P < 0.05 according to the non-parametric Mann-Whitney test. Forward (F) and reverse (R) primers were as follows (5'-3'): Baboon/porcine HPRT: F: ATTGACACTGGCAAACAATGCA, R: TCCAA CACTTCGTGGGGTCC; Baboon TNF- α : F: TTAAGCAACAAGACCACCCT, R: TCAAGGAAGTCTGGAAACATCT; Baboon IFN- γ : F: TGTCCAACGCAAAGCAATACA, R: TTCGTTCCCTGTTTTAGCTG; Baboon IL1- α : F: GGA GATGCCTGAGATACCCAA, R: TGAGACTCCAGACCTACGCCT; Baboon IL6: F: CACAGACAGCCACTCACCTCTT, R: GCAAGTCTCCTCATTGAATCCA; Baboon IL8: F: GCCAAGGAGTGCTAAAGAAT, R: AGCTCTCTCCATCAG AAAGC; Baboon granzyme B: F: CAGAAGTCTCTGAAGAGGTGCG, R: CGGCTCCTGTTCTTTGATATTG; Baboon CD80: F: CAAGGAAGTGAAGAAGTGGCA, R: CCCAGACATCATAGTCAGCACC; Baboon Fas-L: F: GGCAGTGTCAA TCTACCAGTG, R: GGAAAGAATCCCAAAGTGCCTC; Baboon RANTES: F: CGTGTCATCCTCATTTGCTACT, R: GTACTCCCGAACCCATTTCTTC; Baboon IL2R α : F: CAAGGGTCAGGAAGATGGATTC, R: CCAGGACGAGTGGC TAGAGTTT; Baboon IL10: F: CTGCCAATCATGCTTCGAGATC, R: AACCTTAAAGTCTCCAGCAA; Baboon IL12: F: TACCAGGTGAGTTCAAGACCA, R: TGGCACAGTCTCACTGTTGAAA; Baboon IL13: F: GGCAGCATGGTATG GAGCA, R: TTCAGTTGAACCGTCCCTCG.

stable (Fig. 4). Moreover, immunofluorescent staining at rejection revealed strong deposits of IgM and C5b-9 in biopsies from all three groups, even in immunoadsorbed animals (Fig. 5), whereas no IgG was detected in any group (data not shown).

Discussion

In this study we aimed to explore more precisely the cellular component of DXR in baboons under

different treatments, not only by its phenotype but also by determining at the molecular level, the active environment created by these infiltrating cells in terms of cytokines, cytolytic enzymes and other mediators.

Immunohistochemical analysis of xenograft biopsies from the non-immunosuppressed recipients revealed xenograft infiltration by baboon cells as opposed to those immunosuppressed where infiltration was barely detectable. The principal infiltrating cell type was found to be the monocyte/

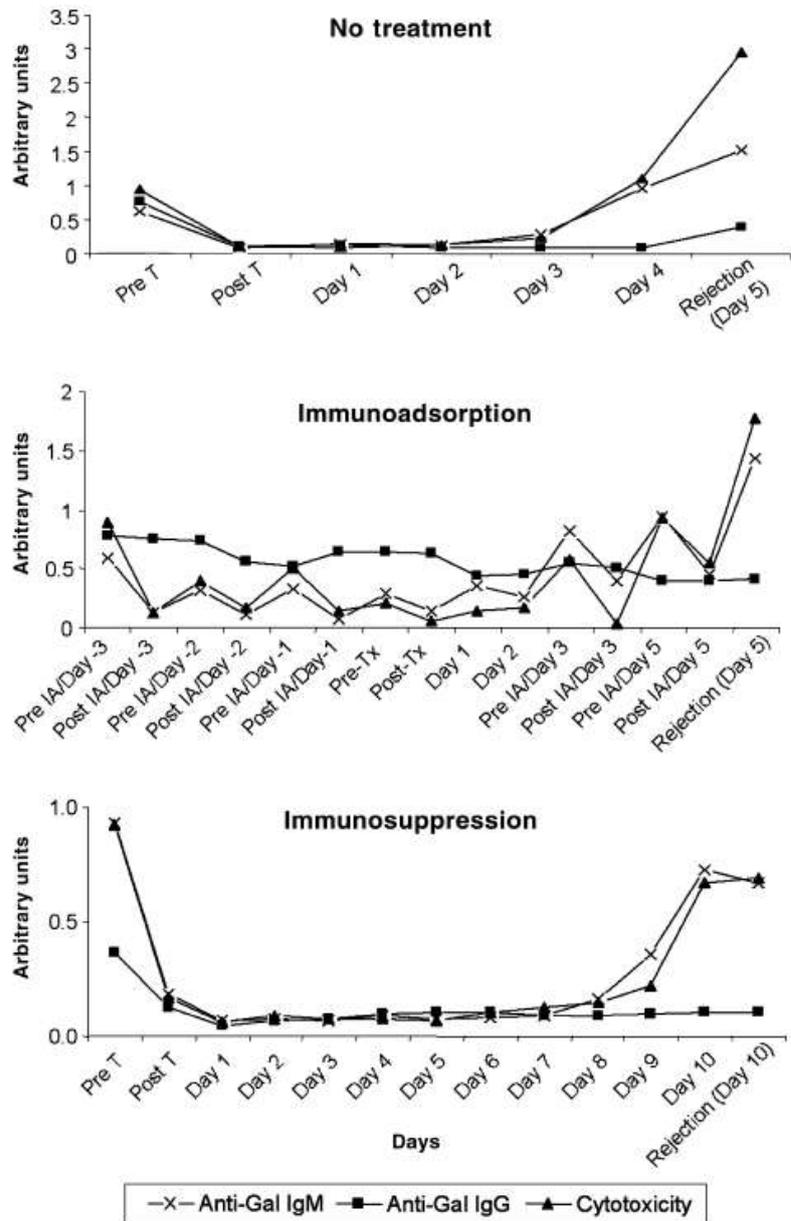


Fig. 4. Evolution of anti-Gal IgM and IgG antibodies and anti-pig red blood cell cytotoxicity in non-treated, immunoadsorbed and immunosuppressed animals. Data from one representative animal from each group is shown.

macrophage with a coexisting but less substantial CD8 T-cell component whereas CD4 helper T-cells were rare. This macrophage involvement at DXR confirmed previously published results [12–14].

We then expanded on these results by studying the transcriptional patterns of various mediators by quantitative RT-PCR, which demonstrated that these infiltrating cells had actively created an intragraft pro-inflammatory environment. Indeed, pro-inflammatory cytokine transcripts including mainly IL1- α but also IFN- γ , TNF- α , IL6 and IL8 were clearly detectable, as were transcripts for the co-stimulatory molecule CD80, a marker of

APC consistent with infiltration by monocytes/macrophages. Furthermore, the strong accumulation of mRNA for IFN- γ and the cytotoxic enzyme granzyme B in the absence of FasL transcripts could correlate with and support the idea of an active cytotoxic CD8 or NK component. However, we were unable to detect NK cells using two different Abs. Furthermore, the fact that no Th profile (IL10, IL12 and IL13) was detectable correlated with the rarity of CD4 T-cells as observed by immunohistochemistry. The apparent differences in infiltration observed via immunohistochemistry in terms of the

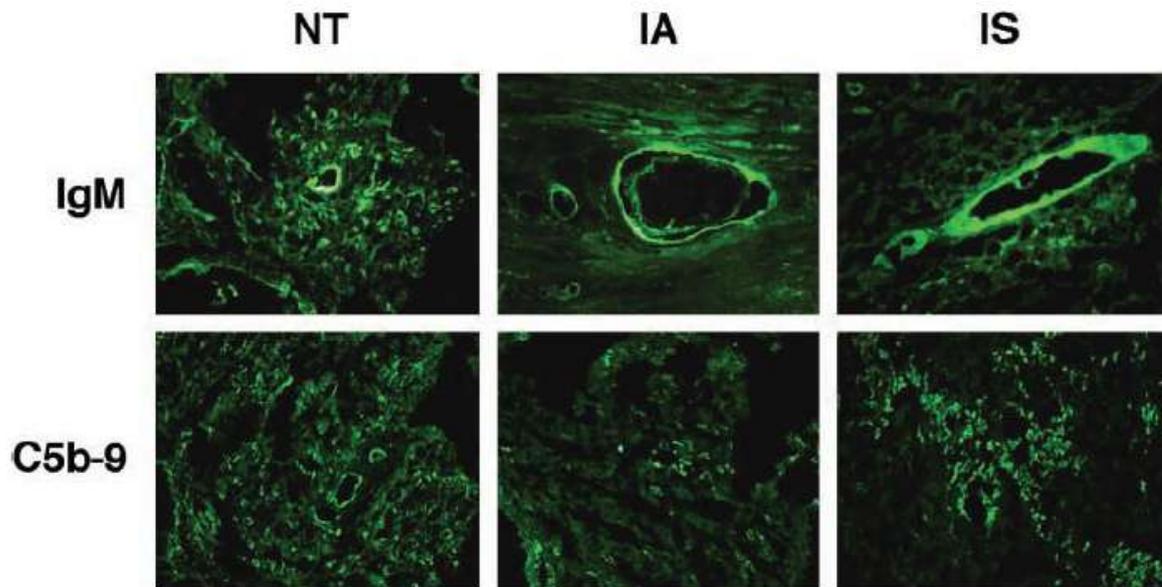


Fig. 5. IgM and membrane attack complex (MAC/C5b-9) deposition in hCD55 transgenic pig hearts undergoing DXR in non-treated (NT), α -Gal immunoadsorbed (IA) or immunosuppressed (IS) baboons. Magnification $\times 20$.

non-immunosuppressed and immunosuppressed groups were upheld by the decrease in transcription of numerous of these mediators including IL1- α , IFN- γ , TNF- α , granzyme B and CD80 in the immunosuppressed group compared with the non-immunosuppressed groups. Together, these findings suggest that DXR in non-immunosuppressed baboons is associated with an active pro-inflammatory and cytotoxic cellular infiltration, which can be efficiently overcome by a substantial IS even after a few weeks. This differential infiltration, together with the pro-inflammatory and cytotoxic phenotype of the infiltrating cells suggest that the presence of these cells is not simply an epiphenomenon, but these cells could contribute to DXR and thus also need to be controlled.

Our investigation into the coexisting Ab response in all groups by following anti-Gal Ab evolution in the serum of baboons as well as looking at intragraft Ab deposition and complement activation, demonstrated the significant Ab component of DXR. The fact that DXR was always associated with an increase in serum anti-Gal IgM but not IgG above pre-transplantation levels and that this correlated with an IgM but not IgG deposition at rejection is consistent with a persistent natural Ab response as opposed to an induced response in DXR in this model. In addition, complement activation was still observed in hCD55 organs suggesting the transgene effect became overwhelmed in time. This possible

fundamental role of IgM and complement activation not only in HAR but also in DXR in the transgenic pig to primate model has been evoked by others [4, 21] and ourselves [22].

As a whole, our findings point towards a clear role for infiltrating cells in DXR in the hCD55 transgenic pig to baboon model whose inhibition necessitates a strong IS. In the absence of IS, infiltrating cells likely create a considerable pro-inflammatory and cytotoxic environment via the transcription of various pro-inflammatory and cytolytic enzymes, which acts together with an Ab-mediated complement activation to precipitate a rapid rejection. In the case of IS it can be imagined that suppression of this cellular component helps the concomitant suppression of induced Ab production in delaying the rejection onset. Such inhibition of cellular infiltration via IS is particularly important considering that the cellular response by itself, as well as through its role in the induced Ab response, is likely to become fundamental with the advent of Gal knockout donor pigs [15, 16].

References

1. LIN SS, WEIDNER BC, BYRNE GW, et al. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J Clin Invest* 1998; 101: 1745.
2. COZZI E, WHITE DJ, et al. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1995; 1: 964.

3. LIN SS, HANAWAY MJ, GONZALEZ-STAWINSKI GV, et al. The role of anti-Gal α 1Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation* 2000; 70: 1667.
4. BUHLER L, YAMADA K, KITAMURA H, et al. Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal (α) 1Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation. *Transplantation* 2001; 72: 1743.
5. BROUARD S, GAGNE K, BLANCO G, SOULILLOU JP. T cell response in xenorecognition and xenografts: a review. *Hum Immunol* 1999; 60: 455.
6. OBATAKE M, KUSHIDA M, KIMMEL S, CLARKE ID, KIM PC. T cells are necessary and critical for xenograft rejection in new concordant cardiac xenotransplant model. *Transplantation* 1999; 67: 1480.
7. LIN Y, SOARES MP, SATO K, et al. Rejection of hamster cardiac xenografts by rat CD4⁺ or CD8⁺ T cells. *Transplant Proc* 1999; 31: 959.
8. BLAKELY ML, VAN DER WERF WJ, BERNDT MC, DALMASSO AP, BACH FH, HANCOCK WW. Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* 1994; 58: 1059.
9. LEVENTHAL JR, MATAS AJ, SUN LH, et al. The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model. *Transplantation* 1993; 56: 1.
10. CANDINAS D, BELLIVEAU S, KOYAMADA N, et al. T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation* 1996; 62: 1920.
11. LEVENTHAL JR, SAKIYALAK P, WITSON J, et al. The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates. *Transplantation* 1994; 57: 974.
12. KOBAYASHI T, TANIGUCHI S, NEETHLING FA, et al. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation* 1997; 64: 1255.
13. ITESCU S, KWIAKOWSKI P, ARTRIP JH, et al. Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period. *Hum Immunol* 1998; 59: 275.
14. COWAN PJ, AMINIAN A, BARLOW H, et al. Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* 2000; 69: 2504.
15. DAI Y, VAUGHT TD, BOONE J, et al. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 251.
16. LAI L, KOLBER-SIMONDS D, PARK KW, et al. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089.
17. ADAMS DH, CHEN RH, KADNER A, NAFICY S. Technique for heterotopic pig heart xenotransplantation in primates. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 265.
18. CHIRGWIN JM, PRZYBYLA AE, MACDONALD RJ, RUTTER WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294.
19. GAGNE K, BROUARD S, GIRAL M, et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000; 164: 1553.
20. BARREAU N, GODFRIN Y, BOUHOURS JF, et al. Interaction of anti-HLA antibodies with pig xenoantigens. *Transplantation* 2000; 69: 148.
21. VANGEROW B, HECKER JM, LORENZ R, et al. C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation* 2001; 8: 266.
22. ASHTON-CHESS J, ROUSSEL JC, BERNARD P, et al. The effect of immunoglobulin immunoadsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons. *Xenotransplantation* 2003 in press.

III.2.2.3 Discussion

L'infiltrat cellulaire était dans cette étude dépendant du protocole immunosuppresseur. Parmi les animaux qui ne recevaient pas d'immunosuppression, l'infiltrat était important, alors qu'il était quasi absent en cas d'immunosuppression. Cet infiltrat était formé principalement de macrophage avec quelques lymphocytes CD8+ alors que les cellules CD4+ et NK+ étaient rares ou inexistantes. Cet infiltrat s'accompagnait d'un environnement pro-inflammatoire et cytokinique détectable par PCR et bien sur les animaux qui avaient rejetés leur xénogreffons présentaient également une forte composante humorale dans leur rejet.

Plusieurs points méritent ainsi d'être discutés. En premier, l'absence de cellules CD4+ associée à l'absence d'IgG est le reflet de l'action de l'immunité innée dans le xénorejet. Par contre l'absence de CD16 confirme les résultats de notre première étude et suggère que les cellules NK pourraient ne pas jouer un rôle important dans un modèle discordant de xénotransplantation malgré les conclusions d'études *in vitro* retrouvant une forte cytotoxicité des cellules NK contre les cellules endothéliales porcines.

On pourrait également s'étonner de la quasi absence d'infiltrat cellulaire chez les animaux immunosupprimés alors qu'un infiltrat était observé dans les biopsies rénales de notre première étude où les animaux recevaient pourtant un traitement immunosuppresseur. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence. La première est l'anatomie très vasculaire du rein qui le rend plus susceptible à l'infiltration cellulaire que le cœur. Une autre explication pourrait être un niveau d'immunosuppression plus élevé dans cette étude avec une différence de cible thérapeutique pour la cyclosporine (1500ng/ml de cyclosporinémie versus 1000 ng/ml dans la première étude) et un rythme d'administration différent pour le MMF (35/kg deux fois par jour versus 70mg/kg/j en une seule prise). De plus en dehors de leur activité anti-proliférative, la cyclosporine et le MMF ont démontré qu'ils pouvaient diminuer l'infiltrat cellulaire par les macrophages après ischémie- reperfusion (Ysebaert et al. 2003) ou en cas d'allogreffe de rein de rats (Heemann et al. 1996). Il a été également démontré que le MMF inhibait l'interaction des monocytes avec les cellules endothéliales en interférant avec les molécules d'adhésion (Glomsda et al. 2003). Dans une série de xénogreffes rénales avec des macaques et un traitement immunosuppresseur identique à notre première étude, Cozzi et al. (Cozzi et al. 2003) ont retrouvé également que l'infiltrat cellulaire était essentiellement constitué de cellules CD8+ associées à des macrophages et des lymphocytes B.

Le profil évolutif des Ac anti-Gal au cours de cette série de xénogreffe cardiaque montrait comme dans notre première étude que les IA n'étaient pas la stratégie idéale pour le contrôle des xénorejets. En effet, les IA répétitives pré-transplantation permettaient de diminuer significativement le taux des Ac antiGal mais étaient incapables d'en prévenir le retour. De plus, lorsque le xénogreffon était implanté, le niveau des Ac remontait pour être supérieur au niveau initial à partir du 3^{ème} jour. Les IA réalisées aux 3 et 5 jours s'accompagnaient d'un rebond différé et substantiel du niveau des Ac, surtout au 5^{ème} jour, date à laquelle survenait le rejet. L'augmentation des IgM anti-Gal constatée au moment du rejet chez tous les animaux sans augmentation des IgG ainsi que les dépôts d'IgM et de C5b-9 observés au sein des biopsies confirmaient

que la réponse anti-Gal était une réponse provenant de l'immunité innée intéressant des Ac pré-formés et non induits aboutissant à une activation du complément même en cas d'organes transgéniques pour des molécules régulatrices du complément.

Finalement, bien que nos résultats confirmaient l'existence une participation cellulaire au rejet vasculaire aigu, la réponse humorale restait le principal acteur du RVA et semblait être non contrôlable par un traitement par IA ou par un traitement immunosuppresseur comportant de la cyclophosphamide.

III.3 CONCLUSION PRELIMINAIRE

Ces modèles sur grands animaux ont donc été une réelle opportunité d'évaluer à un stade pré-clinique la faisabilité de xénotransplantations chez l'homme. Les résultats de ces deux études, en phase avec ceux de la littérature, montraient que la barrière immunologique d'espèce représentée par l'existence d'Ac anti-Gal préformés, était si importante qu'elle rendait la greffe d'organe porcine encore non concevable chez l'homme à ce stade de nos connaissances. La reconnaissance de l'épitope Gal par ces anticorps préformés déclenchait un rejet puissant dépendant de l'immunité innée dont le contrôle était quasiment impossible tant que persistera cette barrière antigénique d'espèce. Ainsi au début des années 2000, les espoirs étaient de nouveau tournés vers la transgénèse pour obtenir des porcs Gal-KO et transgéniques pour d'autres transgènes protecteurs. Seuls quelques laboratoires au monde possédaient cette technologie. Le laboratoire d'immunologie du Pr d'Apice à Melbourne (Australie) faisait parti des ces structures habitées à la transgénèse chez les petits et grands animaux pour des programmes d'allo et surtout de xénotransplantation (Nottle et al. 2002; Cowan et al. 2003; Harrison et al. 2004; Godwin et al. 2006; d'Apice et al. 2007; Nottle et al. 2007). Parallèlement à ce programme d'obtention d'animaux Gal KO, cette équipe était également spécialisée dans l'étude des troubles de l'hémostase liés à une incompatibilité moléculaire d'espèce entre l'homme et le porc. C'est donc avec beaucoup d'honneur et de plaisir que j'ai pu travailler dans ce laboratoire de recherche sous la tutelle du Pr Peter Cowan. Mon sujet était d'étudier l'incompatibilité de la voie de la protéine C dans une combinaison porc sur primate et d'en évaluer les solutions en passant par un modèle de souris transgénique.

IV. PROJET II: Etude *in vitro* des troubles de la coagulation en Xénotransplantation : Rôle du complexe Thrombine-Thrombomoduline dans la voie de la protéine C dans une combinaison porc sur primate

IV.1 PREFACE

Les xéno-rejets ont toujours été marqués par d'importants troubles de la coagulation si bien que plusieurs auteurs ont évoqués qu'il pouvait exister une incompatibilité moléculaire d'espèce au niveau des mécanismes régulateurs de l'hémostase. En effet, Kopp et Siegel de l'équipe du Pr Robson à Boston (Siegel et al. 1997; Kopp et al. 1998), avaient constaté *in vitro* que les cellules endothéliales porcines étaient incapables de fixer la thrombine et d'activer la protéine C humaine. Si tel était le cas *in vivo*, une inactivation de cette voie anticoagulante pourrait se traduire par un risque de thrombose du xéno greffon. Au vu des complications thrombotiques sévères rencontrées lors de déficits complets de la voie de la protéine C, il était primordial de confirmer l'existence de cette incompatibilité en xénotransplantation et d'évaluer les possibilités thérapeutiques pouvant la surmonter. Les travaux de Kopp et Siegel (Siegel et al. 1997; Kopp et al. 1998) méritaient en effet d'être approfondis car l'expression de la TM porcine n'avait pas été vérifiée au niveau des cellules endothéliales aortiques et aucun mécanisme n'avait été proposé pour expliquer la physiopathologie de cette barrière moléculaire d'espèce. Mon travail a donc consisté dans un premier temps à séquencer et cloner l'ADNc de la TM porcine pour ensuite l'exprimer dans un modèle cellulaire afin d'explorer la fonctionnalité de la TM porcine dans un contexte de xénotransplantation. Pour mieux comprendre la physiopathologie de cette incompatibilité d'espèce, des TM « hybrides » entre l'homme et le porc ont été créées pour rechercher au niveau de quels domaines se situaient l'incompatibilité avec la thrombine et la PC humaines. Comme la TM est également le co-facteur d'activation de TAFI par la thrombine, j'ai dans un second temps évalué cette voie inhibitrice de la fibrinolyse dans un contexte de xénotransplantation.

IV.2 CLONAGE ET CARACTERISATION DE L'ADNC DU GENE PORCIN DE LA THROMBOMODULINE

IV.2.1 SITES DE LIAISONS DES AMORCES DEGENEREEES

Plusieurs amorces dégénérées ont été conçues pour l'amplification de l'ADNc de la thrombomoduline porcine. Leurs sites de fixation sont représentés sur la Figure 17.

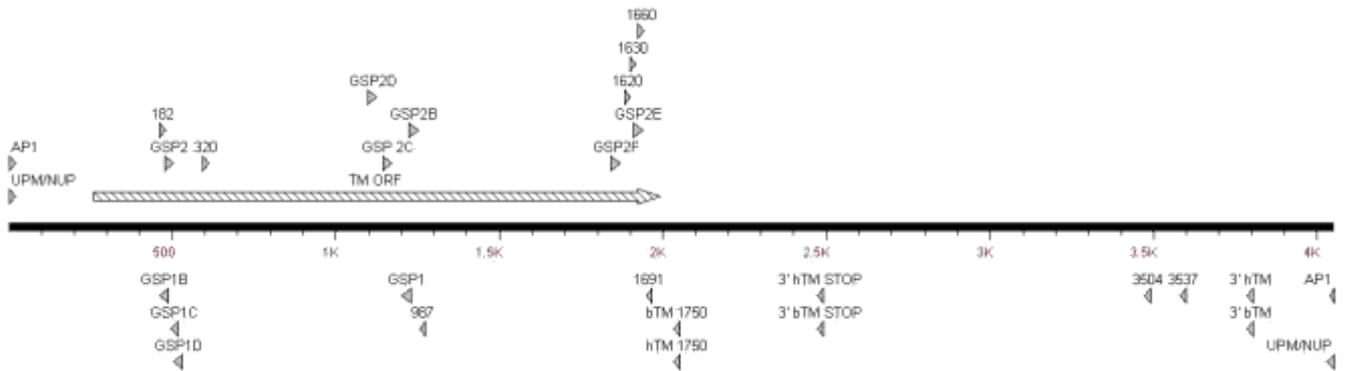


Figure 17: Sites de fixation des amorces pour l'amplification théorique de l'ADNc codant pour la TM porcine. Les amorces « sens » sont situées au-dessus de l'ADNc et les amorces « anti-sens » en dessous. La longueur du cadre de lecture et de la « partie non codante » est un consensus entre la séquence d'ADNc codant pour la TM bovine (Jackman et al. 1986), la TM humaine (Jackman et al. 1987; Suzuki et al. 1987; Wen et al. 1987), la TM murine (Dittman et al. 1988; Dittman et al. 1989), la TM de lapin (Deming et al. 2003) et la TM de rat (Wang et al. 1999).

IV.2.2 AMPLIFICATION PREMIERE D'UN FRAGMENT DE LA TM PORCINE

La première tentative d'isolement de la TM porcine à partir d'une librairie d'ADNc obtenue de cellules SVAP fut un échec en utilisant les combinaisons d'amorces suivantes 5' TM 182 (182), 5' TM 195 (195), 3' TM 683 (683) et 3' TM 1691 (1691) avec la *Taq* polymérase et différents programmes PCR. Dans l'hypothèse où ces cellules n'exprimaient pas la TM, une librairie à ADNc a été construite à partir de tissu pulmonaire porcine. De même, en raison de la forte proportion en résidus GC dans le cadre de lecture des différentes séquences d'ADNc codant pour la TM, le système d'amplification Failsafe™ fut utilisé pour surmonter ce problème de température. En employant les amorces 182 et 987 et les 12 « cocktails » du système Failsafe™, une bande de taille attendue a été amplifiée avec les cocktails D, E, F, G, H, I et K à partir d'ADNc porcine pulmonaire (Figure 18) et d'ADNc humain provenant de cellules EA hy926 (Figure 19).

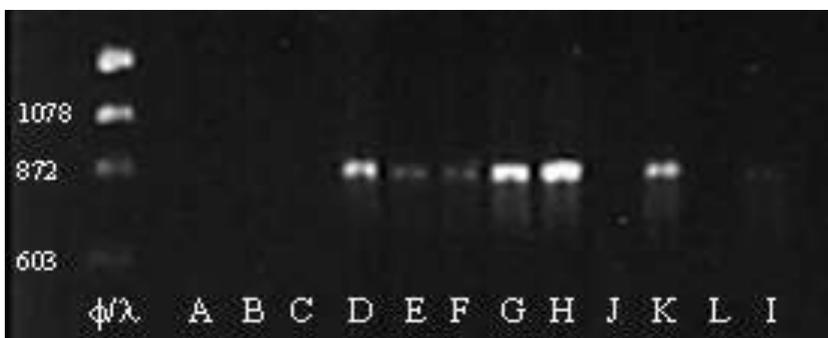


Figure 18: Amplification d'un fragment d'ADNc de TM de taille attendue en utilisant différents cocktails (A à I) du système Failsafe™ et les amorces 182 et 987.

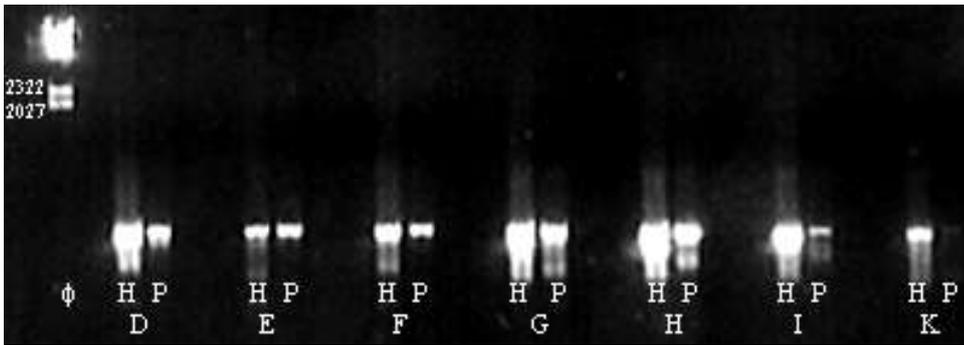


Figure 19 : Amplification d'un fragment d'ADNc de la TM porcine par le système Failsafe (cocktails D à K) avec les amorces 182 et 987 et le contrôle positif humain correspondant (H = humain (ADNc provenant de cellules EAhy926), P = porcine (poumon total)).

L'amplicon obtenu à partir du mix PCR du cocktail E avec les amorces 182/987 a été lié dans le vecteur pGEM-T Easy pour amplification et séquençage. Le niveau d'homologie était de (e-value) 7.9×10^{-46} pour la TM humaine avec 77% d'identité concernant les 830 pb (641/830).

Avec la certitude qu'il s'agissait d'un fragment de la TM porcine, les mêmes conditions de PCR et l'emploi du système Failsafe™ ont permis de confirmer l'expression de la TM dans les cellules SVAP (Figure 20).

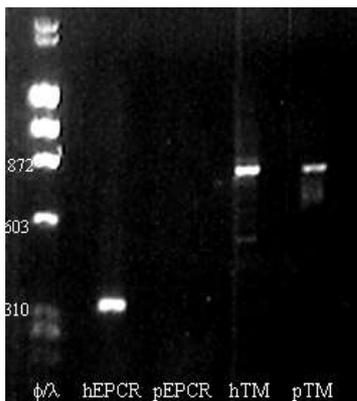


Figure 20 : Expression de l'ARNm de la TM porcine dans les cellules SVAPs. (amorces 182 and 987). (4^{ème} ligne à droite). Contrôle positif avec de l'ADNc de cellules EAhy926.

IV.2.3 AMPLIFICATION DES EXTREMITES DE L'ADNc CODANT POUR LA TM PORCINE

IV.2.3.1 Amplification par le système Marathon RACE et SMART Race amplification

Des amorces spécifiques (GPSs) ont été conçues dans la région générée entre les amorces 182 et 987. Deux premiers GPSs ont été ainsi élaborés, GSP1 pour l'amplification RACE 5' et GSP2 pour RACE 3'. Malgré plusieurs programmes PCR et systèmes enzymatiques utilisés (Taq, Expand system, Failsafe system, Advantage cDNA system, Advantage 2 system et Advantage 2-GC system) avec plusieurs concentrations de GC, l'amplification des extrémités 5' et 3' fut impossible avec le système Marathon RACE.

Le système SMART RACE a été également utilisé pour l'amplification des extrémités de la TM porcine en testant plusieurs programmes PCR et plusieurs polymérases issues des kits Expand, Advantage 2, Advantage

2-GC, Advantage cDNA, Taq et Failsafe systems. Ces conditions n'ont pas permis d'obtenir une amplification avec les amorces TGSP1 et TGSP2.

De nouvelles amorces furent créées, cette fois-ci situées dans des séquences connues comme étant communes entre les espèces et situées au niveau des extrémités de l'ADNc : TGSP1B, TGSP1C, TGSP1D, TGSP2B, TGSP2C et TGSP2D. Ces amorces ont également échoué à amplifier les extrémités de la TM malgré l'emploi de plusieurs systèmes enzymatiques et de programmes PCR. D'autres tentatives utilisant les amorces 182 et 320 avec TGSP2, TGSP2C et TGSP2D et le système Failsafe ont permis d'amplifier de petits fragments d'ADN de taille inappropriée.

IV.2.3.2 Amplification à partir des zones communes non-spécifiques d'espèces

En raison de l'impossibilité d'amplifier les extrémités 5' et 3' de l'ADNc codant pour la TM porcine selon la méthode RACE, il fut décidé d'abandonner cette méthode pour revenir à une amplification avec des amorces dégénérées.

D'autres amorces dégénérées ont été alors créées dans des séquences conservées entre espèces et situées dans l'extrémité 3' du premier fragment séquencé. L'utilisation de l'amorce dégénérée 1691 avec TGSP2D et le kit Failsafe avec le cocktail G a permis d'obtenir un fragment de longueur attendue à partir d'ADNc issu de poumon porcine (Figure 21).

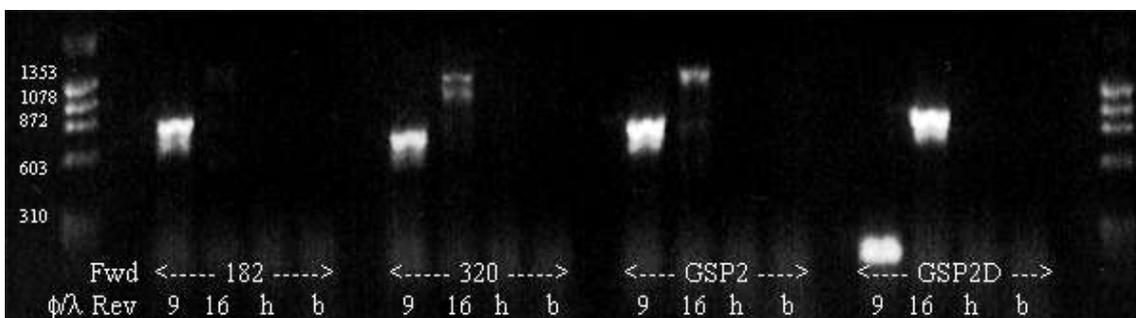


Figure 21: Fragments de la TM porcine générés selon différentes combinaison d'amorce : 182, 320, GSP2, GSP2D avec 987, 1691, 3'hUTR 1750 et 3'bUTR (9 = amorce 987, 16 = 1691, h = 3' hUTR 1750, b = 3'bUTR 1750).

Le séquençage de ce fragment avait une « E-value » de 3.4×10^{-85} pour la TM bovine, avec 84% d'homologie sur 590 paires de bases. Cela représentait un nouveau fragment de la TM porcine d'approximativement 800 pb, augmentant ainsi la connaissance du gène depuis l'amorce 182 à l'amorce 1691 (Figure 17).

Deux autres amorces TGSPs désignées TGSP2E et TGSP2F furent alors conçues dans l'extrémité 3' de cette nouvelle séquence pour une amplification par 3'RACE. Cela avait l'avantage théorique de générer des fragments moins grand de 800 pb que ceux générés avec TGSP2B, TGSP2C et TGSP2D et moins grand de 1.6 kb que ceux générer avec TGSP2 (Figure 17). Plusieurs librairies ont alors été réalisées en utilisant des polyA+ spléniques et de l'ADNc pulmonaire porcine avec les amorces 3' TGSPs et UPM ou NUP en utilisant

différents programme PCR et la Taq polymérase avec différents cocktails du kit Failsafe. Bien que plusieurs bandes aient été générées, leurs tailles étaient toutes beaucoup plus petite que la longueur attendue.

Après ce dernier échec d'amplification, d'autres amorces furent conçues vers la région 3' de la TM porcine. Trois amorces sens supplémentaires ont été générées : 5'TM 1620 (1620), 5'TM 1630 (1630) et 5'TM 1660 (1660) (Figure 17) ainsi que plusieurs amorces anti-sens situées en aval du codon stop pour l'amplification des pb restantes de l'extrémité 3' du cadre de lecture : 3'bTM STOP et 3'hTM STOP, tous deux situés approximativement 500 pb en aval du codon stop et les amorces 3'bTM et 3'hTM, situées approximativement 200 pb en amont de la queue polyA+ de la TM bovine et humaine. Deux autres amorces dégénérées anti-sens ont été conçues à environ 1.5 kpb du codon stop et à partir de l'homologie de séquence entre espèces : 3'TM 3504 (3504) et 3'TM 3537 (3537) (Figure 17). La création d'amorce pour l'amplification de l'extrémité 5' de la TM ne fut pas possible en raison du manque d'homologie de séquence entre espèce dans cette région et de l'absence de séquençage de l'extrémité 5' de la TM bovine qui est l'espèce la plus proche du porc.

La combinaison de ces amorces en utilisant de l'ADNc pulmonaire et du SMART spleen polyA+ cDNA avec diverses concentrations de Taq polymérase a permis l'amplification d'une fine bande avec la paire d'amorce 1660/NUP. L'amplification par PCR nichée avec les amorces 1620 ou 1630 avec NUP fut impossible, suggérant ainsi qu'il s'agissait d'un résultat faussement positif.

Finalement, l'utilisation des amorces 1620 et 1630 avec 3'hTM STOP et le cocktail D du kit Failsafe permit l'amplification d'un fragment de plus de 2 kpb (Figure 22).

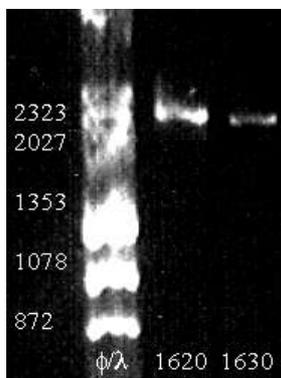


Figure 22 : Amplicon contenant le codon STOP de l'ADNc de la TM porcine obtenu avec les amorces 1620/3'hTM STOP et 1630/3'bTM.

Après séquençage, l'analyse de ce fragment permis de retrouver le codon STOP et son homologie était de 91% pour la TM bovine sur 43/47 pb.

L'extrémité 5' a été finalement obtenue en utilisant d'autres primers anti-sens pTM-RACE1 et pTM-RACE2 après une PCR nichée.

IV.2.4 RESUME DES DIFFERENTS AMPLICONS DE LA TM PORCINE

Au final, un fragment d'ADNc de 3648 pb correspondant au gène de la TM porcine a été isolé à partir d'ARN de poumon de porc par une combinaison de PCR utilisant des amorces dégénérées et/ou la technique RACE. Les ADNc de la TM humaine (Jackman et al. 1987; Suzuki et al. 1987; Wen et al. 1987), murine (Dittman et al.

1988), de lapin (Deming et al. 2003) et de rat (Wang et al. 1999) ont tous un cadre de lecture comprenant 1700 à 1750 pb. Selon nos résultats, le cadre de lecture de la TM porcine comprend 1737 pb.

IV.2.5 ANALYSE ET COMPARAISON DES SEQUENCES POUR LA TM

IV.2.5.1 Séquence nucléique et protéinique de la TM porcine

Sur les 3648 pb isolées, les 95 premières pb correspondent à la région 5' non traduite, les 1737 pb suivantes au cadre de lecture et les 1816 pb restantes à la région 3' (Figure 23).

```

M L R V L L L G V L A P A G L G F P V L F E A Q      8
ATGCTCCGCTTCTGCTCCTTGGAGTACTGGCCCCCGCCGCTCGGGTCCCGTCTCCCTGAAGCGCAG 72
P L Q S Q C V E H D C F A L F R G P A T F L T A    32
CCCCTAGGACGACGAGTGGCTGGAGCATGACTGCTTTGGCGCTCTTCGGGGCCCGCGACCTTCTCACTGCC 144
S Q A C E H L Q G H L M T V R S S V A A E V I S    56
AGCCAGGCTTGGAGCATCTACAGGGCCACTTGATGACCGTGGCTCCTCGSTGGCAGCAGAGTCACTCTCC 216
L L L S G E G D G F R L W I G L Q L F R D C V E    80
CTGCTACTGAGCGGCGAAGCGATGGCCCCGCGCTCTGGATAGGCTGCGAGCTCCCGCGGATTGGTTCGAG 288
P R H R G A L R G F Q W V T G D N H T S Y S M W    104
CCGCGCACCCCGSAGCCTTCCGCGGCTTCCAGTGGTTACAGGGGCAACCCACACCAGCTACAGCATGTGG 360
A R P R G D E E P I C G T L C V A V S A A G A P    128
GGCGGGCCACGGGGCGACGAGGAGCCCATCTGCGGTACGCTGFGCGTGGCGTCTCGGGCGCAGGGGCCCT 432
V P G E P A W E E Q C E A E A D G F L C E F H     152
GTACCGGGAGAGCCAGCCTGGGAGGAGCAGCAGTGCAGAGCGAGGAGCAGCGCTTCTCTGCGAGTTCAC 504
F P A S C Q P L A V K S D A A E A A S F B I T Y    176
TTCCCGCCTCTGCGAGCGCTGGCTGTGAAGTCCGACCGCGCGGAGGCGAGCCAGCTTCTCCATCACCTAC 576
E T P F G A R G A D F Q A L P V G S S V A V T P    200
AGCACTCCCTTCCGGCCCTGTCGCGCGGACTTCCAGGCGCTGCCGTTGGGCGAGCTCGGTCCCGTGAAGCCC 648
L G V E L E C A V W D G E A Q A R W V R R A P G    224
CTTGGGTTGAGTGGAGTGGCGGTGGTGGCCCGGGAGGCCAGGCGCGTGGGTCCGGGAGGGCGCGGGT 720
A W A C G V E N G G C Q H A C N G E A G E S R C    248
GCCTGGGCTGCGGCGTTGAGAACGGCGGCTGCCAGCACGCGTGCACCGGGAGCGCGGGGAGTGGCGCTGC 792
L C P A D A A L Q E D G R S C E A P A E H P C H    272
CTCTGCCCGCGAGCCCGCTGCGAGGAGTGGCGCTTCTTGGAGGCGCCGCGGAGCACCCGTGCCAC 864
R L C E H I C F H D P L D A P T N Y T C F C E A    296
CGACTCTGGAGCATATCTGCTTCCACGACCCCTTGGACGCGCCCACTACACATGCTTTTGGAGGGCG 936
G Y R L A A D G H E C E D V D D C A E V P S P C    320
GGCTACCGCTGGCTCCGATGGCGATCGGTGGAGGACGTGGACGACTGGCAGAGGTGCCAGTCCGTTGC 1008
P Q S C V N T Q G G F Q C H C L P N Y E L V D G    344
CCGACAGCTGTGTCAAACACAGGGCGGGTTCAGTGCCTGCTTGCCTCACTACGAGCTCGTGGACGGC 1080
E C V E P V D P G C T D C E Y E C Q V V G R T     368
GAGTGGTAGAGCCCGTGGACCATGCTTCCGCAACGACTGCGAGTACGAGTCCAGGTGGTGGCGCTACT 1152
G Y E C V C A E G F A P V P H A P H R C Q M P C    392
GGCTACCGCTGGCTCTGCGCGGAGGCTTCCGCGCCGCTCCCGCACCGCCCGCACAGTGCAGATGTTCTGC 1224
N Q T S C P A D C D P N K Q D S C Q C P D G Y I    416
AACCAGACTTCTGTCCTCGGACTCGACCCCAACAGCAGGACAGCTGCCAGTGCCTGACGGCTACATC 1296
L D E G S I C T D I D E C N N G Y C P G E C R N    440
CTGGACGAGGGCTCCATATGCGACATGCGAGTGCACCAACCGCTACTGCCCCGGCGAGTGCAGAAAC 1368
L F G T Y E C I C G P Q L D L A G H A G T D C D     464
CTCCCGGACCTATGAGTGCATCTGCGGGCCCGAGCTGGACCTCGCGGTCACGCGGGCACAGACTGGAC 1440
P I Q E N S R E Q G G G D E D V G S G E P A V S    488
CCCATCCAGAGAACAGCCCGAGCAGGGCGGGCGGACGAGGACGTTGGCTCTGGAGAGCCTGGCGTGGAC 1512
P T P G T T A R P S P A R P L H S G V L A Q I S     512
CCGACTCTGGCACCCACCGCTGCGCCCTCGCCCGCCCGCTGCACTTGGGGCTGCTGGCTGGCATCTCC 1584
I A T L S L V V A L L A L L C H L R K K Q G T S     536
ATCGCACCCCTGTCTCTGGTGGTGGCGCTTTTGGCGCTTCTGTGTACCTGCGCAAGAAGCAAGGCACCTCA 1656
R A E L E Y K C G V P A K E V V L Q H V G Q M P    560
AGGGCCGAGCTGGAGTACAGTCCGCGCTCCAGCCCAAGGAGTGGTGTGTCAGCAGCTGGGGCAGATGCGCT 1728
Q K L *                                             563
CAGAAACTCTAA.                                     1740

```

Figure 23 : Séquences nucléique et protéinique attendue de la TM porcine. La séquence protéique est située au-dessus de la séquence nucléique. La séquence du peptide signal comprenant 16 résidus est suivie par le domaine riche en lectine (en italique), une région hydrophobique (soulignée par des pointillées), six domaines EGF-like (en double soulignage), la région riche en sérine- thréonine (entre les flèches), le domaine transmembranaire (en soulignage simple) puis par la queue intra-cytoplasmique (résidu de 34 AA). Les sites potentiels de N-glycosylation sont encadrés. La séquence nucléique de la TM porcine est référencée dans GenBank au numéro EF692640.

Après séquençage complet, le cadre de lecture a pu être ré-amplifié de manière identique en utilisant comme substrat soit de l'ADNc ou soit l'ADN génomique. Cela suggèrait que le gène porcine, tout comme ses homologues humain et murin, ne comporte pas d'intron (Jackman et al. 1987).

La séquence protéique de la TM porcine a été calculée après déduction de la séquence nucléique. Elle comporte 579 d'acides aminés ayant les caractéristiques structurales en module de la TM des autres espèces mammifères séquencées avec un domaine riche en lectine, 6 modules EGF-like, une région riche en sérine- thréonine, un domaine transmembranaire et une queue intra-cytoplasmique.

IV.2.5.2 Homologies de la TM entre espèces mammifères

Le programme EMBOSS-align a été utilisé pour aligner et comparer l'homologie de la TM porcine avec la TM humaine ainsi que pour la TM murine, canine, lapine et de rat.

L'alignement avec les 575 résidus humains, a révélé une homologie de 69,1% avec la TM porcine avec des valeurs d'identités pour les différents domaines de la TM comprises entre 46,5% pour la région riche en sérine- thréonine à 82,6% pour le domaine transmembranaire (Tableau 8).

Domain	Human	Bovine	Canine	Rabbit	Rat	Mouse
Lectin-like	71.4%	72.7%	73.4%	71.4%	65.6%	68.2%
Hydrophobic	66.7%	72.5%	71.0%	68.1%	49.3%	58.0%
EGF1	72.2%	83.3%	77.8%	69.4%	59.5%	66.7%
EGF2	62.2%	64.9%	56.8%	59.5%	56.8%	56.8%
EGF3	79.4%	79.4%	70.6%	76.5%	64.7%	67.7%
EGF4	66.7%	66.7%	75.0%	69.4%	58.3%	61.1%
EGF5	78.1%	71.9%	75.0%	75.0%	78.1%	71.9%
EGF6	65.7%	62.9%	71.4%	68.6%	62.9%	57.1%
Ser/thr-rich	46.5%	62.8%	51.2%	46.5%	41.9%	51.2%
Transmembrane	82.6%	91.3%	91.3%	87.0%	91.3%	91.3%
Cytoplasmic	61.8%	70.6%	82.4%	58.8%	67.6%	64.7%

Tableau 8 : Niveaux d'homologies de la TM porcine avec la TM des autres espèces mammifères (exprimés en % d'identités d'acides aminés)

L'analyse comparative des domaines EGF-like a montré que le domaine EGF-5 présentait le degré d'homologie le plus élevé entre les 7 espèces mammifères (Tableau 8). L'alignement des séquences aminées entre l'homme et le porc des domaines impliqués dans la liaison avec la thrombine (EGF56), la protéine C (EGF4) et TAFI (EGF3) est représentée dans la Figure 24 . A l'exception de la Glutamine en position 408 dans le domaine EGF5 (Gln-410 dans la TM porcine), tous les résidus de la TM humaine ayant un rôle important

dans la liaison avec la thrombine et l'activation de la protéine C (Nagashima et al. 1993; Fuentes-Prior et al. 2000; Wood et al. 2000) et TAFI (Wang et al. 2000) étaient identiques ou substitutivement conservés. Sur les 2 sites de N-glycosylation dans les domaines EGF4 et EGF5 de la TM humaine, seul le dernier était conservé dans la TM porcine. Le fragment de chondroïtine sulfate attaché à la région riche en sérine/thréonine était également conservé dans la molécule porcine (Gerlitz et al. 1993).

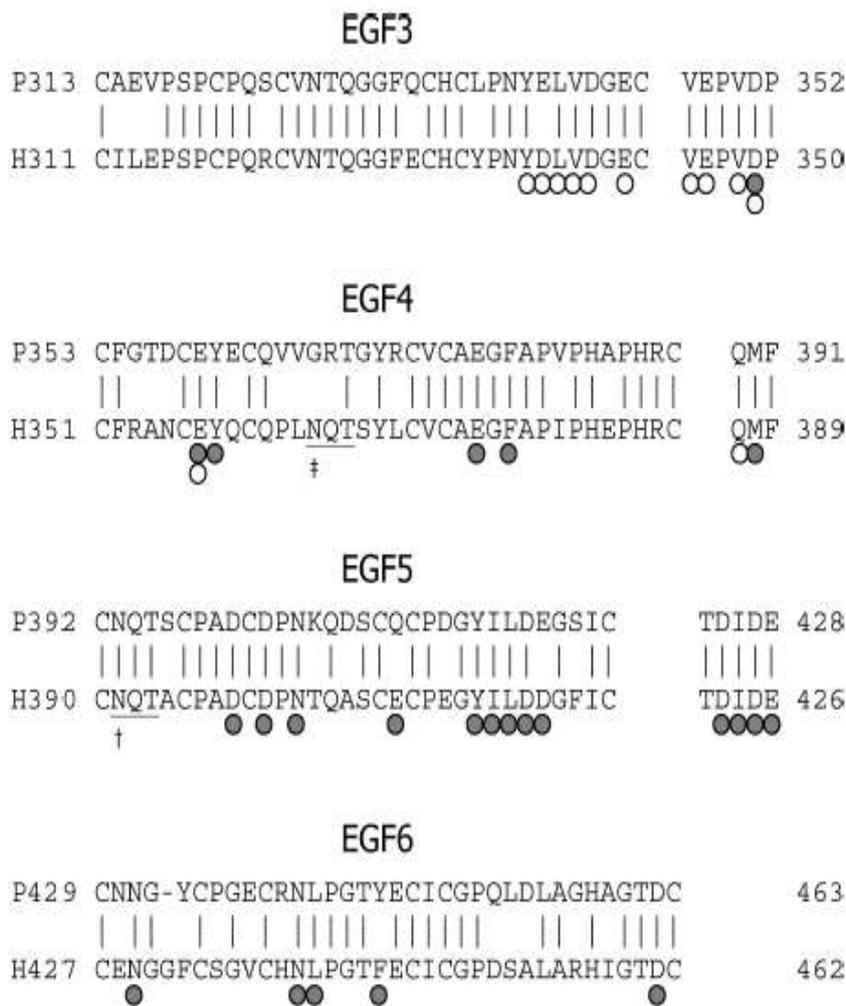


Figure 24 : Analyse comparatives des domaines EGF3 à EGF6. Les Résidus fonctionnellement important des domaines EGF3 à EGF6 pour l'activation de la protéine C ou de TAFI sont hautement conservés dans la TM porcine. Les nombres représentent la position des AA dans la protéine mature. Les résidus de la TM humaine ayant montrés un rôle fonctionnel important sont indiqués par un cercle sous la séquence. Les sites de N-glycosylation sont soulignés.

- Site important pour l'activation de la PC
- Site important pour l'activation de TAFI
- ‡ Site complètement glycosylé
- † Site incomplètement glycosylé

L'analyse comparative de l'ensemble de la séquence protéique de la TM porcine avec la séquence de la TM humaine et de lapin a démontré que la TM porcine partageait la plus grande homologie avec les molécules humaine et de lapin (Tableau 9).

		pTM	hTM	mTM	rTM
hTM	Identity	69.2%			
	Similarity	77.6%			
	Gaps	2.4%			
mTM	Identity	64.4%	67.3%		
	Similarity	74.1%	76.1%		
	Gaps	2.8%	2.4%		
rTM	Identity	62.6%	65.9%	85.3%	
	Similarity	72.1%	75.0%	90.0%	
	Gaps	2.4%	2.0%	0.4%	
oTM	Identity	69.1%	71.9%	70.5%	67.8%
	Similarity	76.2%	77.7%	77.7%	75.3%
	Gaps	2.2%	3.8%	1.8%	3.4%

Tableau 9 : Niveaux d'homologie de la TM entre différents mammifères. (hTM : TM humaine, mTM : TM de souris, rTM : TM de rat, oTM : Tm de lapin)

Le niveau d'homologie le plus faible était pour les deux mammifères murins. L'évolution phylogénique pour la molécule de TM est représentée par la Figure 25.

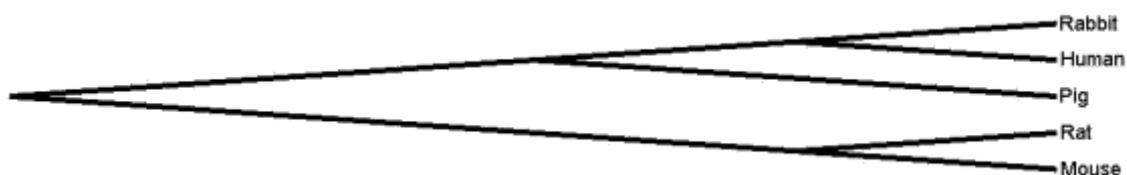


Figure 25 : Evolution phylogénique de la TM.

IV.3 EXPRESSION ET ACTIVITE DE LA TM PORCINE ET HUMAINE

IV.3.1 EXPRESSION DE LA TM PORCINE

IV.3.1.1 Détection par FACS de la TM porcine

L'ADNc de la TM porcine a été cloné et intégré dans deux vecteurs plasmidiques (pBOS et pIRES) afin d'obtenir une expression cellulaire de la molécule porcine après électroporation. En utilisant plusieurs Ac monoclonaux primaires dirigés contre la TM humaine (Ac 1A4 anti TM humaine fourni gracieusement par le Dr Philip Bird, Monash University, Australia et Ac CD 141 anti-TM humaine, Chemicon, Australia), il a été impossible de confirmer l'expression cellulaire par FACS de la TM porcine (pTM) par rapport à la TM humaine (Figure 26).

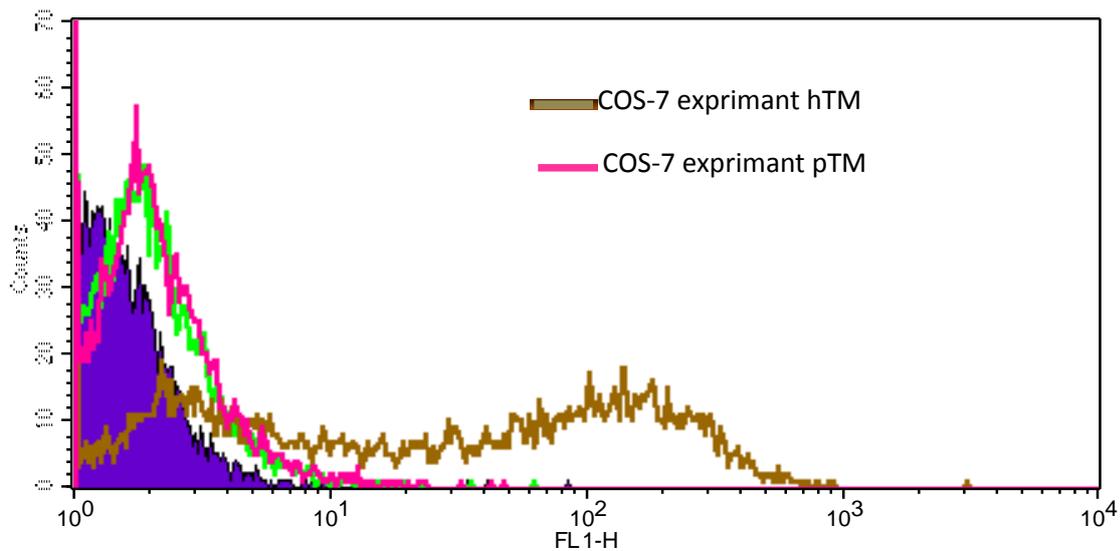


Figure 26 : Détection par FACS de l'expression de la TM porcine avec l'Ac anti-TM 1A4 après transfection de cellules COS-7 par le vecteur pBOS-pTM. Aucune détection avec l'Ac 1A4 n'a pu être possible par rapport à la molécule humaine, ainsi qu'avec l'Ac CD 141 (ligne verte).

IV.3.1.2 Création et détection de la TM porcine avec un épitope FLAG

En raison de l'absence d'Ac reconnaissant la TM porcine, nous avons décidé d'intégrer un épitope « tag » au niveau du domaine extracellulaire riche en lectine afin de ne pas modifier la fonctionnalité de la molécule (Figure 27) en liant l'ADNc de la TM porcine dans le vecteur pBOS-Flag contenant l'épitope

FLAG, qui est un épitope facilement détectable. La TM humaine a été également liée à ce vecteur afin de pouvoir comparer les deux molécules de TM dans les mêmes conditions.

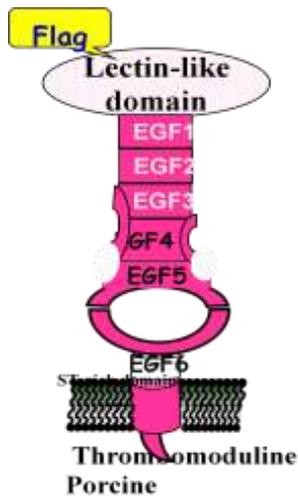


Figure 27 : Représentation schématique de la TM porcine dotée d'un épitope FLAG pour permettre la détection de la molécule.

La transfection de cellules COS-7 par les vecteurs pBOS-Flag pTM et pBOS-Flag hTM a permis une forte et similaire expression des 2 molécules de TM par FACS et Western blot en utilisant un Ac anti-FLAG fluorescent KM5-1C5 (anti-Flag, WEHI Monoclonal Laboratory, Bundoora, Australia) (Figure 28). Comme attendu, le marquage avec l'Ac monoclonal 1A4 détectait la molécule humaine mais pas la molécule porcine.

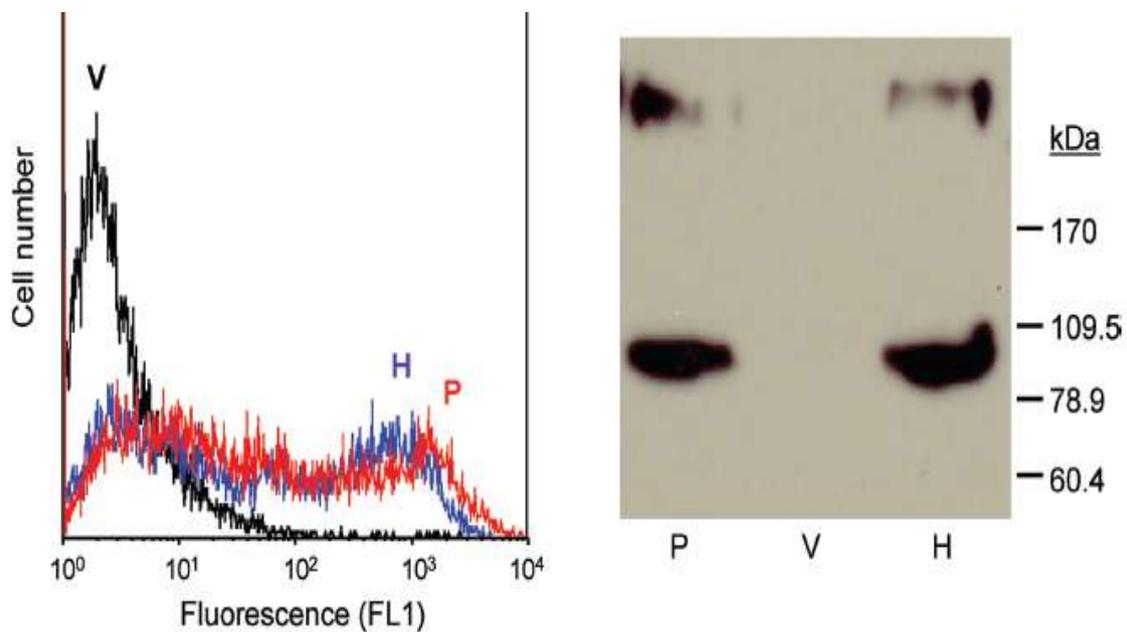


Figure 28 : Détection des TM-flag humaine et porcine par FACS (à gauche) et par Western Blot (à Droite) à partir de cellules COS-7 transfectées avec pBos-hTM-Flag (H) , pBos-pTM-Flag (P) et vecteur seul (V). L'expression était similaire entre les deux espèces par FACS et par Western Blot.

La première étape de l'activation de la PC par le complexe thrombine- TM étant la fixation de la thrombine sur la TM, nous avons d'abord essayé de mettre au point plusieurs méthodes étudiant la liaison de la thrombine avec la TM.

IV.3.2.1 Etude de la liaison Thrombine-TM par FACS:

En raison de la forte affinité de la thrombine pour la TM, nous avons tenté de mettre au point un modèle cellulaire détectant la liaison de la thrombine à la TM par FACS. Nous avons dans un premier temps incubé de la thrombine humaine avec des cellules COS-7 exprimant la TM humaine ou avec des cellules Eahy926 exprimant spontanément la TM humaine. Un Ac polyclonal anti-thrombine humaine de chèvre (R&D systems) était ensuite ajouté puis un second Ac biotinylé anti-chèvre FITC pour rechercher la présence par FACS de thrombine sur les cellules (Figure 29). Malgré différentes conditions expérimentales concernant la concentration de la thrombine (0.1 à 1U/ml) et de l'Ac anti-thrombine (3µg à 15 µg), de température (température ambiante ou à 37°C) ou de l'emploi de différents tampons (PBS enrichi en calcium, HBSS, HEPES avec FCS ...), il a été impossible de détecter la thrombine fixée sur les cellules alors que l'expression de la TM-flag avait été préalablement confirmée. L'ajout d'une étape de fixation cellulaire avec du paraformaldéhyde à 4% à différents temps de la procédure n'a pas permis d'améliorer la détection.

Nous avons ensuite, répété toutes ces étapes en utilisant un secondairement autre anticorps anti-thrombine humaine, cette fois-ci monoclonale (Antibodyshop, Denmark) sans aucune amélioration des résultats. Etant donné l'impossibilité de mettre au point cette méthode avec des cellules exprimant la TM humaine, nous n'avons bien sûr réalisé aucune procédure avec de la TM porcine.

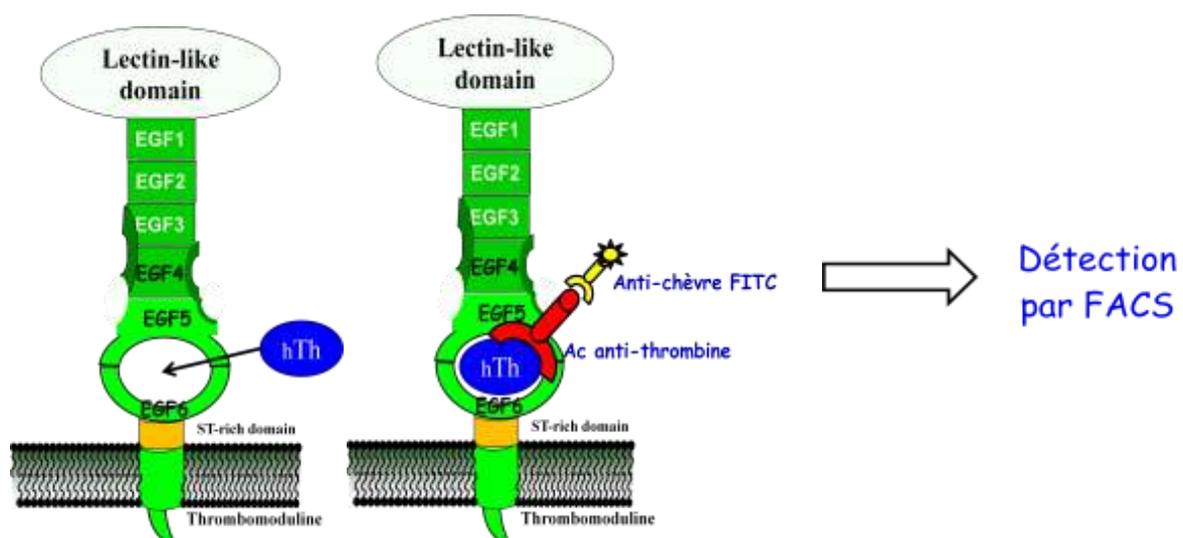


Figure 29 : Schématisation de la détection de la liaison de la thrombine sur la TM par FACS.

IV.3.2.2 Etude de la liaison Thrombine-TM par spectrophotométrie

La liaison de la thrombine avec la TM a été également évaluée en incubant de la thrombine (1 U/ml) avec des cellules exprimant la TM humaine ou porcine et en mesurant l'activité résiduelle de la thrombine dans le supernageant. Les cellules transfectées avec le vecteur seul liaient respectivement $8,7 \pm 3,8\%$ et $11,1 \pm 6,3\%$ de la thrombine humaine et porcine, reflétant ainsi le bruit de fond de la technique en raison de liaisons non spécifiques de la thrombine. Les cellules exprimant la TM humaines fixaient des niveaux significativement plus élevés de thrombine ($42,9 \pm 5,5\%$ avec la thrombine humaine et $45,5 \pm 8\%$ avec la thrombine porcine), tout comme les cellules exprimant la TM porcine ($35,3 \pm 3\%$ avec la thrombine humaine et $36,8 \pm 2,6\%$ avec la thrombine porcine)(Figure 30). Il n'y avait pas de différence significative de liaison entre les deux espèces de TM.

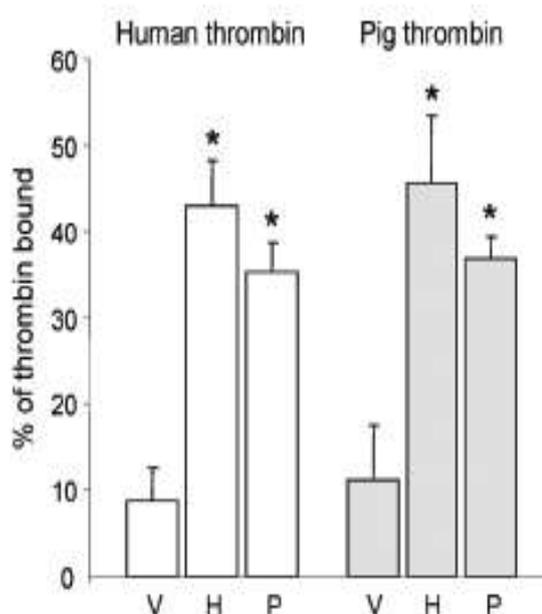


Figure 30 : Evaluation de la liaison TM-thrombine par calcul de la quantité de thrombine fixée à la TM. La liaison de la thrombine à la TM était similaire quelque soit le type de thrombine (humaine ou porcine) et quelque soit la TM (humaine (H) ou porcine (P)).

IV.3.2.3 Etude de la liaison Thrombine-TM par des tests d'hémostase

La liaison thrombine –TM a été également évaluée par une méthode de temps de formation de thrombus avec un plasma pauvre en plaquettes. Ainsi, le temps de coagulation d'un plasma humain avec des cellules exprimant la TM porcine a été calculé. Celui-ci était retardé de 95 ± 8 s lorsque le plasma était incubé avec des cellules exprimant la TM humaine et de 85 ± 1 s avec des cellules exprimant la TM porcine.

L'ensemble de ces résultats montre que l'étape initiale de l'activation de la PC par le complexe thrombine- TM ne semble pas significativement affectée par une incompatibilité moléculaire d'espèce au niveau de la fixation de la thrombine humaine par la TM porcine.

IV.3.3 ETUDE DE L'ACTIVITE DE CO-FACTEUR DE LA TM PORCINE

L'activité de cofacteur de la TM a été évaluée en mesurant la quantité de PC activée par des cellules exprimant la TM porcine ou humaine après incubation avec de la thrombine et de la PC humaine et après vérification d'un niveau d'expression similaire entre la TM humaine et porcine. Cependant afin d'éliminer un éventuel effet de variation d'expression de la TM non détectable par FACS, la concentration de la thrombine était titrée pour s'assurer que la thrombine et non pas la TM était le facteur limitant dans l'essai. L'activité de co-facteur des cellules exprimant la TM humaine était de $0,97 \pm 0,24$ pmol de PCa générée en 30 min et par 10^4 cellules, ce que nous estimons être approximativement 15 à 20 fois plus élevés que pour des HUVEC en culture (Siegel et al. 1997). Dans ces mêmes conditions, l'activité de la TM porcine représentait seulement 10% de celle de la TM humaine (Figure 31). Ce résultat démontrait que la TM porcine est un très faible cofacteur d'activation de la PC humaine par la thrombine humaine. Comme pour la thrombine humaine, la thrombine porcine était capable d'activer efficacement la PC humaine lorsqu'elle était couplée à la TM humaine mais pas avec la TM porcine (Figure 31), confirmant ainsi que l'étape limitante de l'activation de la PC humaine n'est pas au niveau de la liaison thrombine humaine-TM porcine puisque l'utilisation de thrombine porcine associée à la TM porcine ne permettait pas d'activer la PC humaine.

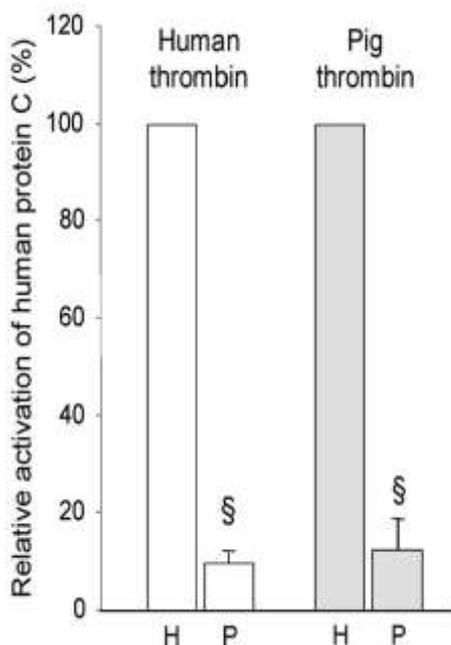


Figure 31 : Activités de co-facteur d'activation de la PC par la TM humaine (H) et par la TM porcine (P) avec soit la thrombine humaine (à gauche) ou soit la thrombine porcine (à droite). La TM porcine est un cofacteur inefficace d'activation de la PC humaine par la thrombine humaine ou porcine. Les valeurs représentaient les résultats d'au moins 3 procédures indépendantes. Le symbole (§) représente une différence statistiquement significative.

Afin de d'assurer que la molécule de TM porcine était fonctionnelle *in vitro* en l'absence de toute incompatibilité moléculaire, nous avons mis au point un contrôle positif en utilisant du plasma porcin comme source de PC porcine, car il était impossible à cette époque d'obtenir par voie commerciale conventionnelle de la PC d'origine porcine. Ainsi 5×10^5 cellules en suspension, exprimant la TM porcine après transfection, ont été incubées avec de la thrombine porcine et du plasma de porc appauvri en plaquettes pour mesurer la quantité de PC activée par la TM porcine. La concentration en PCa générée en 10 min était de $12,3 \pm 1,3$ nM pour les cellules exprimant la TM porcine et de $10,9 \pm 0,1$ nM pour les cellules exprimant la TM humaine avec un niveau de bruit de fond de $4,7 \pm 1,6$ nmol pour les cellules transfectées avec le vecteur seul (Figure 32). Ceci confirmait que la TM-flag porcine utilisée dans toutes nos expérimentations était bien fonctionnelle et que la TM-flag humaine pouvait même activer la PC porcine.

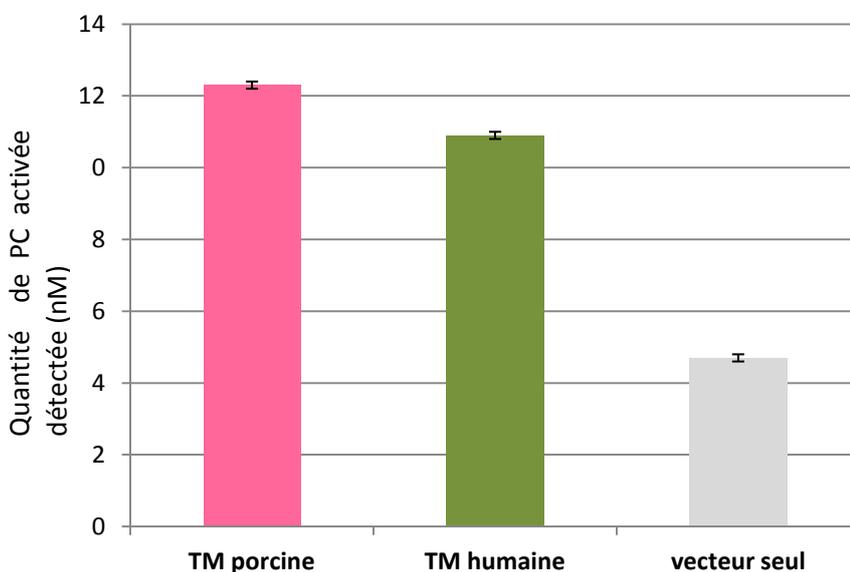


Figure 32 : Activation de la PC porcine par des cellules exprimant la TM porcine et humaine incubées avec de la thrombine porcine et du plasma de porc appauvri en plaquettes et contenant de la protéine C porcine.

IV.4 EXPRESSION ET ACTIVITES DE VARIANTS HYBRIDES DE LA TM PORCINE ET HUMAINE

Etant donné la spécificité fonctionnelle de chaque module EGF de la TM, nous avons cherché à savoir plus précisément sur quel(s) module(s) EGF-like était située l'incompatibilité moléculaire de la voie de la protéine C en créant des « variants hybrides » dans lesquels les domaines EGF-like avaient été permutés entre les deux espèces. Nous avons ainsi construits par PCR multiples des variants de la TM porcine (Figure 34) ayant des domaines EGF 4, 5 et/ ou 6 humains et des variants de la TM humaine (Figure 33) ayant des domaines EGF4, 5 et/ou 6 porcins. La substitution entre deux domaines EGF était réalisable sans aucune mutation supplémentaire puisque les séquences liant les domaines EGF étaient identiques entre les deux espèces (Figure 24).

La substitution des domaines EGF4 ou EGF6 dans la TM porcine n'a pas permis d'améliorer l'activité de co-facteur de la TM (Figure 35). Seul le remplacement par le domaine EGF5 humain a amélioré significativement l'activité de co-facteur de la TM porcine avec une activité passant de 10% par rapport à la TM humaine à plus de 40% après substitution. Le remplacement des deux modules EGF5 et EGF6 a permis de quasi normaliser l'activité de co-facteur de la TM porcine.

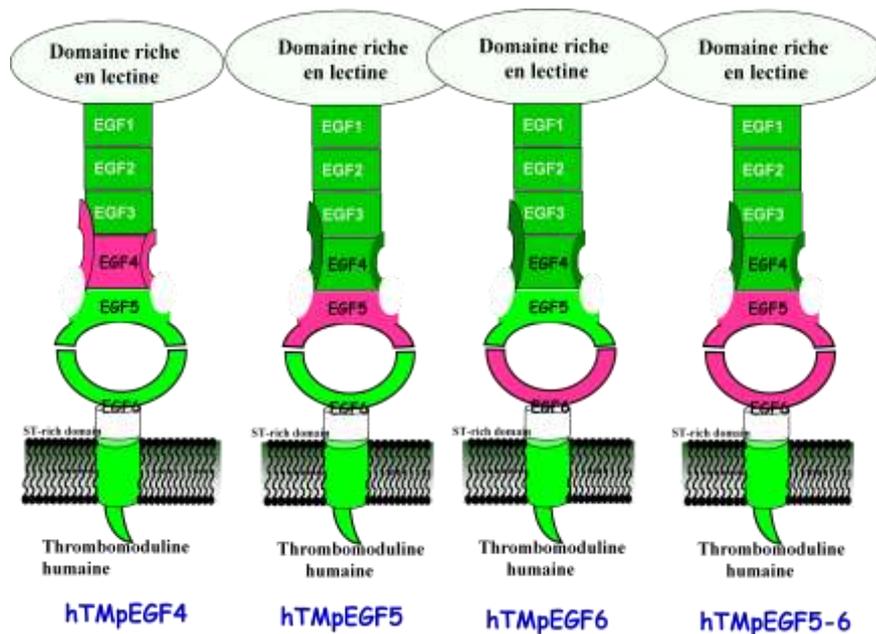


Figure 33 : Variants de la TM humaine avec différents domaines EGF substitués par des domaines EGF porcins correspondants: hTMpEGF4, hTMpEGF5, hTMpEGF6 et hTMpEGF5-6

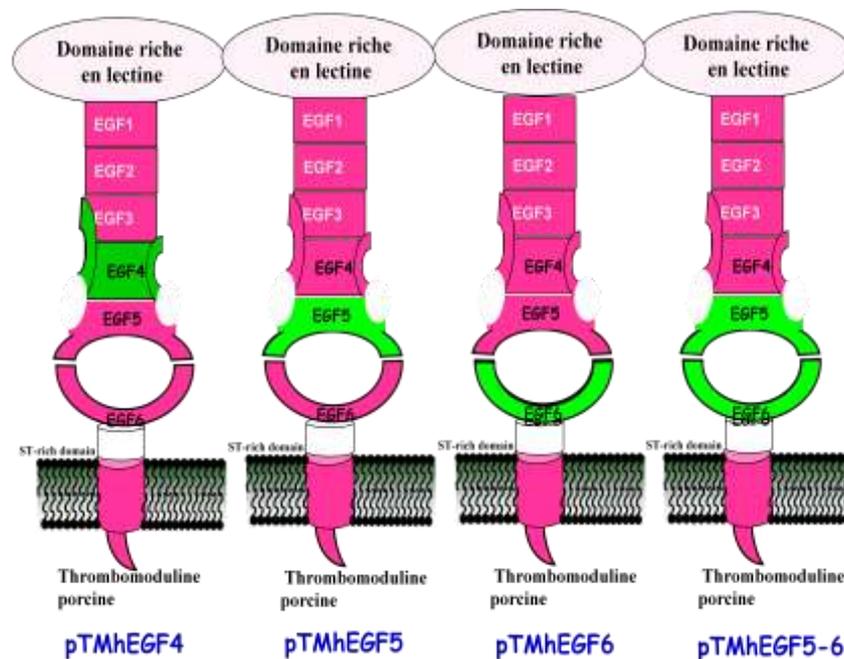


Figure 34 : Variants de la TM porcine avec différents domaines EGF substitués par des domaines EGF humains correspondants: pTMhEGF4, pTMhEGF5, pTMhEGF6 et pTMhEGF5-6.

A l'inverse, la substitution des domaines EGF4 et EGF6 dans la TM humaine, s'est traduit par une réduction modeste de l'activité de co-facteur, alors que le remplacement par le module EGF5 porcine seul

ou par les modules EGF5-6 porcins a dramatiquement diminué l'activité de 90% (Figure 35). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant de la thrombine porcine (Figure 36).

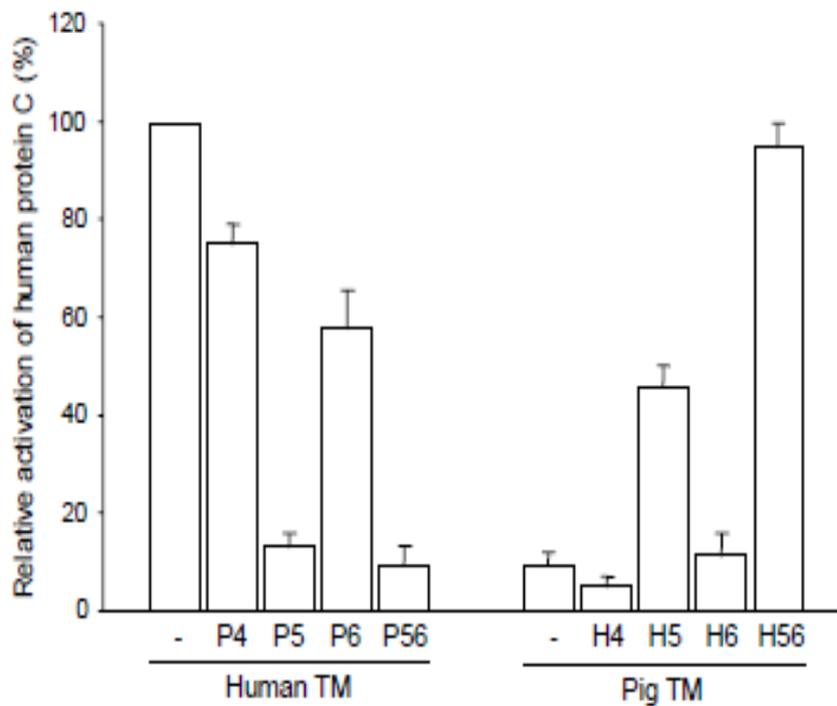


Figure 35 : Activation de la PC humaine par des variants hybrides de la TM humaine et de la TM porcine avec de la thrombine humaine. Ces variants étaient exprimés par des cellules COS-7 transfectées. Les domaines substitués sont représentés par P4 pour l'EGF4 porcine, H4 pour l'EGF humaine ect... L'absence de substitution est représentée par -. Comparativement à la TM humaine, seuls des variants contenant le domaine EGF5 humain présentaient au moins 20% de l'activité de co-facteur pour l'activation de la PC humaine. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne et écart-type de 3 procédures indépendantes.

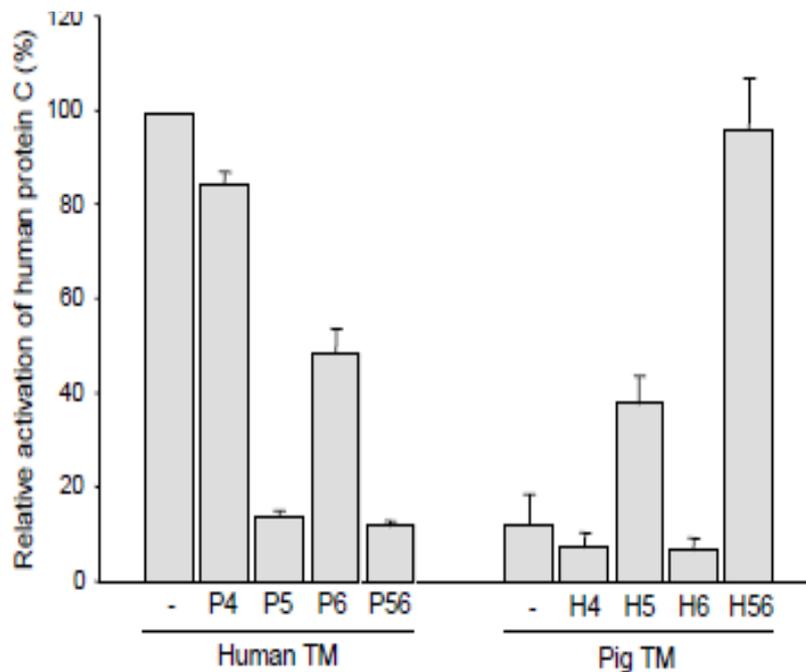


Figure 36 : Activation de la PC humaine par des variants hybrides de la TM humaine et de la TM porcine avec de la thrombine porcine. L'utilisation de thrombine porcine n'a apporté aucune modification sur l'activation de la PC par les variants.

IV.5 ACTIVATION DE TAFI PAR LE COMPLEXE THROMBINE-TM

L'activation de la molécule humaine TAFI a été mesurée en incubant des cellules transfectées exprimant la TM porcine ou humaine avec de la thrombine et TAFI. L'activation de TAFI était monitorée dans le temps en recherchant l'apparition du domaine catalytique de 36 kDa de TAFI par électrophorèse. Seule la TM humaine a généré des taux détectables de TAFI activé (Figure 37).

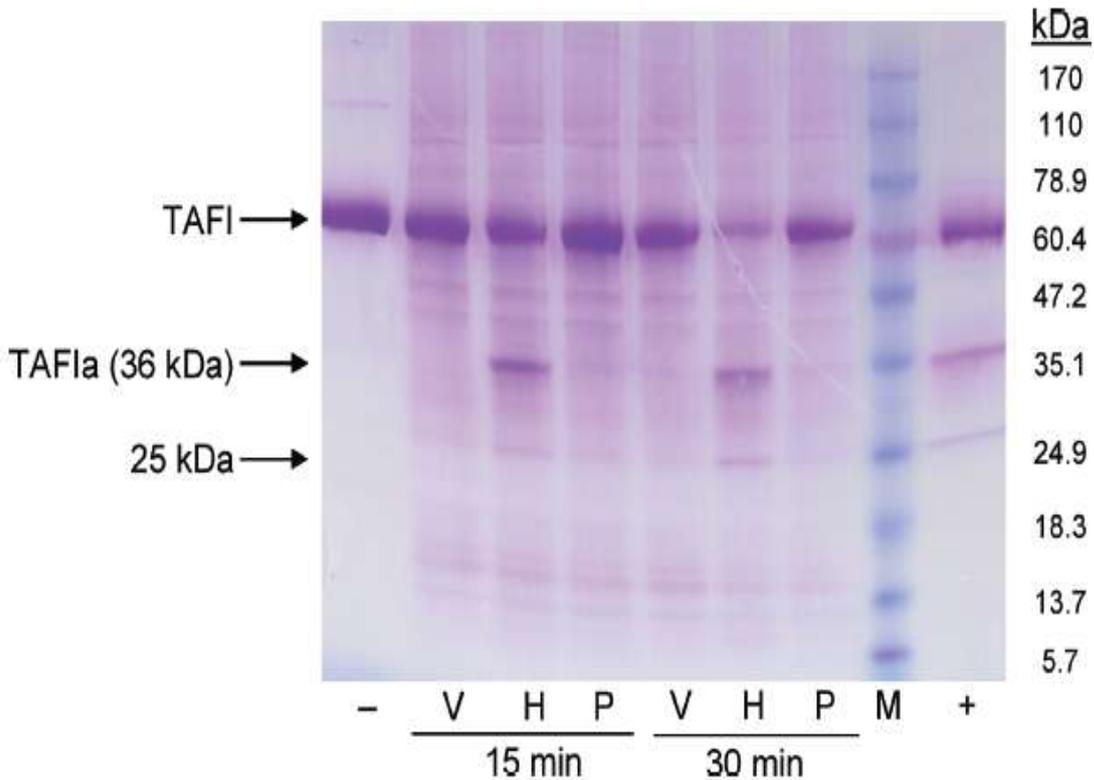


Figure 37 : Détection de l'activation de TAFI. Des cellules COS-7 exprimant la TM humaine (H), la TM porcine (P) ou le vecteur plasmidique seul (V) étaient incubées avec de la thrombine humaine et TAFI pendant 15 ou 30 minutes et après arrêt de la réaction par un inhibiteur de la thrombine PPACK, le supernageant était prélevé pour être analysé par électrophorèse sur gel polyacrylamide et coloré avec du bleu de Coomassie. Les symboles suivants correspondaient pour chaque ligne à : (-) thrombine et TAFI seul, (M) marqueurs moléculaires de poids, (+) TM humaine incubée avec la thrombine et TAFI pendant 30 min. L'activation de TAFI, indiquée par l'apparition d'un domaine catalytique de 36 kDa, était seulement détectable pour la TM humaine.

IV.6 CLONAGE ET CARACTERISATION DE L'ADNC CODANT POUR LA PROTHROMBINE PORCINE

Afin d'étudier plus précisément encore la perte du rôle de co-facteur de la TM porcine dans l'activation à la fois de la PC humaine et de TAFI, nous avons recherché s'il existait des différences structurales importantes entre la thrombine humaine et la thrombine porcine. Pour cela, nous avons isolé et séquencé l'ADNc codant pour la thrombine porcine.

Un premier fragment de 1425 a été obtenu grâce à une PCR utilisant de l'ADNc préparé à partir d'ARN de foie de porc et avec les amorces dégénérées pPT-F1 et pPT-R1. Le séquençage de ce produit de PCR a confirmé qu'il contenait une courte région 5' non translatée et approximativement 75% du cadre de lecture de la prothrombine porcine. Une seconde paire de primers (pPT-F2 et pPT-R2) a permis ensuite d'amplifier un second fragment de 570 pb contenant le reste du cadre de lecture et 84 pb de l'extrémité 3' non translatée. Au total, un fragment de 1869 pb a été séquencé. Il contenait un cadre de lecture codant pour une protéine ayant les mêmes caractéristiques que la prothrombine humaine à savoir un signal peptide, un propeptide, un domaine Gla, deux domaines Kringles et une chaîne catalytique B. La séquence de la protéine mature était exactement identique à la séquence récemment séquencée de la prothrombine du mini-porc (ligne Bana) en dehors de 2 résidus situés dans la chaîne B (Chen et al. 2007). L'alignement de la chaîne B avec celle de la prothrombine humaine a retrouvé 90,7% d'identités pour les acides nucléiques et une complète conservation pour les acides aminés, montrant ainsi l'importance de cette chaîne dans l'interaction de la thrombine humaine avec la protéine C et TAFI (Figure 38).

Pig Thrombomodulin Binds Human Thrombin but Is a Poor Cofactor for Activation of Human Protein C and TAFI

J. C. Roussel^a, C. J. Moran^a, E. J. Salvaris^a,
H. H. Nandurkar^{a,b}, A. J. F. d'Apice^{a,b}
and P. J. Cowan^{a,b,*}

^aImmunology Research Centre, St. Vincent's Health,
Fitzroy, Victoria, Australia

^bDepartment of Medicine, University of Melbourne,
Melbourne, Victoria, Australia

*Corresponding author: Peter Cowan,
peter.cowan@svhm.org.au

Incompatibility between pig thrombomodulin (TM) and primate thrombin is thought to be an important factor in the development of microvascular thrombosis in rejecting pig-to-primate xenografts. To examine this interaction at the molecular level, we cloned pig TM and measured its ability to bind human thrombin and act as a cofactor for the activation of human protein C and TAFI. The 579-residue pig TM protein showed approximately 69% sequence identity to human TM. Within the EGF domains necessary for binding of thrombin (EGF56), protein C (EGF4) and TAFI (EGF3), all of the amino acids previously identified as critical for the function of human TM, with the exception of Glu-408 in EGF5, were conserved in pig TM. Comparison of transfected cells expressing pig or human TM demonstrated that both proteins bound human thrombin and inhibited its procoagulant activity. However, pig TM was a poor cofactor for the activation of human protein C and TAFI, with domain swapping showing that EGF5 was the most important determinant of compatibility. Thus, while pig TM may be capable of binding thrombin generated in the vicinity of xenograft endothelium, its failure to promote the activation of human protein C remains a significant problem.

Key words: Coagulation, thrombosis, xenotransplantation

Received 7 September 2007, revised 24 January 2008
and accepted for publication 12 February 2008

Introduction

In pig-to-primate organ xenotransplantation, rejection-associated microvascular thrombosis has emerged as a

major feature of graft loss (1). It has been suggested that molecular incompatibilities in the coagulation cascade, such as failure of pig thrombomodulin (TM) to bind primate thrombin, may contribute to this process (2). TM is an endothelial transmembrane glycoprotein that plays a critical role in the control of coagulation, fibrinolysis and inflammation. Its N-terminal extracellular region comprises several structural modules including a globular C-type lectin-like domain, a hydrophobic region, six epidermal growth factor-like (EGF) domains and an O-glycosylated serine/threonine-rich region (Figure 1). The anticoagulant activity of TM is specified by EGF domains 4–6, which act as a molecular switch to convert thrombin from a procoagulant into an anticoagulant. EGF5 and EGF6 form a Ca²⁺-stabilized dipolar rod-like structure that tightly binds exosite I of thrombin (3), blocking thrombin's ability to cleave fibrinogen, activate platelets and feedback-amplify the coagulation pathway. EGF4 protrudes away from EGF5 and the thrombin surface (3) and is essential for the binding and activation of protein C by the TM/thrombin complex. Activated protein C (APC) interacts with various cofactors to shut down coagulation by irreversibly inactivating factors Va and VIIIa. APC also has numerous well-established anti-inflammatory effects (4).

The activation of protein C by TM/thrombin is enhanced considerably by the endothelial protein C receptor (EPCR). EPCR is a transmembrane protein that concentrates protein C at the endothelial surface and significantly lowers the *K_m* for protein C activation (5), increasing APC generation by about 5-fold *in vitro* (6) and 20-fold *in vivo* (7). Unlike TM, which is broadly expressed on the endothelium of large and small blood vessels alike, EPCR is preferentially expressed in arteries and veins and not in the capillaries of most organs including heart and kidney (8). It has been suggested that this pattern of EPCR expression may be related to the lower concentration of TM (relative to blood volume) in larger vessels, necessitating an additional mechanism to augment protein C activation (9).

It was originally proposed that TM induced a conformational change in the catalytic site of thrombin, altering its specificity from procoagulant to anticoagulant substrates (10). More recent data support the 'positioning overrides specificity' model, in which EGF4 acts as a backrest by which TM binds protein C and positions its activation

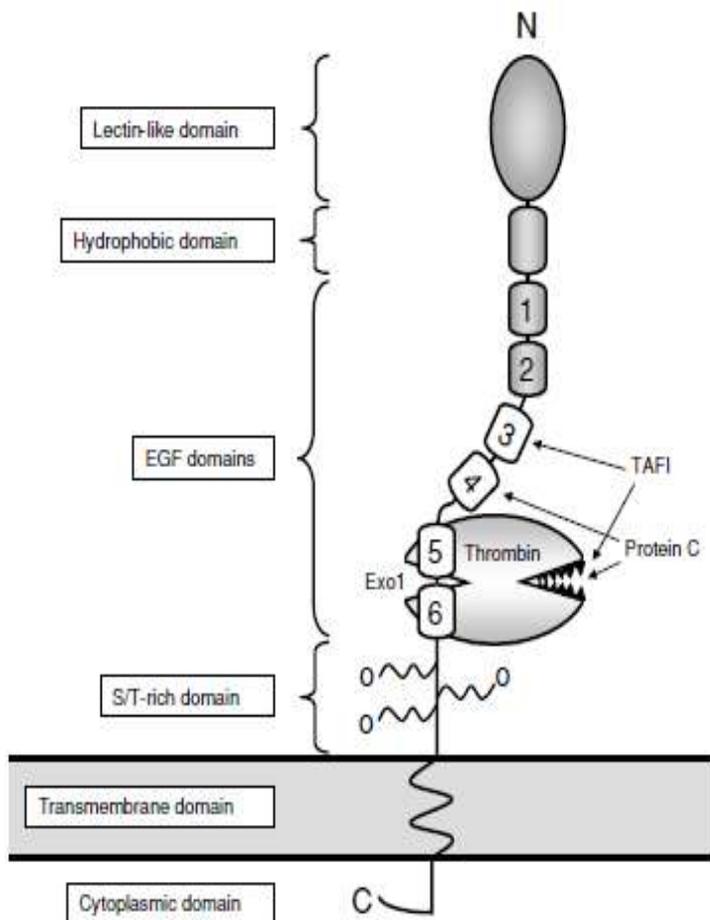


Figure 1: Structure of TM and its proposed interactions with thrombin, protein C and TAFI. EGF domains five and six tightly bind exosite 1 of thrombin (Exo1) to block its procoagulant activity. Binding of protein C and TAFI to EGF4 and EGF3, respectively, positions their activation peptides for cleavage by the thrombin active site. Subtle conformational changes to the binding partners are also likely to be required.

peptide for cleavage by the thrombin catalytic site, which is itself largely unchanged following binding of thrombin to EGF56 (11,12). However, there is evidence that conformational changes are also necessary, because binding to TM induces subtle but important alterations to both the thrombin catalytic site (13, 14) and the protein C activation peptide (15). While EGF4-6 alone are necessary and sufficient for anticoagulant and cofactor functions, the serine/threonine-rich domain contributes by acting as a spacer to position the thrombin catalytic site at an appropriate distance from the endothelial cell surface (10). It also contains the site of attachment of a chondroitin sulfate moiety that stabilizes thrombin binding (10).

Paradoxically, TM is also a cofactor for thrombin's antifibrinolytic effects. The TM/thrombin complex protects newly formed clot from premature lysis by activating thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) (16). EGF3-6 are required for this activity, with EGF3 necessary for TAFI binding (17). Mutagenesis studies support the positioning model in which TM orients the thrombin catalytic site with the activation site of TAFI, rather than by significantly altering the catalytic site itself (18), although conformational changes cannot be ruled out. As well as inhibiting fibrinolysis, activated TAFI (TAFIa) inhibits inflammation by in-

activating the anaphylotoxins C3a and C5a (19) and the inflammatory mediator bradykinin (20). TM also has anti-inflammatory properties that are independent of its cofactor activity. The lectin domain attenuates inflammation by suppressing neutrophil adhesion to endothelial cells (21) and by sequestering the proinflammatory molecule HMGB1 (22).

Based on comparisons of cultured human and pig endothelial cells, Robson and colleagues proposed that pig TM binds human thrombin relatively inefficiently and is consequently a poor cofactor for the activation of human protein C (23,24). One limitation of these studies was that the level of TM expression on the pig cells could not be determined due to the lack of antibodies recognizing pig TM. In our study, we cloned and expressed epitope-tagged pig TM to directly measure its compatibility with the human protein C and TAFI activation pathways. EGF domain swapping between pig and human TM was used to investigate the mechanism of any observed incompatibility. We demonstrated that pig TM does bind human thrombin, inhibiting its procoagulant properties. The domain swapping experiments indicated that pig TM also binds human protein C. However, human thrombin bound to pig TM was unable to efficiently activate either human protein C or TAFI.

Table 1: PCR primers used in this study. *Mlu*I sites used for cloning of PCR products into pEF-BOS-FLAG are underlined

Primer	Sequence (5' to 3')	Purpose
pTM-F1	TRATGACMGTGCGCTCCTC	Initial cloning, pig TM
pTM-R1	RCAGTCRTCCACGTCCTC	Initial cloning, pig TM
pTM-F2	CTGCAGGAGGATGGCGTCTTGCG	PCR 'walking', pig TM
pTM-R2	CGACTTGTACTCCAGCTC	PCR 'walking', pig TM
pTM-F3	TCTCTGGTCGTGGCGCTT	PCR 'walking', pig TM
pTM-R3	GCAAGGATTTGCCTGTGTTCT	PCR 'walking', pig TM
pTM-F4	TGGCGTGTGACACCATGCT	Cloning, pig TM
pTM-R4	GAGAGGCCCTTAGAGTTTCTGA	Cloning, pig TM
pTM-RACE1	GCCATCGCCTTCGCCGCTCAGTAGC	5' RACE, pig TM
pTM-RACE2	GCTGCCACCGAGGAGCGCACGGTCATCA	5' RACE, pig TM
pTM-Lec-F	<u>CACGCGTCTTGAAGCGCAGCCCTAGGCA</u>	Cloning/domain-swapping, TM
pTM-EGF5-F	CCGCACAGGTGCCAGATGTT	Domain-swapping, TM
pTMST-F	GACCCATCCAGGAGAACAGCCGC	Domain-swapping, TM
pTM-EGF6-R	CGTCCACCTTGCCGGAGTCGAGTCTGTGCCGG	Domain-swapping, TM
pTMCyt-R	<u>CACGCGTTTAGAGTTTCTGAGGCATCTGCCCA</u>	Cloning/domain-swapping, TM
hTM-Lec-F	<u>CACGCGTGCACCCGAGAGCCGCGA</u>	Cloning/domain-swapping, TM
hTM-EGF4-F	GAGCCCGTGGACCCGTGCTTC	Domain-swapping, TM
hTM-EGF5-F1	CCGCACAGGTGCCAGATGTTTTGC	Domain-swapping, TM
hTM-EGF5-F2	CCGCACAGGTGCCAGATGTT	Domain-swapping, TM
hTM-EGF6-F	ATCTGCACGGACATCGACGAGTGC	Domain-swapping, TM
hTMST-F	GACTCCGGCAAGGTGGACGGT	Domain-swapping, TM
hTM-EGF3-R	GAAGCACGGGTCCACGGGCTC	Domain-swapping, TM
hTM-EGF4-R	AACATCTGGCACCTGTGCGG	Domain-swapping, TM
hTM-EGF5-R	GCACTCGTCGATGTCGTCAGAT	Domain-swapping, TM
hTM-EGF6-R	GTTCTCCTGGATGGGTCACAGTCGGTGCCAAT	Domain-swapping, TM
hTMCyt-R	<u>CACGCGTGTCTTTGGTAGCAAAGCTG</u>	Cloning/domain-swapping, TM
pPT-F1	CCCAGGAGCTGACACACATG	Cloning, pig prothrombin
pPT-R1	TGAGCTTCAGTAGGGCGATGTC	Cloning, pig prothrombin
pPT-F2	GACATCGCCCTACTGAAGCTCA	Cloning, pig prothrombin
pPT-R2	TAGAAACAAACCACAAAATAWTTTC	Cloning, pig prothrombin

Methods

Molecular biology

Total RNA was isolated from homogenized lung or liver tissue recovered from large white/Landrace pigs, or from cultured EAhy926 human endothelial cells, using TRIzol reagent (Invitrogen, Mount Waverley, Australia). cDNA was prepared by reverse transcription-PCR (RT-PCR). Two micrograms of total RNA, 1 μ L each of oligo-dT and random hexamers (Promega, Annandale, Australia) and 1 μ L of 10 mM dNTPs (Invitrogen) were incubated in a reaction volume of 13 μ L for 10 min at 65°C followed by 1 min on ice. 4 μ L of 5X RT buffer, 1 μ L of (R, R)-dithiothreitol (DTT), 1 μ L of RNaseout and 1 μ L of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) were added, followed by incubation for 5 min at 25°C, 50 min at 50°C and 15 min at 70°C. Rapid amplification 5' of cDNA ends (RACE) was performed using the SMART RACE System (Clontech, Palo Alto, CA) according to the manufacturer's instructions. PCR for the initial amplification of pig TM cDNA was performed using the Fail-safe system with Buffer G (Epicenter, Madison, WI). Subsequent PCR to generate fragments for cloning used the proofreading polymerase Platinum Pfx (Invitrogen). Pig prothrombin cDNA was also amplified using Pfx. Primers used in this study are listed in Table 1.

Cloning of pig TM cDNA

Two degenerate PCR primers (pTM-F1 and pTM-R1) were designed based on areas of highly conserved sequence in the reported TM coding regions from six mammalian species (human, bovine, canine, rabbit, rat, mouse). This primer set amplified an 812-bp product from pig lung cDNA that shared 77% nucleotide sequence identity with the corresponding product from

the human endothelial cell line EAhy926 (data not shown). The porcine sequence was extended 2569 bp downstream by sequential PCR 'walking' using gene-specific forward primers (pTM-F2 and pTM-F3) with reverse primers designed to bind to conserved sequences within the TM open reading frame (pTM-R2) or 3'-untranslated region (pTM-R3). Upstream sequence was obtained by 5' RACE using the nested reverse primers pTM-RACE1 and pTM-RACE2. The complete open reading frame was amplified using primers pTM-F4 and pTM-R4.

Construction of TM expression vectors

TM expression vectors were based on the mammalian expression plasmid pEF-BOS-FLAG, which contains the EF-1 α promoter upstream of the coding regions of the IL-3 signal sequence and the FLAG epitope, followed by a site for the restriction enzyme *Mlu*I for in-frame fusion of cDNAs of interest (25). PCR products of 1.7-kbp were amplified from pig and human TM cDNA using primers pTM-Lec-F/pTMCyt-R and hTM-Lec-F/hTMCyt-R, respectively, and ligated into the cloning vector pCR-Blunt (Invitrogen). The 1.7-kbp fragments released from the resulting plasmids by partial digestion with *Mlu*I (to avoid digestion of an internal *Mlu*I site) were then cloned into pEF-BOS-FLAG. All constructs were confirmed by sequencing.

Construction of EGF domain-swapped variants

EGF domain substitutions between pig and human TM were generated by an overlapping 3-fragment PCR method. For example, the coding region for pig TM containing human EGF4 (pTM-hEGF4) was constructed in the following stepwise manner: First, three regions were amplified: the lectin-like domain to EGF3 from pig TM, EGF4 from human TM and EGF5 to the

Table 2: Primers used to generate EGF domain-swapped variants of pig and human TM

Variant	PCR 1	PCR 2	PCR 3
pTM-hEGF4	pTMLec-F/hTMEGF3-R	hTMEGF4-F/hTMEGF4-R	pTMEGF5-F/pTMCyt-R
pTM-hEGF5	pTMLec-F/hTMEGF4-R	hTMEGF5-F1/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/pTMCyt-R
pTM-hEGF6	pTMLec-F/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/hTMEGF6-R	pTMST-F/pTMCyt-R
pTM-hEGF56	pTMLec-F/hTMEGF4-R	hTMEGF5-F2/hTMEGF6-R	pTMST-F/pTMCyt-R
hTM-pEGF4	hTMLec-F/hTMEGF3-R	hTMEGF4-F/hTMEGF4-R	hTMEGF5B-F/hTMCyt-R
hTM-pEGF5	hTMLec-F/hTMEGF4-R	pTMEGF5-F/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/hTMCyt-R
hTM-pEGF6	hTMLec-F/hTMEGF5-R	hTMEGF6-F/pTMEGF6-R	hTMST-F/hTMCyt-R
hTM-pEGF56	hTMLec-F/hTMEGF4-R	pTMEGF5-F/pTMEGF6-R	hTMST-F/hTMCyt-R

For variants with the pig TM backbone, PCRs 1 and 3 used pig TM cDNA as template and PCR2 used human TM cDNA as template, whereas the converse applied for variants with the human TM backbone.

cytoplasmic tail from pig TM. Second, a mixture of these three overlapping PCR products was used as template to amplify the pTM-hEGF4 cDNA using the outside primers pTMLec-F/pTMCyt-R. Third, the resulting 1.7-kbp product was sequentially cloned into pCR-Blunt and pEF-BOS-FLAG as described above. The same procedure was followed with the appropriate primers and templates (Table 2) to generate other variants.

Cloning of pig prothrombin cDNA

A degenerate PCR primer pair (pPT-F1 and pPT-R1) was designed based on areas of highly conserved sequence in the reported prothrombin coding regions from four mammalian species (human, bovine, rat, mouse). PCR of cDNA prepared from pig liver total RNA generated a 1425-bp product. Sequencing of this product confirmed that it contained a short 5'-untranslated region and approximately the first three-quarters of the pig prothrombin open reading frame. A second primer pair (pPT-F2 and pPT-R2) was then used to amplify an overlapping 570-bp product containing the rest of the open reading frame and 84-bp of the 3'-untranslated region.

Cell culture and transfection

COS-7 and EAhy926 cells were cultured at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (HyClone, Tauranga, New Zealand) and 15 mM HEPES buffer (Invitrogen). COS-7 cells (5×10^6) were transfected by electroporation with 10 µg of plasmid DNA at 0.22 V, 940 µF using cuvettes with a 4 mm gap in a BioRad Gene Pulser (BioRad, Gladesville, Australia). Cells were washed with phosphate-buffered saline, incubated with the DNA for 10 min, electroporated and rescued in complete medium. Transfectants were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Sydney, Australia) using fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies KM5-1C5 (anti-FLAG, WEHI Monoclonal Laboratory, Bundoora, Australia) and 1A4 (antihuman TM; kindly provided by Dr Phillip Bird, Monash University, Australia), with exclusion of dead cells using 1 µg/mL propidium iodide. Lysates of transfectants were analyzed by Western blotting. 5×10^6 transiently transfected cells were lysed in 150 µL of lysis buffer (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 1 mM PMSF, 1 mM Benzimidazole, 2 µg/mL aprotinin, 2 µg/mL leupeptin). Twenty microliters of the lysate was mixed with 2× nonreducing buffer, heated to 100°C for 5 min and electrophoresed on a 10% SDS-PAGE gel, with BenchMark™ PreStained Protein Ladder (Invitrogen). The gel was blotted onto Hybond-P (Amersham Biosciences, Rydalmere, Australia) at 250 mAmp, 4°C for 1 h. Nonspecific binding was blocked using 5% Blotto 5% skim milk powder/TBS/0.05% Tween 20. Blots were incubated with 1/1000 anti-FLAG (KM5-1C5) antibody for 1 h at RT, washed and incubated for 1 h at room temperature with 1/5000 rabbit anti-mouse HRP (DakoCytomation, Dako Australia, Botany, Australia). After several washes the blot was developed using the Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent system (Quantum Scientific, Clayton South, Australia).

Thrombin-binding assay

Transiently transfected COS-7 cells were seeded at 10^6 cells per well in 12-well plates and incubated at 37°C for 24 h. The cells were washed in phosphate-buffered saline and then in assay buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 25 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.5 at 37°C). One hundred fifty microliters of 1U/mL human plasma thrombin (Merck, Kilsyth, Australia) or pig thrombin (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN) in assay buffer was added to each well and the plates were incubated at 37°C for 30 min. The supernatant was removed and transferred to a 96-well flat-bottom plate. One hundred fifty microliters of 1 mM Spectrozyme TH (American Diagnostica, Stamford, CT) was added and absorbance at 405 nm was read at 37°C in a FLUOStar Galaxy kinetic plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). The concentration of unbound thrombin in the supernatant was calculated using a standard curve of 0–1U/mL thrombin.

Measurement of cofactor activity for human protein C activation

Twenty-four hours after transfection, COS-7 cells were seeded at 10^6 cells per well in 96-well plates and incubated for 24 h at 37°C. Human thrombin and protein C (Merck) were added at 0.1U/mL and 150 nM, respectively, in a final volume of 100 µL. After incubation at 37°C for 30 min, the reaction was stopped by addition of 4 µL 2U/mL hirudin (Merck) and 100 µL was transferred to a 96-well flat-bottom plate. One hundred microliters of 1 mM Spectrozyme APC (American Diagnostica) was added and absorbance at 405 nm was read at 37°C using the FLUOStar Galaxy kinetic plate reader. The concentration of APC generated was calculated using a standard curve of 0–60 nM APC (American Diagnostica).

Measurement of cofactor activity for pig protein C activation

Forty-eight hours after transfection, 5×10^6 COS-7 cells resuspended in 50 µL assay buffer containing 0.2 U/mL pig thrombin were added per well to a 96-well plate and incubated for 10 min at 37°C. An equal volume of platelet-poor pig plasma, diluted 1:5 in assay buffer, was added and incubation at 37°C was continued for a further 10 min. The reaction was stopped and the concentration of APC generated was determined as described above for the human protein C activation assay.

Measurement of cofactor activity for TAFI activation

Five micrograms of purified TAFI (Haematologic Technologies, Essex Junction, VT) was incubated with 2×10^6 transiently transfected COS-7 cells for 15 or 30 min at 37°C in assay buffer (5 mM CaCl₂, 50 mM HEPES, 100 mM NaCl) containing 2 U/mL human thrombin. The reaction was quenched with the thrombin inhibitor D-Phe-Pro-Arg-Chloromethyl Ketone (PPACK, 1 µM; Haematologic Technologies). 2× nonreducing buffer was added and the samples were heated for 5 min at 100°C before being electrophoresed on a 4–20% Tris-Glycine gel (Invitrogen) and visualized using the Coomassie Fast Staining method.

N L R V L L L S V L A P A G L G F F V L P E A Q 8
 ATGCTCCGGTTCCTGCTCCCTGGAGTACTGGCCCCCGCCGGCTCGGGTCCCGTGTCTCCCTGAAGCGCAG 72
 P L G S Q C V E H D C F A L P R G P A T F L Y A 32
 CCCCTAGGCGAGTCCGTGGAGCATGACTGCTTTGCGCTCTTCCGGGGCCCCCGGACCTTCTCCTACTGCC 144
 S Q A C E H L Q G H L N T V R S S V A A E V I S 56
 AGCCAGGCTTTGAGCATCTACAGGGCCACTTGATGACCGTGGCTCCTCGGTGGCAGCAGAGGTGATCTCC 216
 L L L S G E G D G P R L W T G L Q L P R D C V E 80
 CTGCTACTGAGCGGAGGCGATGGCCCCGCTCTGGATAGGCTGCAGCTCCCGCGGATTGCGTGGAG 288
 P R H R G A L R G F Q W Y T G D [N H T] S Y S M W 104
 CCGCGCACCGGAGCTTTGCGGGCTTCCAGTGGTTACAGGGGACAAACACACAGCTACAGCATGTGG 360
 A R P R G D E E P I C G T L C V A V S A A G A P 128
 CGCGGCAAGGGCGAGAGGAGCCCATCTGCGGTAGCGTGTGCGTGGCGGCTCGGGCGGCGGGCCCT 432
 V P G E P A W E E Q Q C E A E A D G F L C E F H 152
 GTACCGGAGAGCCAGCTGGGAGGACAGCAGTGGGAGCGGAGGACAGAGCGCTTCTCTGCGAGTCCAC 504
 P P A S C Q P L A V K S D A A E A A S P S I T Y 176
 TTCCTCCGCTCTCTGCGAGCGCTGGCTGTGAAGTCCGAGCCCGCGGAGGCGAGCCAGCTTCTCCATCACCTAC 576
 S T P F G A R G A D F Q A L P V G S S V A V T P 200
 AGCACTCGTTCCGGGCCCTGGCGCGGACTTCCAGGGCTGCGGGTGGGAGCTCGGTGGGGTGGACGCC 648
 L G V E L E C A V W P G E A Q A R W V R E A P Q 224
 CTTGGGTTGGAGTGGAGTGGCGTGTGGCCCGGGGAGGCCAGGCGGCTGGGTCGGGAGGGCGCGGGT 720
 A W A C G V R N G G C Q H A C [N G S] A G E S R C 248
 GCCTGGGCTGCGCGCTTGGAGAACGGCGGCTGCCAGCACCGCTGCAACGGGAGCGCGGGAGTCCCGCTGC 792
 L C P A D A A L O E D G R S C E A P A E H P C H 272
 CTCCTGCCCGCGAGCGCGCCCTGCGAGGAGATGGGCGTCTTGGCGAGGCGCGCGGAGCACCCGTGCCAC 864
 R L C E H I C F H D P L D A P T [N Y T] C P C E A 296
 CGACTCTGGAGCATATCTGCTTCCAGCACCCCTGGAGCGGCCACCACTACACATGCTTTTGGGAGGGG 936
 G Y R L A A D G M R C E D V D D C A K Y P E P C 320
 GGCTACCGCTGGCTCCGATGGGATCGGTGGAGGAGCGTGGAGCAGTGGCAGAGGTGCCAGTCCGTGC 1008
 P Q S C V N T Q G G F Q C H C L P N Y S L V D G 344
 CCGCAGAGCTGTGCAACACACAGGGCGGGTCCAGTCCACTGCTTCCCACTACGAGCTCGTGGAGCGG 1080
 E C V E P V D P C F G T D C E Y E C Q V V G R T 368
 GAGTGGTAGAGCCCGTGGACCCATGCTTCCGACCGGACTGCGAGTACAGTGGCCAGGTGGTGGGCGTACT 1152
 G Y R C V C A R G F A P V P H A P H R C Q M P C 392
 GGCTACCGCTGGTCTGCGGGAGGGCTTGGCGCCGCTCCCCACGCCCAGCACAGGTGCCAGATGTTCTGC 1224
 [N Q T] S C P A D C D P N K Q D E C Q C P D G Y I 416
 AACCAAGCTTCCGCTCCGACTGGACCCCAACAGCAGGACAGTGGCCAGTCCCTGAGCGGCTACATC 1296
 L D E G S I C T D I D E C N N G Y C F G E C R N 440
 CTGGAGAGGGCTCCATATGCAACGACATCGAGTGCACACACCGCTACTGCCCCCGGAGTGGCGAAAC 1368
 L E G T Y E C I C G F Q L D L A G H A G T D C D 464
 CTCGCCGCACTATGATGCACTGCGGGCCCGAGCTGGAGCTCGCGGTCAAGCCGGCACAGACTGGCGAC 1440
 P I Q E N S R R E Q G G G D E D V G S G E P A V S 488
 CCCATCCAGAGACAGCCCGGAGCAGGGCGGCGGACAGGACGTTGGCTTGGAGAGCCTGCGGTGAGC 1512
 P T P G T T A R P S P A R P L H S G V L A G I S 512
 CCGACTCTGGCACCACCGCTGCGCCCTGCGCCCGCCCGGCCCCGTCATTGGGGTGTGGCTGGCATCTCC 1584
 I A T L S L V V A L L A L L C H L R K K Q G T S 536
 ATCGCCACCCTGCTCTGGTGGTGGCGCTTTGGCGCTTCTGTGTCACTGGCAGGAGGCAAGGACCTCA 1656
 R A E L E Y K C G V P A K E V V L Q H V G Q M P 560
 AGGGCCGAGCTGGATCAAGTGGCGCTCCCGCCAGGAGGTGGTGTCCAGCACCTGGGGCAGATGCGT 1728
 Q K L * 563
 CAGAAACTTAA 1740

Figure 2: Nucleotide and deduced amino acid sequence of pig TM. A 16-residue signal peptide sequence is followed by the lectin-like domain (italics), hydrophobic region (dashed underlined), six EGF-like domains (double underlined), serine-threonine-rich region (between arrowheads), transmembrane domain (single underlined) and 34-residue cytoplasmic tail. Putative N-linked glycosylation sites are boxed. Amino acid numbers represent the position of residues in the deduced mature protein sequence. The cDNA sequence of pig TM is available in GenBank with Accession No. EF692640.

Statistical analysis

Data were analyzed for statistical significance using Student's unpaired t-test. P-values of < 0.05 were considered significant.

Sequence analysis

Sequence analysis including ClustalW alignment was performed using Accelrys Gene 2.0 (Accelrys, Tokyo, Japan). Amino acid sequences were analyzed for the presence of signal peptides and N-linked glycosylation sites using the programs SignalP 3.0 (26) and NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc), respectively.

Results

Functionally important residues in EGF domains 3-6 of human TM are highly conserved in pig TM

A 3648-bp pig TM cDNA was isolated from pig lung RNA by a combination of degenerate PCR and RACE. The cDNA encompassed 95 bp of 5'-untranslated region, a 1737-bp open reading frame (Figure 2) and 1816 bp of 3'-untranslated region. The entire open reading frame could be amplified using primers pTM-F4 and pTM-R4 with either cDNA or genomic DNA as template (data not shown), suggesting

domains, EGF5 showed the highest degree of homology across seven mammalian species (Table 3). Alignments of the human and pig domains involved in the binding of thrombin (EGF56), protein C (EGF4) and TAFI (EGF3) are shown in Figure 3. With the exception of Glu-408 in EGF5 (Gln-410 in pig TM), all residues of human TM shown to be important for the binding of thrombin and activation of protein C (3,27,28) and TAFI (29) were identical or conservatively substituted. Of two N-glycosylation sites (both NQT) in human TM EGF4 and EGF5, only the latter was conserved in pig TM. The chondroitin sulfate attachment site in the human TM serine/threonine-rich region (30) was conserved in pig TM (data not shown).

Pig TM binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C

Because of the lack of anti-TM antibodies recognizing pig TM, we constructed vectors for expression of pig and human TM with a FLAG epitope tag at the extracellular amino terminal. Transient transfection of COS cells resulted in strong and similar expression of both proteins on the cell surface as detected by flow cytometry (Figure 4A) and

Western blot (Figure 4B) using an anti-FLAG antibody. As expected, staining with the antihuman TM monoclonal antibody 1A4 detected human but not pig TM (data not shown). The relative efficiency of thrombin binding was determined by incubating transiently transfected cells with a saturating concentration of thrombin (1 U/mL) and measuring residual thrombin activity in the supernatant. Vector-transfected cells bound 8.7 ± 3.8% and 11.1 ± 6.3% of added human and pig thrombin, respectively, presumably representing nonspecific binding (Figure 4C). Cells expressing human TM bound significantly higher levels of each (42.9 ± 5.5% and 45.5 ± 8.0%), as did cells expressing pig TM (35.3 ± 3.4% and 36.8 ± 2.6%). There was no significant difference in the binding of thrombin to human and pig TM. Furthermore, human thrombin-mediated clotting of human platelet-poor plasma in the presence of transfectants was delayed by 95 ± 8 s and 85 ± 1 s, respectively, by expression of human and pig TM (data not shown). These results indicate that the initial step in the TM/thrombin interaction, thrombin binding, is unaffected by the species origin (human or pig) of either protein.

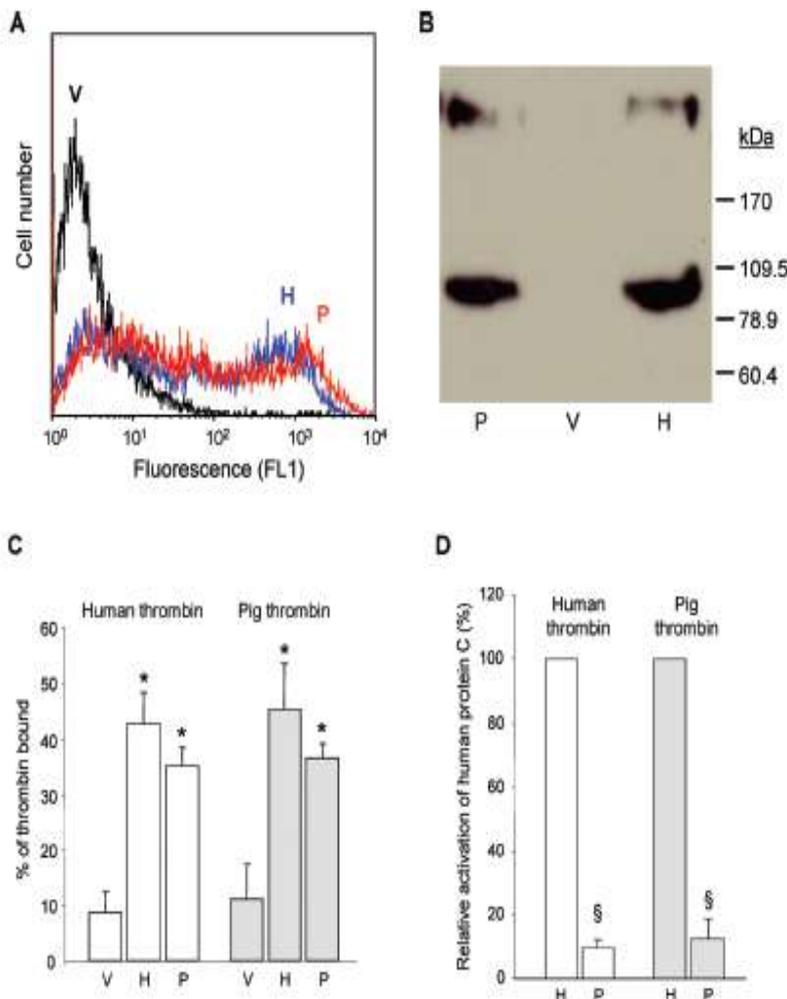


Figure 4: Pig TM binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C. COS-7 cells were transiently transfected with expression vectors for FLAG-tagged human TM (H) or pig TM (P), or vector alone (V). Similar expression of human and pig TM was demonstrated by flow cytometric analysis (A), hTM transfectants shown in blue, pTM transfectants in red, and Western blot (B), using an anti-FLAG antibody. Thrombin binding to the transfectants was similar irrespective of the species combination (C), however, pig TM was an inefficient cofactor for activation of human protein C by either human or pig thrombin (D). Results are presented as mean ± SEM of at least five (thrombin binding) or three (protein C activation) independent experiments. Asterisks represent statistically significant differences ($p \leq 0.01$) versus vector-transfected cells. Symbols (§) represent statistically significant differences ($p < 0.001$) versus hTM-transfected cells.

TM cofactor activity for the thrombin-mediated activation of protein C was then determined by incubating transfected cells with human thrombin and human protein C. Similar expression of human and pig TM was confirmed as above, but to eliminate the potential effects of small variations in expression level, the concentration of thrombin was titrated to ensure that it, and not TM, was the limiting factor in the assay (data not shown). The cofactor activity of transfectants expressing human TM was 0.97 ± 0.24 pmol APC generated/30 min/ 10^4 cells, which we estimate to be approximately 15- to 20-fold higher than that of cultured HUVEC (23). Under these conditions the activity of pig TM was only 10% that of human TM (Figure 4D), directly demonstrating that pig TM is a poor cofactor for activation of human protein C by human thrombin. Like human thrombin, pig thrombin was capable of efficiently activating human protein C when complexed with human TM but not with pig TM (Figure 4D).

To confirm that the *in vitro*-expressed pig TM was functional in the absence of molecular incompatibilities, 5×10^5 transfectants in suspension were incubated with pig thrombin and pig platelet-poor plasma to measure their ability to activate pig protein C. The concentration of APC generated in 10 min was 12.3 ± 1.3 nM for pig TM-expressing cells and 10.9 ± 0.1 nM for human TM-expressing cells, with a background level of 4.7 ± 1.6 nM for vector-transfected cells. This indicated that both proteins were functional in the porcine protein C pathway.

EGF5 is the primary determinant of the compatibility of protein C activation

We constructed variants of pig and human TM in which EGF domains 4, 5 and/or 6 of one species were replaced with those of the other species. The linking regions between these domains are identical (Figure 3) and therefore did not require replacement. Substitution of either human EGF4 or EGF6 into pig TM did not significantly increase human thrombin cofactor activity (Figure 5A). However, human EGF5 alone improved the cofactor activity of pig TM from 10% relative to human TM to more than 40%; substitution of human EGF56 further increased activity to approximately 100%. Conversely, whereas substitution of pig EGF4 or EGF6 alone into human TM caused relatively modest reductions in cofactor activity, pig EGF5 alone or pig EGF56 reduced activity by 90% (Figure 5A). Similar results were obtained using pig thrombin (Figure 5B).

Pig TM is a poor cofactor for activation of human TAFI

Activation of human TAFI was measured by incubating transfectants expressing human or pig TM with thrombin and TAFI and monitoring the appearance of the 36 kDa TAFIa catalytic domain by electrophoresis. Only human TM generated detectable amounts of TAFIa (Figure 6). In conjunction with the results above, this suggests that a common molecular defect in the interaction between pig TM

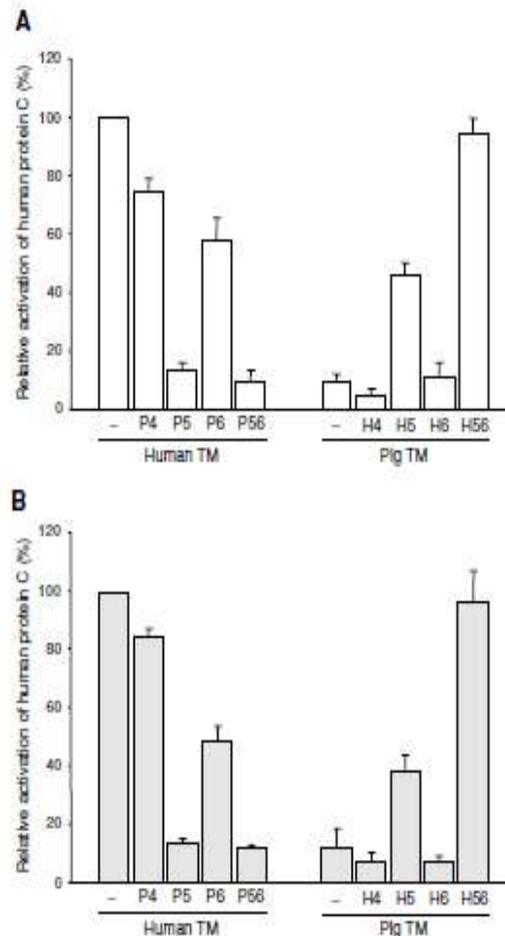


Figure 5: EGF5 is the primary determinant of molecular compatibility. Hybrid variants of human and pig TM constructed by swapping EGF4, 5, 6 or 5 + 6 were expressed on transiently transfected COS-7 cells and assayed for cofactor activity for activation of human protein C by human thrombin (A) or pig thrombin (B). Substituted domains are indicated as P4 for pig EGF4, etc.; no substitution is indicated as—.Relative to human TM, only variants containing human EGF5 showed more than 20% thrombin cofactor activity for human protein C. Results are presented as mean \pm SEM of at least three independent experiments.

and human thrombin affects the subsequent activation of both human protein C and TAFI.

Pig and human prothrombin are highly conserved

To investigate whether the inability of pig TM to efficiently promote activation of human protein C and TAFI might be related to structural differences between human and pig thrombin, we isolated a prothrombin cDNA from pig liver total RNA. The cDNA contained an 1869-bp open reading frame encoding a protein with the characteristic features of prothrombin (signal peptide, propeptide, Gla domain, two Kringle domains and the catalytic B chain) (data not shown). The amino acid sequence of the mature protein

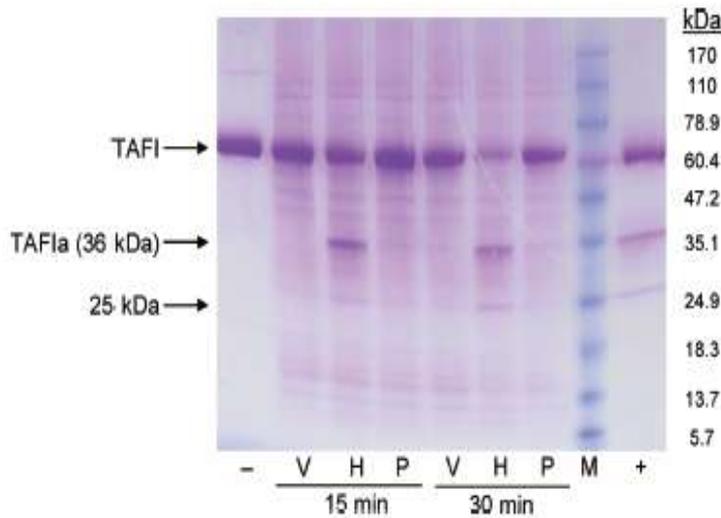


Figure 6: Pig TM is a poor cofactor for activation of human TAFI. COS-7 cells transiently transfected with human TM (H), pig TM (P), or vector alone (V) were incubated with human thrombin and human TAFI for 15 or 30 min, and after quenching the reaction with PPACK the supernatant was electrophoresed on a 4–20% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue. Other lanes: (–), thrombin and TAFI alone; (M), MW markers; (+), recombinant human TM incubated with thrombin and TAFI for 30 min. Significant activation of TAFI, indicated by the appearance of the 36 kDa catalytic domain, was promoted only by human TM. Gel is representative of two independent experiments.

was identical to the recently sequenced prothrombin from the Bana mini-pig inbred line (31) apart from two residues in the B chain. Alignment of the B chain with that of human prothrombin revealed 90.7% overall identity and complete conservation of amino acids shown to be important in the interaction of human thrombin with human protein C (32) and TAFI (Figure 7).

Discussion

TM plays a crucial anticoagulant and anti-inflammatory role in the microvasculature, primarily by binding thrombin and acting as its cofactor in the activation of protein C. Several years ago it was reported that pig endothelial cells activate human protein C poorly *in vitro* (23) and *ex vivo* (33). It was suggested that this was due to failure of pig TM to adequately bind human thrombin (23,34), which would affect both the antithrombin and the cofactor activities of the protein. For a pig-to-human solid organ xenograft, the consequences of diminished TM activity at the endothelial surface are potentially catastrophic. It is therefore important to understand the nature and degree of incompatibility between pig TM and its human binding partners. We found here that pig TM has at least some anticoagulant activity by binding human thrombin, but has only ~10% of the human protein C cofactor activity of human TM. This level of residual activity was somewhat higher than the 4% previously reported (23), but the latter estimate did not account for possible differences in TM expression in cultured pig and human endothelial cells. Data from human studies suggest that a 90% reduction in cofactor activity will have a functional impact on the control of coagulation. There is evidence for a link between TM gene polymorphisms and thrombotic disease, and one mutation estimated to reduce APC generation *in vivo* by only ~30% was associated with myocardial infarction (35). Furthermore, the detrimental effect of a deficiency in cofactor activity would not be limited

to coagulation because of the anti-inflammatory and anti-apoptotic properties of APC.

Our study has provided some insights into the nature of the molecular incompatibility but the precise mechanism is still unclear. We showed directly that pig TM binds human thrombin and has an anticoagulant effect. We also showed indirectly that pig EGF4 binds human protein C and induces any necessary conformational change in the activation peptide, because pig TM containing human EGF56 activated human protein C as efficiently as human TM. Why then was the pig TM/human thrombin complex unable to efficiently activate human protein C? We suggest that the positioning and/or conformational change of the catalytic site of human thrombin induced by binding to pig EGF56 may be sub-optimal for interaction with the activation peptide of bound human protein C. The domain swapping experiments identified EGF5 as the critical determinant of compatibility, despite it being the most highly conserved of EGF4–6, with EGF6 playing a lesser role. The only notable nonconservative amino acid difference in pig EGF5 was the replacement of the important acidic residue Glu-408 (27,28) with glutamine. It may be relevant that rat and canine TM also have glutamine at this position. In a series of studies examining cross-species function of TM, soluble human TM was shown to possess anticoagulant activity in both rats and dogs *in vivo* (36,37), indicating binding of endogenous thrombin, but was unable to activate protein C of either species *in vitro* (38). It was concluded that the species specificity of soluble human TM in rats was not attributable to the interaction between human TM and rat thrombin, but to the human TM/rat thrombin/rat protein C interaction (39). It would be interesting to examine the effect of different amino acid substitutions of Gln-410 on the species specificity of pig TM.

EPCR is an important modulator of TM cofactor activity, concentrating protein C at the endothelial surface and significantly enhancing its activation by TM/thrombin (5–7).

inhibits fibrinolysis and can therefore promote clot persistence. However, TAFI also plays a protective role by inactivating C3a, C5a and bradykinin. The overall outcome may depend on the relative importance of these diverse functions of TAFI *in vivo*, which has not been established, and the kinetics of production of the inflammatory mediators.

Our findings do not weaken the case for over expression of human TM to protect porcine xenografts. Although pig TM may sequester at least some of the thrombin generated in the procoagulant milieu of the xenograft endothelium, any positive effect will be outweighed by the failure to efficiently activate protein C. The benefits of elevated TM activity are evident from the pronounced protection observed when soluble human TM was added to fresh human blood perfusing pig livers *ex vivo* (42). However, we favor the approach of incorporating human TM into the xenograft itself by transgenic expression, to provide a longer term solution.

Acknowledgment

This study was funded in part by the Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC).

References

1. Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: Initial experience. *Nat Med* 2005; 11: 29–31.
2. Robson SC, Cooper DKC, d'Apice AJF. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2000; 7: 166–176.
3. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R et al. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 2000; 404:518–525.
4. Macias WL, Yan SB, Williams MD et al. New insights into the protein C pathway: Potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2005; 9(4 Suppl): S38–S45.
5. Fukudome K, Ye X, Tsuneyoshi N et al. Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J Exp Med* 1998; 187: 1029–1035.
6. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10212–10216.
7. Taylor FB, Jr., Peier GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation *in vivo*. *Blood* 2001; 97: 1685–1688.
8. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Jr., Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 1997; 96: 3633–3640.
9. Esmon CT. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* 2001; 29(Suppl 7): S48–S51.
10. Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 1995; 9: 946–955.
11. Bode W. The structure of thrombin, a chameleon-like proteinase. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2379–2388.
12. Overduin M, de BT. The plot thickens: How thrombin modulates blood clotting. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 267–269.
13. Yang L, Manithody C, Rezaie AR. Activation of protein C by the thrombin-thrombomodulin complex: Cooperative roles of Arg-35 of thrombin and Arg-67 of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 879–884.
14. Koeppel JR, Seitova A, Mather T, Komives EA. Thrombomodulin tightens the thrombin active site loops to promote protein C activation. *Biochemistry* 2005; 44: 14784–14791.
15. Xu H, Bush LA, Pineda AO, Caccia S, Di Cera E. Thrombomodulin changes the molecular surface of interaction and the rate of complex formation between thrombin and protein C. *J Biol Chem* 2005; 280: 7956–7961.
16. Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2445–2453.
17. Kokame K, Zheng X, Sadler JE. Activation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor requires epidermal growth factor-like domain 3 of thrombomodulin and is inhibited competitively by protein C. *J Biol Chem* 1998; 273: 12135–12139.
18. Schneider M, Nagashima M, Knappe S, Zhao L, Morser J, Nesheim M. Amino acid residues in the P6-P'3 region of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) do not determine the thrombomodulin dependence of TAFI activation. *J Biol Chem* 2002; 277: 9944–9951.
19. Campbell WD, Lazoura E, Okada N, Okada H. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 131–134.
20. Shinohara T, Sakurada C, Suzuki T et al. Pro-carboxypeptidase R cleaves bradykinin following activation. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 103: 400–404.
21. Conway EM, Van de WM, Pollefeyt S et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 2002; 196: 565–577.
22. Abeyama K, Stern DM, Ito Y et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel anti-inflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005; 115: 1267–1274.
23. Siegel JB, Grey ST, Lesnikoski B-A et al. Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin. *Transplantation* 1997; 64: 888–896.
24. Kopp CW, Grey ST, Siegel JB et al. Expression of human thrombomodulin cofactor activity in porcine endothelial cells. *Transplantation* 1998; 66: 244–251.
25. Kawakatsu T, Ogita H, Fukuhara T et al. Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J Biol Chem* 2005; 280: 4940–4947.
26. Bendtsen JD, Nielsen H, von HG, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; 340: 783–795.
27. Nagashima M, Lundh E, Leonard JC, Morser J, Parkinson JF. Alanine-scanning mutagenesis of the epidermal growth factor-like domains of human thrombomodulin identifies critical residues for its cofactor activity. *J Biol Chem* 1993; 268: 2888–2892.
28. Wood MJ, Sampol Benitez BA, Komives EA. Solution structure of the smallest cofactor-active fragment of thrombomodulin. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 200–204.
29. Wang W, Nagashima M, Schneider M, Morser J, Nesheim M. Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 22942–22947.

30. Gerlitz B, Hassell T, Vlahos CJ, Parkinson JF, Bang NU, Grinnell BW. Identification of the predominant glycosaminoglycan-attachment site in soluble recombinant human thrombomodulin: Potential regulation of functionality by glycosyltransferase competition for serine474. *Biochem J* 1993; 296(Pt 1): 131-140.
31. Chen Y, Tan W, Lu X et al. Full-length cDNA cloning and protein three-dimensional structure modeling of porcine prothrombin. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38: 93-99.
32. Hall SW, Nagashima M, Zhao L, Morser J, Leung LL. Thrombin interacts with thrombomodulin, protein C, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor via specific and distinct domains. *J Biol Chem* 1999; 274: 25510-25516.
33. Lawson JH, Daniels LJ, Platt JL. The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation. *Transplant Proc* 1997; 29: 884-885.
34. Schulte am Esch EJ, Rogiers X, Robson SC. Molecular incompatibilities in hemostasis between swine and men-impact on xenografting. *Ann Transplant* 2001; 6: 12-16.
35. Kunz G, Ireland HA, Stubbs PJ, Kahan M, Coulton GC, Lane DA. Identification and characterization of a thrombomodulin gene mutation coding for an elongated protein with reduced expression in a kindred with myocardial infarction. *Blood* 2000; 95: 569-576.
36. Hasegawa N, Kandra TG, Husari AW et al. The effects of recombinant human thrombomodulin on endotoxin-induced multiple system organ failure in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(6 Pt 1): 1831-1837.
37. Kaneko H, Joubara N, Yoshino M et al. Protective effect of human urinary thrombomodulin on ischemia-reperfusion injury in the canine liver. *Eur Surg Res* 2000; 32: 87-93.
38. Mohri M, Gonda Y, Oka M et al. The antithrombotic effects of recombinant human soluble thrombomodulin (rhtsTM) on tissue factor-induced disseminated intravascular coagulation in crab-eating monkeys (*Macaca fascicularis*). *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8: 274-283.
39. Takahashi Y, Hosaka Y, Imada K, Adachi T, Niina H, Mochizuki H. Species specificity of the anticoagulant activity of human urinary soluble thrombomodulin. *Thromb Res* 1998; 89: 187-197.
40. Rose AG, Cooper DKC. Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection. *Xenotransplantation* 2000; 7: 31-41.
41. Shimizu A, Meehan SM, Kozlowski T et al. Acute humoral xenograft rejection: Destruction of the microvascular capillary endothelium in pig-to-nonhuman primate renal grafts. *Lab Invest* 2000; 80: 815-830.
42. Shiraiishi M, Oshiro T, Taira K et al. Improved hepatic microcirculation by human soluble urinary thrombomodulin in the xeno-perfused porcine liver. *Transplantation* 2001; 71: 1046-1050.

IV.8 DISCUSSION

L'étude de la liaison de la TM porcine avec les facteurs de coagulation d'origine humaine était justifiée par plusieurs enjeux importants. Le premier était le rôle primordial joué par la TM dans l'activation de la PC. Nos résultats confirment malheureusement les soupçons soulevés par Siegel et Kopp (Siegel et al. 1997; Kopp et al. 1998) sur la quasi incapacité de la TM porcine à activer efficacement la protéine C humaine. Les conséquences de ce déficit d'activation de la PC au niveau du xéno greffon semblent potentiellement dramatiques au regard des complications thrombotiques létales de nouveau-nés ayant un déficit homozygote en protéine C ou du risque de survenu d'infarctus du myocarde en cas de mutation de la TM (Ireland et al. 1997; Kunz et al. 2000; Campbell et al. 2001; Kunz et al. 2002). Ces craintes s'appuient également sur les résultats des premières xénotransplantation de cœurs Gal-KO chez le babouin (Kuwaki et al. 2005) dont les survies pourtant prolongées jusqu'à 6 mois ont été compromises par la survenue d'une micro-angiopathie thrombotique.

Un autre enjeu est le problème de la barrière fonctionnelle d'espèce en xénotransplantation en dehors de tout problème immunologique. Notre étude vient ajouter à la liste des incompatibilités moléculaires d'espèce entre le porc et les primates, la voie de la protéine C et tout particulièrement la TM. Bien que théoriquement, sur plus de 130 espèces de mammifères, l'homme et le porc partagent de nombreuses similarités anatomiques d'organes (Valentin et al. 1999), la compatibilité au niveau moléculaire semble moins évidente comme l'on montré les études sur l'incapacité des molécules porcines régulant le système du complément à contrôler l'activation du complément humain au cours des rejets hyperaigus et vasculaires aigus (Dalmasso et al. 1991). Notre étude vient fournir quelques explications sur la nature même de cette incompatibilité moléculaire sans toute fois en préciser l'exact mécanisme. Nous avons démontré que la liaison TM- thrombine était conservée et que la TM porcine avait tout de même un effet anticoagulant par sa capacité à fixer et à inhiber la thrombine humaine. La liaison de la PC humaine avec la TM porcine semble être également préservée puisque la permutation du domaine EGF4, qui est le domaine responsable de la liaison de la TM avec la PC, ne corrige pas l'incapacité de la TM porcine à activer la PC et inversement, la TM humaine avec un domaine EGF4 porcin conserve encore sa capacité à activer la PC humaine. Les différentes permutations de domaines EGF réalisées dans notre étude, mettent en avant le domaine EGF-5 comme étant le déterminant critique de l'incompatibilité moléculaire bien qu'il soit le domaine le plus conservé parmi les domaines EGF 4, 5 et 6. La seule différence notable entre le domaine EGF-5 porcin et son homologue humain est le remplacement d'un important résidu d'acide glutamique en position 408 avec une glutamine (Nagashima et al. 1993; Wood et al. 2000). Il est intéressant de noter que la TM de rat et de chien présente également une glutamine en cette position. Hors deux études sur la spécificité moléculaire d'espèce de la TM ont montré que la TM soluble humaine

conservait une activité anticoagulante *in vivo* chez le rat et le chien par sa capacité à fixer la thrombine endogène (Hasegawa et al. 1996; Kaneko et al. 2000) mais était incapable d'activer la protéine C *in vitro* (Mohri et al. 1997). Les auteurs concluaient que la spécificité moléculaire d'espèce de la TM humaine chez le rat n'était pas attribuable à l'interaction entre la TM humaine et la thrombine du rat mais à l'interaction entre les trois composants du complexe TM humaine/ thrombine et PC du rat. En effet, le mécanisme précis de cette barrière moléculaire ne semble pas être un problème de réarrangements allostériques structurels du site actif de la thrombine induit par sa liaison avec la TM mais plutôt un problème d'orientation des sites actifs au sein de la TM. Fuentes- Prior, dans une analyse d'une structure cristallinienne du complexe thrombine α et domaines EGF456, a montré que les domaines EGF45 fixaient leur substrat de telle manière que le site d'activation de la protéine C était présenté de manière optimale au site actif de la thrombine sans provoquer de réarrangement allostériques de la thrombine (Fuentes- Prior et al. 2000). Ainsi, l'ensemble de ces résultats et ceux de notre étude nous suggèrent que l'incompatibilité de la voie de la protéine C dans une combinaison porc- primate est due à une présentation inadaptée du site de clivage de la protéine C au site actif de la thrombine humaine par la TM porcine en raison d'une configuration dimensionnelle différente du domaine EGF5 porcin par rapport à la TM humaine. Cette différence architecturale pourrait être provoquée par le remplacement de l'acide glutamique en position 408 chez l'homme par une glutamine chez le porc. La création d'une TM porcine mutante avec un acide glutamique à la place d'une glutamine en position 408 confirmerait notre hypothèse.

Le dernier enjeu important soulevé par cette étude est de savoir quels sont les moyens disponibles pour corriger cette incompatibilité d'espèce à l'origine d'un déficit local en PC activée au niveau du xéno greffon. Plusieurs moyens thérapeutiques sont à envisager pour corriger cette carence en PCa. Le premier pourrait être une supplémentation de la forme active de la PC. Cette approche a déjà été réalisée avec succès dans un modèle *ex-vivo* de rein porcin (Ramackers et al. 2008). La survie des xéno greffons perfusés avec du sang humain associé à un inhibiteur du complément était de 126 ± 78 min et était prolongée à 240 min après addition de PCa. L'ajout de PCa s'accompagnait aussi d'une diminution significative des taux en D-dimer et en complexes thrombine- antithrombine. Cette carence en PCa pourrait être également corrigée par l'administration de TM soluble comme l'a démontré Shiraishi et al. dans un modèle de perfusion *ex-vivo* de foie de porc (Shiraishi et al. 2001) où l'injection de TM soluble induisait une augmentation des taux en PCa et améliorait significativement la microcirculation hépatique. Cette approche pharmaceutique est cependant irréalisable chez l'homme en raison du risque hémorragique trop important qu'induirait l'injection de PCa ou de TM soluble au décours d'une intervention chirurgicale. Une autre approche mieux ciblée pour suppléer ce déficit local en PCa serait de créer des animaux transgéniques pour la TM humaine. Cette stratégie a été développée par le Dr. Karen

Dwyer dans le département d'immunologie de l'hôpital de St Vincent où une souris transgénique pour la thrombomoduline humaine a pu être obtenue. Les animaux exprimant le transgène pour la TM ne présentaient pas de complications hémorragiques lors des parturitions et lors des manipulations de routine. Cependant, ces souris avaient un temps de saignement prolongé et un phénotype plus résistant aux thromboses veineuses par rapport à des souris non-transgéniques (Nandurkar H 2007). La génération de porcs multi-transgéniques exprimant notamment la TM humaine est en cours d'obtention dans plusieurs équipes dont notamment le département d'immunologie de l'hôpital de St Vincent à Melbourne (résultats non montrés). Le choix d'un autre transgène pourrait être également possible afin d'améliorer l'activation de la PC. Il s'agit de l'EPCR qui est un récepteur jouant un rôle primordial dans l'activation de la PC puisque celle-ci est améliorée d'un facteur 20 *in vivo* lorsque la protéine C se fixe sur le récepteur EPCR (Stearns-Kurosawa et al. 1996; Fukudome et al. 1998; Taylor et al. 2001) au niveau de l'endothélium vasculaire. Cependant, la spécificité d'espèce de l'EPCR n'avait pas encore été étudiée dans un contexte de l'EPCR. Aucune étude n'avait recherché si l'EPCR porcin était capable de fixer la PC humaine et de présenter efficacement la PC au complexe TM porcine-Thrombine humaine. Afin d'explorer cette voie potentiellement compensatrice d'activation de la PC, l'étape suivante de mon travail de recherche a été de séquencer l'EPCR porcin et d'en étudier les propriétés physiologiques dans une combinaison porc- primate.

**V. PROJET III: Etude in vitro des troubles de la coagulation en
Xénotransplantation : Rôle de l'Endothelium Protein C Receptor
(EPCR) dans une combinaison porc-primate**

V.1 CLONAGE DE L'ADNC DU GENE PORCIN CODANT POUR L'EPCR

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Chris Moran.

V.1.1 AMPLIFICATION A PARTIR D'AMORCES DEGENEREES

De l'ARN total de poumon porcine a été utilisé comme source d'ARN codant pour l'EPCR porcine en utilisant les paires d'amorces suivantes F1/R1, F1/683, F1/734, 195/R1, 195/683, 195/734, 440/R1, 440/683 et 440/734. Plusieurs amplicons de taille attendue ont été générés en utilisant les amorces 440/R1, 440/683 et 440/734 (Figure 39).

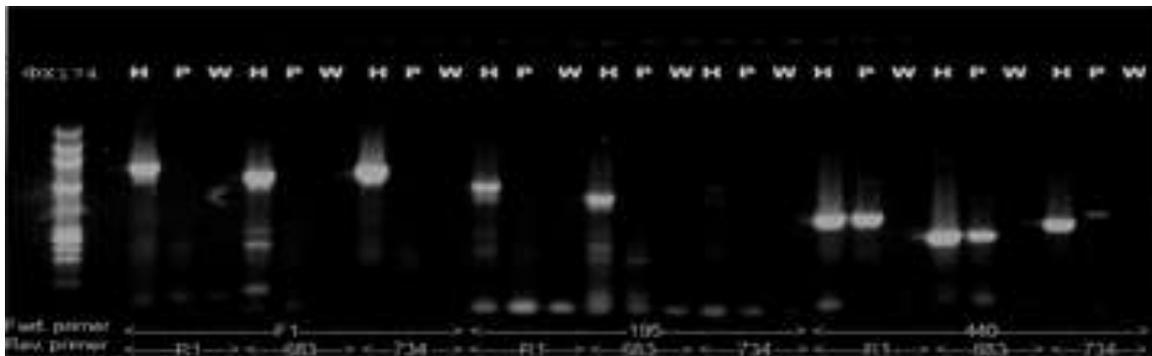


Figure 39 : Amplification de l'ADNc de l'EPCR porcine. Plusieurs fragments de taille attendue ont été isolés à partir d'ADNc de poumon porcine. (H : ADNc humain à partir de cellules EAhy926, P : ADNc porcine, W : pas d'ADNc). Les amorces sens sont listées sur la première ligne du gel et les amorces anti-sens sur la 2^{ème} ligne.

Le fragment amplifié avec l'amorce humaine R1 et l'amorce dégénérée 440 a été lié dans le vecteur pGEM-T easy vector pour être séquencé. Ce fragment présentait une homologie de 87% avec l'EPCR bovin avec 288/331 pb identiques.

V.1.2 AMPLIFICATION DES EXTREMITES DE L'ADNC DE L'EPCR PORCIN

V.1.2.1 Par méthode Marathon RACE et SMART RACE

Des amorces spécifiques de gène (GSPs) ont été conçues à partir du premier fragment d'EPCR porcine amplifié. Malgré l'utilisation de plusieurs systèmes enzymatiques (Taq, Expand system, Failsafe system, Advantage cDNA system et Advantage 2 system) et de plusieurs programmes PCR, aucune amplification des extrémités de l'ADNc de l'EPCR porcine n'a été possible en utilisant ces deux méthodes d'amplification RACE et différentes amorces GSPs.

Le séquençage de l'ADNc de l'EPCR porcine a été finalement possible en utilisant une nouvelle amorce 5'EPCR 0 qui a été conçue juste en amont du codon start et en utilisant EGSP1B ou EGSP1C comme amorces reverses (Figure 40).

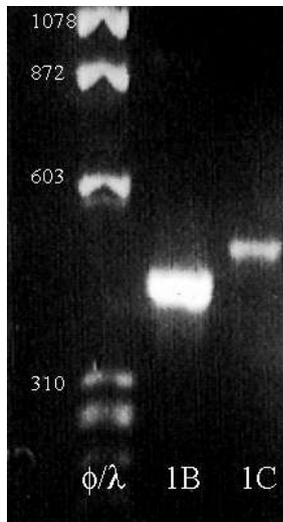


Figure 40 : Amplification de l'EPCR porcine en utilisant l'amorce 5' EPCR 0 et EGSP1B et EGSP1C comme amorce « reverse ».

Ces fragments ont été directement liés dans pGEM-T Easy pour séquençage. Les fragments issus des amorces 5' EPCR 0/ EGSP1B ou 5'EPCR 0/ EGSP1C partageaient 87% d'homologie sur 703 pb (612/703) avec l'EPCR bovine. Grâce au séquençage de ces derniers fragments, l'ADNc de l'EPCR porcine était isolé depuis le codon start jusqu'à l'extrémité 3'. Néanmoins, comme la séquence dérivée de l'amorce 5'EPCR 0 incluait le codon start, il a été décidé de poursuivre plus en amont le séquençage du gène.

V.1.2.2 Amplification de l'extrémité 5' non traduite de l'EPCR porcine

De nouveaux primers spécifiques de la région 5' non traduite de l'EPCR bovine et humaine ont été créés : 5' hEPCR UTR (5'hUTR) et 5' bEPCR UTR (5'bUTR). L'utilisation de ces amorces avec les amorces 683 ou R1 a permis l'amplification de plusieurs fragments (Figure 41).

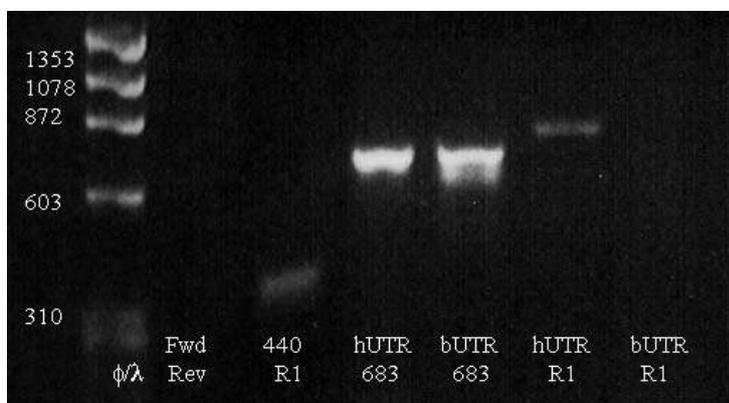


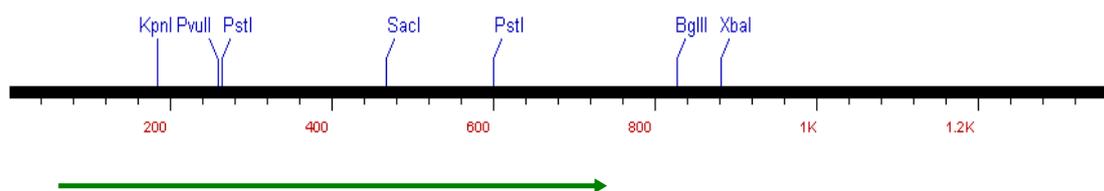
Figure 41 : Amplification de la région 5' non traduite de l'EPCR porcine en utilisant les amorces hUTR, bUTR avec les amorces 683 ou R1.

Le fragment amplifié à partir de la combinaison d'amorces R1-hUTR a été séquencé et a révélé qu'il partageait 86% d'identité sur 768 pb avec l'EPCR bovin.

V.2 ANALYSE ET CARACTERISATION DE L'ADNC DE L'EPCR PORCIN

V.2.1 ANALYSE DES SEQUENCES NUCLEIQUE ET PROTEIQUE DE L'EPCR PORCIN

L'ADNc de l'EPCR porcine amplifié comporte 1371 nucléotides avec un cadre de lecture de 725 pb (Figure 42 et Figure 43).



Cadre de lecture de l'EPCR porcine
= 725 pb

Figure 42 : cadre de lecture et sites de digestion enzymatique de l'EPCR porcine

La protéine porcine de l'EPCR est formée de 242 acides aminés avec un signal peptide potentiel de 18 résidus déterminé par l'alignement avec les séquences de l'EPCR bovin, humain et murin et selon l'analyse informatique par SignalP 3.0, conduisant à une protéine mature de 224 acides aminés. La comparaison de l'EPCR porcine avec les autres espèces mammifères ainsi que l'analyse informatique par NetNGlyc 1.0 prédit 4 potentiels sites de N-glycosylation. Quatre résidus cystéines sont retrouvés dans la portion extracellulaire.

```

          M L T T L L P L L 9
CGAGCCAGGAACCCAGGTGTGGTGGAGAACTTCAGCTACAGGATGTGACAACATTGCTGCCACTGCTGC 70

P L L F L P G W A L © S Q K V S D G P R D L R M 33
CTCTGCTGTTCTCTGCCCGGCTGGGCCCTCTGTAGCCAGAAAGTCTCAGATGGCCCGGGACCTCCGCAT 140

L Q V S Y F R S P S Q V W Y Q G N A T L G G I 56
GCTCCAGGTCTCTACTTCCGCAGCCCCCTCTCAAGTGTGGTACCAGGGCAACGCGACGCTGGGGGGTATT 210
Begin MHC/CD1 domain

L T H V L E G P G H N V T I Q Q L Q P L Q E ►P 79
CTGACCCACGTGCTGGAAGGTCCAGGCCACAATGTCACGATCCAACAGCTGCAGCCCTTGCAAGAGCCGG 280

E S W E L T K N S L E A Y L K E F Q G L V Q V V 103
AGAGCTGGAACTCACAAGAAGCAGCCTGGAGGCTTACCTGAAGGAGTTCAGGGTCTGGTGCAGGTGGT 350

H Q E R G V A F P L I V R © L L G © E L P P E 126
GCACCAAGAGCGGGCGTGGCCTTCTCTCATCGTTCGCTGCTTGCTGGGCTGCGAGCTGCCTCCTGAG 420

G S R A R V F F E V A V N G S S F M S F Q P E 149
GGGTCCAGAGCCCAGTCTTCTTGAAGTGGCTGTGAATGGGAGCTCCTTCATGAGTTTCCAGCCAGAGA 490

T A S W M A R P Q A A S R V V T Y T V E Q L N K 173
CGGCCTCATGGATGGCAAGGCCTCAGGCGGCCTCCAGAGTGGTCACCTACACCGTGGAGCAGCTCAACAA 560

Y N R T R Y E L R E F L Q D T © V Q Y V Q K H 196
GTACAATCGTACTCGGTACGAACGCGGAATTTCTGCAGGACACCTGTGTGCAGTACGTGCAGAAACAC 630
End MHC/CD1 domain

I ◀ T T H N L K G S Q T G R S Y T P L V L G I L 219
ATCACCACGCATAACTTGAAAGGAAGCCAAACAGGCCGCTCTACACGCCACTGGTCTGGGCATCCTGG 700

V G C F I I A G V A L C I F L Y V G G R R R C * 242
TGGGCTGTTTCATCATCGCAGGAGTGGCTCTATGCATCTTCTGTATGTAGGTGGACGGCGGCGATGTTA 770

ATTACTCACTGGCTCCCTCTGGAAAAGAGCTACACGGACGGGGGTCTGGCAAGGGAAGATCTCAGCTCAC 840
TGCCAAACCACAGCAATTTCCCATCTAGGACATTATATTCTAGAAGACTTGGGGTGGCAGTTCAATTTCT 910
TCTCCAAGATGTCCCCCAAGAATTTGAGGGAGGGGAGAAGAGGAGCCTAGGTAACAGGGTACTTGGT 980
TTGCTAAGAAGCCTAAGAACTTACATGCTTTGCTGAATTAGTCTGAGAAGTGAATGCATCTCCATATTCT 1050
GGAAAATAGAGGATGGAGTTGGGGCAATGGGGTGGTCCATGGCCCATCTACCAAAGACAGAAACACCTG 1120
AGGCCTTCAAGACCTAGCCAAATAAAACAAGTCTTCCCCAACCCAAGTAACCAATATTCAGCGACTCCAG 1190
GTATGTCAGACTTAGGTGGGACACTGGTACAATAAAGGTAGAATTAAACCAGAGAAATGATCGAAGGGTA 1260
AAATCCAAGTAACATGGGAGCAAGGAGCTGTTCATCAATCATTAATAATATTATAAAATTACAATGTTA 1330
TTAAAATATAAATTCCAAAAA 1371

```

Figure 43 : Séquences nucléotidique et protéinique de l'EPCR porcin. La séquence protéinique attendue est située au dessus de la séquence nucléique et la position est indiquée sur la droite. Le surlignage à une ligne représente le signal peptide et le surlignage à deux lignes représente le domaine transmembranaire. Les résidus pour une éventuelle N-glycolysation sont encadrés. Les résidus cystéine extra-cellulaires sont encerclés.

La recherche informatique de domaines conservés par le « NCBI Conserved Domain Search »(Marchler-Bauer et al. 2003) place le domaine similaire au MHC I/CD1 entre les résidus 79 et 197, ce qui correspond également à la même localisation pour l'EPCR bovin, humain et murin.

V.2.2 HOMOLOGIES ENTRE ESPECES MAMMIFERES

Le niveau d'homologie de l'EPCR porcine avec l'EPCR humain, bovin et murin est représenté dans le Tableau 10.

		pEPCR	hEPCR	bEPCR
hEPCR	<i>Identity</i>	71.5%		
	<i>Similarity</i>	80.6%		
	<i>Gaps</i>	1.7%		
bEPCR	<i>Identity</i>	82.6%	71.8%	
	<i>Similarity</i>	90.5%	81.7%	
	<i>Gaps</i>	0.4%	1.4%	
mEPCR	<i>Identity</i>	61.5%	65.7%	62.2%
	<i>Similarity</i>	76.5%	78.4%	76.8%
	<i>Gaps</i>	4.0%	4.1%	3.7%

Tableau 10 : Niveaux d'homologies dans la séquence peptidique de l'EPCR porcine avec d'autres espèces mammifères (h : humain, b : bovin, m : murin, p : porcine).

C'est avec l'espèce bovine que le porc partage la plus grande homologie pour l'EPCR avec 82,6% d'identités comme le démontre l'arbre phylogénique basé sur l'homologie de séquence protéique (Figure 44). L'EPCR humaine partage 71,5% d'acides aminés identiques avec l'EPCR porcine. L'EPCR murin partage 76,5% d'acides aminés similaires avec la molécule porcine mais il existe plusieurs différences entre les deux espèces. L'EPCR murin a quatre résidus de moins dans le signal peptide de 14 résidus et un acide aminé en moins dans la queue cytoplasmique mais il contient 5 résidus aminés supplémentaires dans sa portion extracellulaire. Ainsi, les portions extracellulaires de l'EPCR porcine, bovine et humaine contiennent 195 AA alors que la protéine murine 199. Comme pour le porc, il y a quatre possibles sites de N-glycosylation dans l'EPCR humaine et bovine. Un cinquième site existe cependant chez la souris. Les quatre résidus cystéines dans la région extracellulaire sont retrouvés également chez ces 3 espèces mammifères.



Figure 44 : Arbre phylogénique de l'EPCR basé sur l'homologie de séquence protéique.

(Zymed Laboratories Inc). Aucune détection de la molécule porcine n'a été retrouvée par rapport aux cellules exprimant l'EPCR humain (Figure 47).

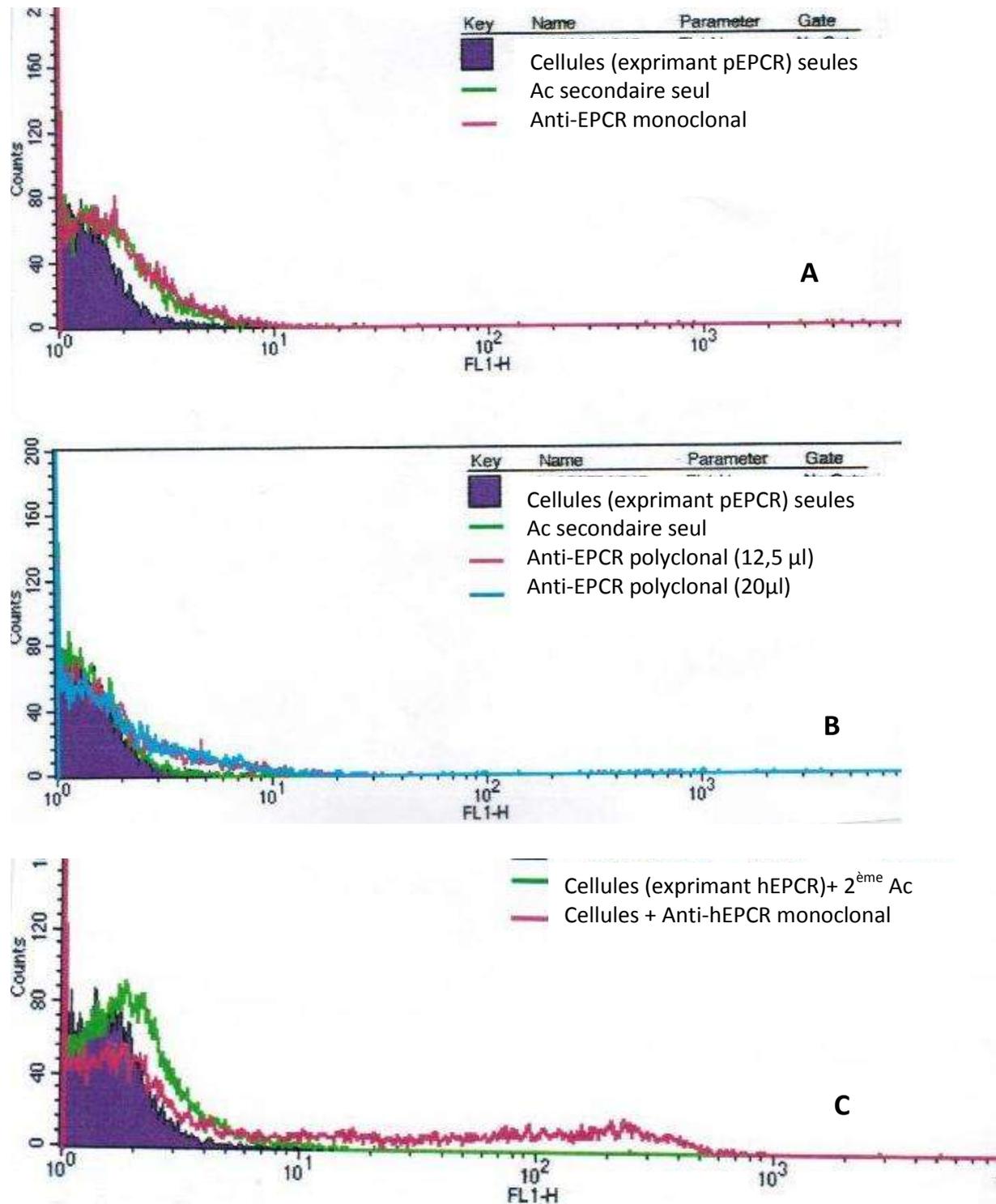


Figure 47 : Détection par FACS de l'EPCR porcine par un Ac monoclonal anti-EPCR humain (anti-CD201) (A), par un Ac polyclonal anti-EPCR humain (B). Contrôle positif (C) avec des cellules exprimant l'EPCR humain.

V.3.2 MARQUAGE PAR L'ÉPITOPE « FLAG » DE L'EPCR PORCIN

V.3.2.1 Amplification de l'EPCR-Flag porcine

Étant donné l'impossibilité de détecter l'expression de l'EPCR porcine avec les Ac anti-EPCR humains disponibles à l'époque sur le marché et de la difficulté à produire un propre Ac anti-EPCR porcine en laboratoire, nous avons décidé comme pour la TM porcine, de taguer la molécule avec un épitope Flag à son extrémité NH₂ (Figure 48).

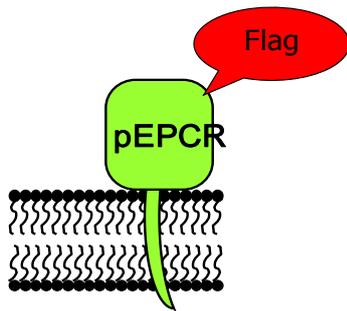


Figure 48 : Schématisation du marquage Flag de l'EPCR porcine.

Le cadre de lecture de l'EPCR porcine a été amplifié avec les amorces pEPCR-F2 et pEPCR-R2 qui intégraient dans leur séquence un site de clivage MluI. L'amplification PCR a été réalisée avec une Taq polymérase de haute fidélité Pfx avec ou sans Pfx enhancer (Figure 49).

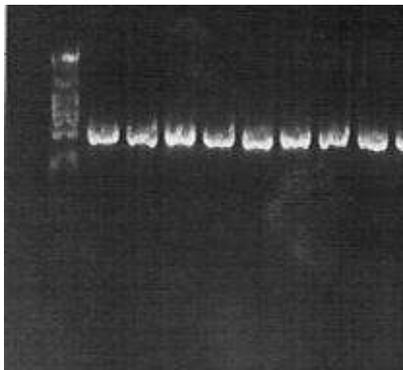


Figure 49 : Amplification PCR de l'EPCR porcine avec les amorces pEPCR-F2 et pEPCR-R2 afin d'intégrer un site MluI à chaque extrémité du cadre de lecture et en utilisant différentes concentrations de Pfx enhancer (résultats en duplicat).

Ce fragment de PCR a ensuite été lié dans le vecteur pBlunt pour l'amplification par miniprep puis maxiprep. Après digestion du vecteur pBlunt-pEPCR par MluI, le fragment d'ADNc était lié dans le vecteur pBos-Flag pour permettre l'intégration de l'épitope Flag dans la séquence de l'ADNc de l'EPCR porcine. Comme pour le vecteur pBlunt, pBos-Flag-pEPCR a été amplifié par miniprep et maxiprep.

V.3.2.2 Détection de l'EPCR porcine marqué par l'épitope Flag.

Des cellules COS-7 ont été transfectées par électroporation avec le vecteur pBos-pEPCR-Flag. L'épitope Flag a été détecté par FACS en utilisant un Ac monoclonal anti-Flag (WEHI monoclonal laboratory, Bundoora, Australia) (Figure 50). L'expression cellulaire de l'EPCR-porcine-Flag était facilement détectée alors que ces mêmes cellules étaient bien entendues non reconnues par l'Ac monoclonal anti-EPCR humain (Figure 50).

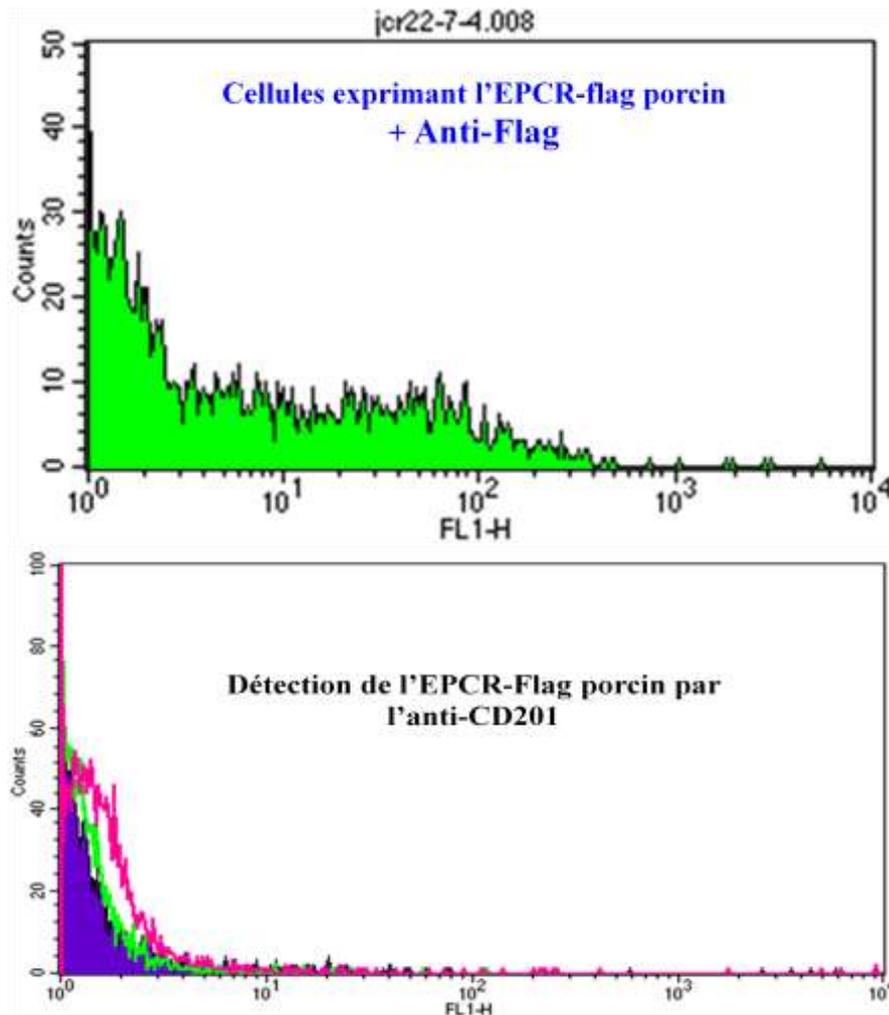


Figure 50 : Détection par FACS de l'expression cellulaire de l'EPCR-Flag porcine par un Ac anti-flag (en haut) et par l'Ac monoclonal anti-CD201 (en bas).

V.3.3 ETUDE DE LA LIAISON DE LA PROTEINE C HUMAINE AVEC L'EPCR PORCIN

V.3.3.1 Mise au point d'une méthode détectant la liaison de la PC sur l'EPCR

Afin d'étudier la fixation de la PC sur l'EPCR, nous avons mis au point une méthode expérimentale cellulaire utilisant des cellules Eahy 926 comme cellules témoins exprimant fortement l'EPCR (Figure 51)

et en incubant ces cellules avec de la PC humaine à différentes concentrations. Grâce à la stabilité de la liaison PC-EPCR et à des conditions expérimentales favorables à la stabilité de cette liaison (tampon HBSS, température en air ambiant), nous avons pu détecter la présence de PC sur les cellules par FACS en utilisant un Ac monoclonal de souris anti-protéine C humaine (AntibodyShop). La schématisation de cette méthode est représentée par la Figure 52 et les résultats par FACS sont indiqués dans la Figure 53.

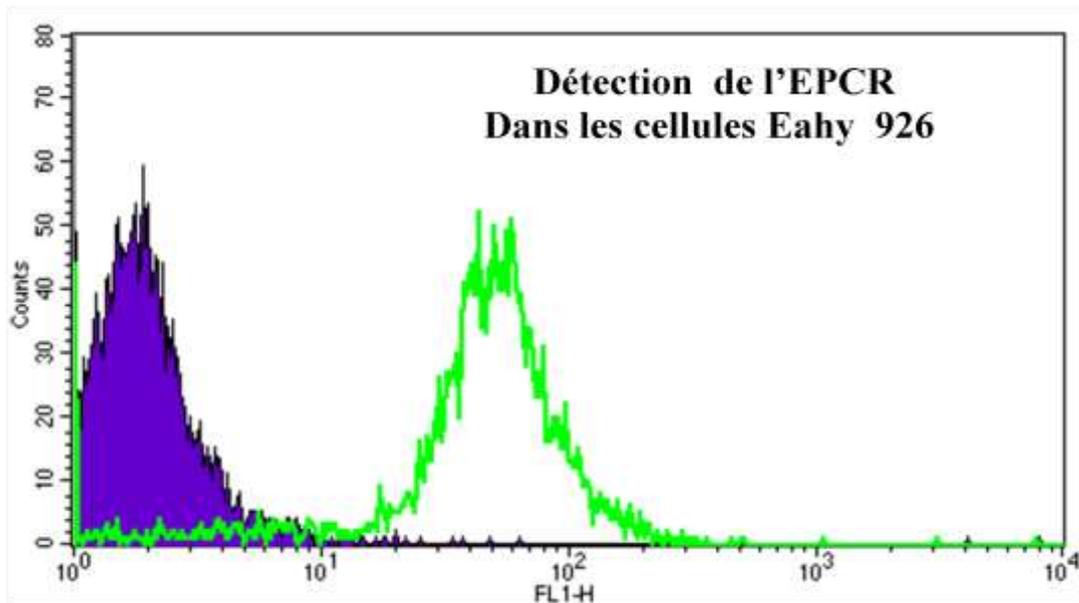


Figure 51 : Vérification de l'expression cellulaire de l'EPCR humain dans les cellules Eahy par FACS

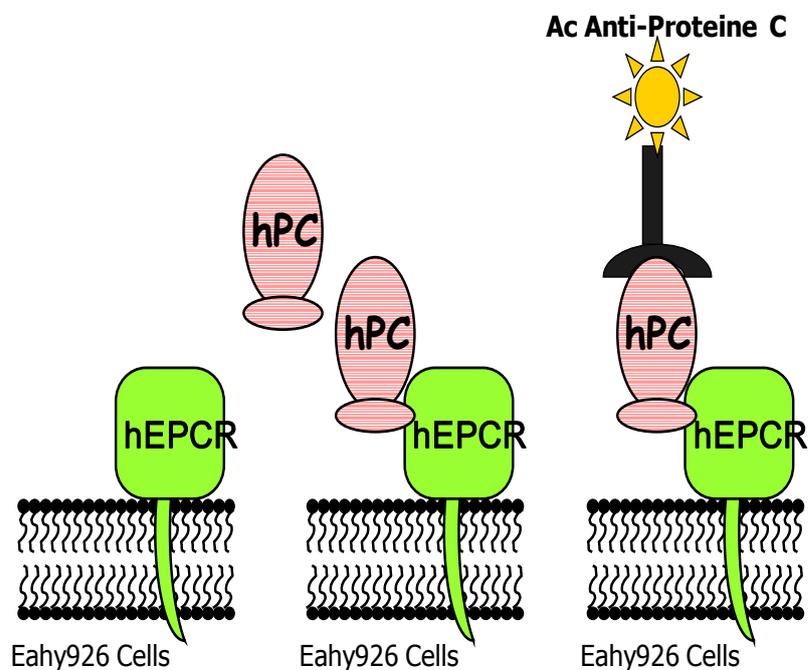


Figure 52 : Schématisation de la détection de la fixation de la PC sur l'EPCR par une méthode cellulaire et par FACS.

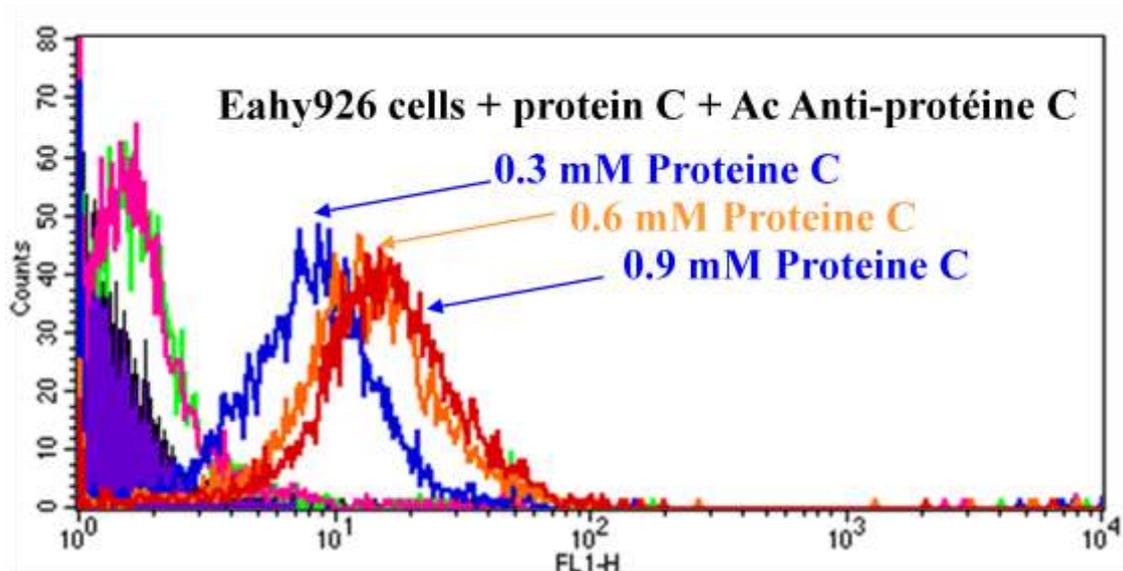


Figure 53 : Détection par FACS de la PC humaine après sa fixation sur des cellules Eahy 926. La fixation de la PC humaine a été testée à différentes concentration (0,3mM, 0,6 mM et 0,9 mM).

V.3.3.2 Etude par FACS de la liaison PC humaine – EPCR porcin

Après avoir mis au point la méthode, nous avons étudié dans les mêmes conditions expérimentales, la fixation de la PC humaine sur des cellules COS-7 exprimant l'EPCR-Flag porcin. Les résultats ont montré que l'EPCR porcin pouvait fixer la PC humaine à un niveau similaire obtenu avec l'EPCR humain et cela quelque soit la concentration en PC (0,3 mM à 0.9mM) (Figure 54).

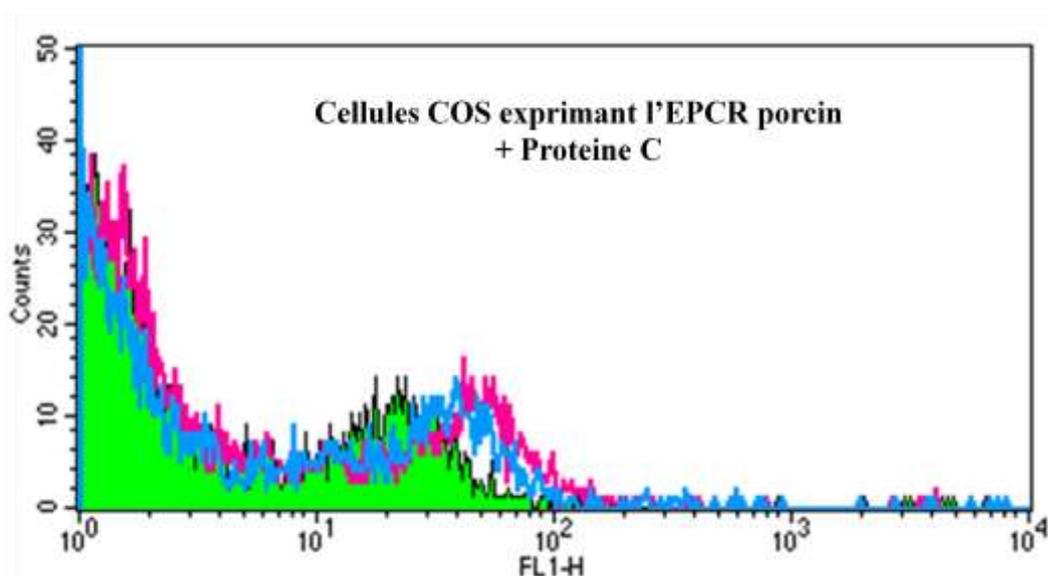


Figure 54 : Détection par FACS de la fixation de la PC humaine sur des cellules exprimant l'EPCR porcin. Les 3 courbes représentent 3 concentrations différentes de PC (0.3 mM ; 0.6mM et 0.9 mM).

La liaison PC humaine-EPCR porcin ne paraissait donc pas être également impliquée dans l'incompatibilité de la voie de la protéine C. Il restait alors à tester la fonctionnalité de cette liaison dans le mécanisme d'activation de la protéine C humaine en co-exprimant les deux molécules simultanément.

V.4.1 CO-EXPRESSION IN-VITRO DE L'EPCR PORCIN ET DE LA TM PORCINE

Des cellules COS-7 ont été transfectées simultanément par électroporation en associant deux vecteurs pBOS-Flag-pTM et pIRES-pEPCR. Seule la TM porcine était marquée par l'épitope flag afin d'être certain que la détection de cette épitope par FACS avec l'Ac anti-Flag ne correspondait qu'à la TM et non pas également à l'expression de l'EPCR-flag porcin. L'expression de la molécule EPCR porcine non marquée était quant à elle vérifiée en évaluant la fixation de la PC humaine sur ces cellules par FACS.

Parallèlement, une double transfection utilisant le vecteur pBos-Flag de la TM porcine avec l'EPCR humain était également réalisée. L'expression de l'EPCR humain était évaluée par FACS avec l'Ac anti-CD201. La quantité de plasmides utilisés lors de ces co-transfections était diminuée de moitié afin d'atténuer le risque cytotoxique lié à une quantité trop importante d'ADNc plasmidique.

V.4.2 FONCTIONNALITE DU COUPLE TM-EPCR PORCINS DANS L'ACTIVATION DE LA PROTEINE C HUMAINE

Nous avons utilisé pour ces cellules qui co-exprimaient la TM porcine et l'EPCR porcin ou l'EPCR humain les mêmes conditions expérimentales que pour l'étude de l'activation de la PC humaine par la TM porcine. Ainsi, alors que la TM porcine ne permettait d'activer seulement 10% de la PC humaine par rapport à la TM humaine, la co-expression de la TM porcine avec l'EPCR porcin ou humain permettait d'obtenir des taux d'activation en PC nettement supérieurs (Figure 55), bien que difficilement quantifiables et non comparables aux résultats obtenus avec la TM seule en raison de l'utilisation d'une quantité moindre d'ADNc et de deux vecteurs de niveaux d'expression cellulaire différents. Le vecteur pBos-Flag semble en effet induire un niveau d'expression plus puissant que le vecteur pIRES (résultats non montrés).

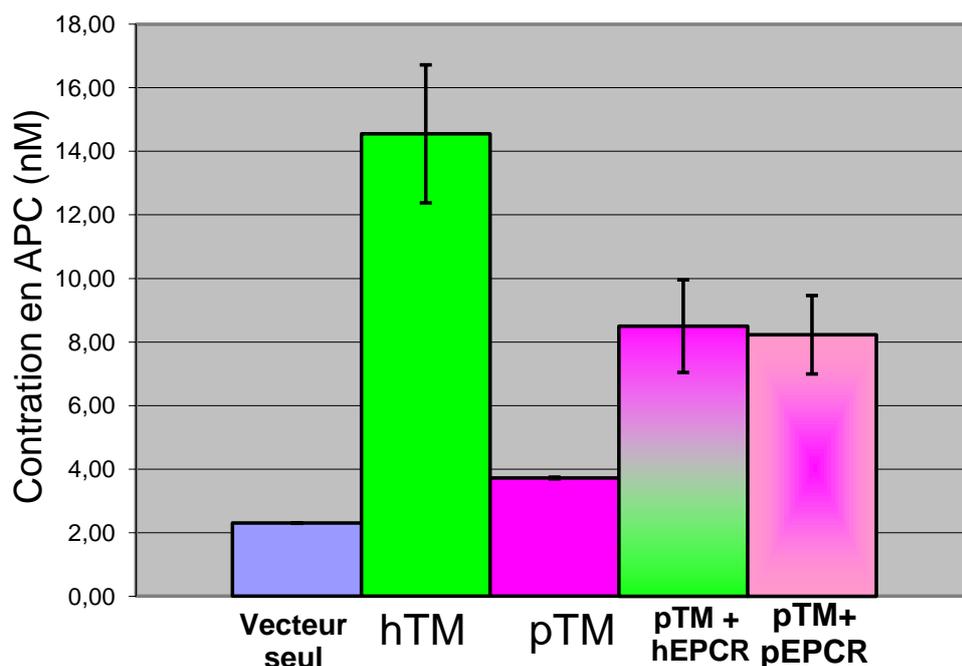


Figure 55 : Activation de la PC par la TM porcine seule ou en association avec l'EPCR porcine ou humaine. Détection par spectrophotométrie (Spectrozyme essay)

V.5 DISCUSSION

L'obtention d'une activation significative de la PC humaine par la TM porcine grâce à une co-expression associée de l'EPCR représentait pour nous une véritable avancée dans la compréhension de la physiopathologie de l'incompatibilité moléculaire d'espèce et surtout une voie d'approche pour vaincre le déficit en PCa. Même si le niveau d'activation de la PC était difficilement quantifiable et comparable aux résultats obtenus avec la TM porcine seule en raison de conditions expérimentales différentes, on avait de manière évidente une activation possible de la PC humaine par la TM porcine grâce à la surexpression associée de l'EPCR. D'un point de vue moléculaire, c'était une confirmation indirecte de la fixation possible de la thrombine humaine par la TM porcine car l'EPCR seul ne peut activer la protéine C si la thrombine n'est pas liée à la TM. L'apparition d'une activation possible de la PC humaine par la TM porcine s'expliquait donc à la fois par la fixation de la thrombine sur la TM et par l'augmentation de l'affinité de la PC au complexe TM-Thrombine par l'EPCR. En effet, l'activation de la protéine C est améliorée d'un facteur 4 à 8 *in vitro* (Stearns-Kurosawa et al. 1996) et d'un facteur 20 *in vivo* lorsque la protéine C se fixe sur le récepteur EPCR grâce à une augmentation de l'affinité de la protéine C au complexe thrombine-TM permise par la fixation de la PC à l'EPCR (Stearns-Kurosawa et al. 1996; Fukudome et al. 1998; Taylor et al. 2001). Cette augmentation est également dépendante de la concentration en EPCR même si sa concentration est en excès par rapport à la TM (Taylor et al. 2001).

Comme l'avait montré Fuentes dans une structure cristallinienne du complexe thrombine – TM-EGF456, la TM sert à fixer la PC pour que son site actif soit idéalement présenté au site actif de la thrombine afin d'être activé. Cette présentation optimale de la PC humaine au site actif de la thrombine qui ne pouvait être obtenue par la TM porcine seule, semblait ainsi être améliorée par la fixation de la PC à l'EPCR.

Les premières études *in vitro* de l'EPCR porcine n'ont pas mis en évidence de spécificité d'espèce concernant cette molécule puisque l'EPCR porcine fixait la PC humaine de la même manière que l'EPCR humain et que son expression permettait l'activation de la PC humaine par la TM porcine, à un niveau plus faible cependant par rapport à la TM humaine.

Sur-exprimer l'EPCR avec la TM porcine représentait donc une solution possible pour vaincre ou améliorer l'incompatibilité moléculaire de la voie de la protéine C en xénotransplantation. Nous avons donc assez d'arguments scientifiques pour générer un animal transgénique sur-exprimant l'EPCR. Le premier modèle animal devait être une souris transgénique pour des raisons de facilités d'obtention par rapport à un porc transgénique et par la facilité à tester les propriétés physiologiques d'un tel animal dans plusieurs modèles expérimentaux *in vivo*. Le choix sur l'origine d'espèce du transgène ne semblait pas avoir de conséquences sur les propriétés physiologiques d'un tel animal en raison de l'apparente absence de spécificité moléculaire d'espèce de l'EPCR. Cependant choisir l'EPCR humain permettait de mieux détecter le transgène par rapport à la molécule native, d'autant plus qu'il était connu que l'EPCR humain fixait également la PC de souris (Li et al. 2005). Au vue des propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques jouées par la PCa via l'EPCR, nous pouvions espérer obtenir d'autres bénéfices qu'une simple prévention de troubles de l'hémostase liés à un déficit en PC.

A cette époque, aucun animal transgénique sur-exprimant l'EPCR n'était connu de la littérature et nous ne savions pas si ce transgène était compatible avec une embryogénèse normale et avec un phénotype normal sans risque hémorragique élevé en raison du risque prononcé d'activation de la PC. Nous étions également conscients qu'il serait difficile de mimer une combinaison porc- primate avec une souris transgénique mais c'était un moyen fiable d'évaluer la viabilité du transgène et d'en explorer certaines propriétés physiologiques en testant notamment la souris dans des modèles expérimentaux de thrombose ou d'ischémie reperfusion. De plus, avec l'existence dans notre laboratoire d'une souris transgénique pour la TM humaine, nous avions l'espoir de pouvoir croiser ces deux lignées de souris afin d'obtenir des souris transgéniques pour la TM et l'EPCR. La TM humaine étant incompatible avec la thrombine du rat, il nous semblait possible de mettre au point un équivalent d'incompatibilité moléculaire comme entre le porc et le primate, en réalisant des xénogreffes hétérotopiques de cœur de souris chez le rat et en testant initialement des organes transgéniques pour la TM humaine puis des organes transgéniques pour la TM humaine et l'EPCR.

**VI. PROJET IV : Etude *in vivo* des troubles de la coagulation en
Xénotransplantation: Génération d'une souris transgénique pour la
molécule humaine EPCR**

VI.1 ELABORATION DU PLASMIDE POUR MICRO-INJECTIONS

VI.1.1 EXPRESSION IN VITRO DE L'EPCR HUMAIN

La séquence nucléotidique contenant le cadre de lecture de l'EPCR humain a été amplifiée en utilisant les amorces hEPCR-F3 et hEPCR-R3 afin d'intégrer deux sites de digestion SpeI et MfeI à chaque extrémité. L'amplification a été possible en utilisant une enzyme de haute fidélité Pfx (Invitrogen™) et le programme JCFG55PF. Le produit obtenu était de 0.7 Kb (Figure 56).

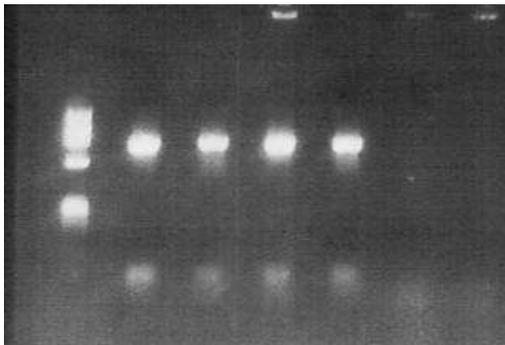


Figure 56 : Amplification PCR du cadre de lecture de l'EPCR humain avec les amorces hEPCR-F3 et hEPCR-R3.

Après purification, le fragment amplifié a été lié dans un vecteur plasmidique, pCR-Blunt pour séquençage et amplification par mini-prep et maxi-prep (Figure 57).

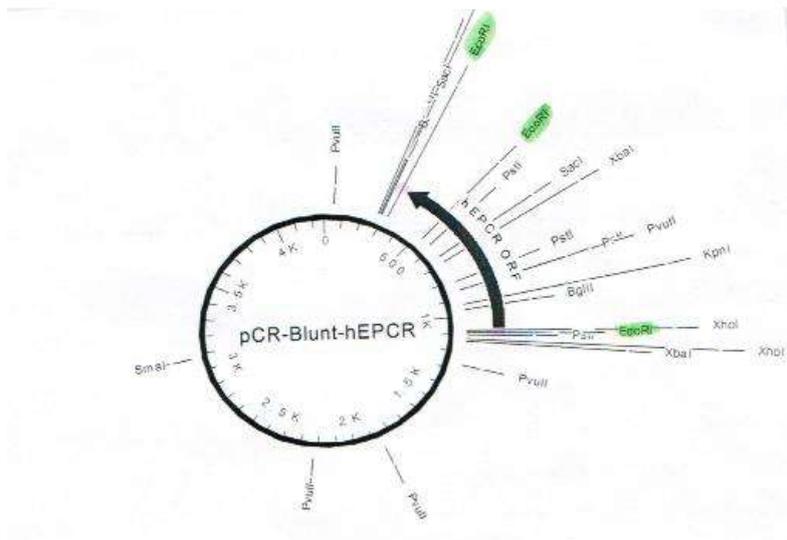


Figure 57 : Cartographie du vecteur pCR-Blunt-hEPCR

L'insert a ensuite été libéré après digestion enzymatique par SpeI pour ensuite être lié dans un autre vecteur plasmidique pEF-BOS vecteur (sans la séquence flag). Après amplification par mini et maxiprep de ce vecteur, l'expression cellulaire a été vérifiée en transfectant des cellules COS-7 avec pEF-Bos-hEPCR par électroporation. Après 24h en culture, les cellules transfectées étaient incubées avec un anticorps

monoclonal anti-EPCR humaine (CD201) (BD Biosciences) puis avec un anticorps secondaire FITC de rat (1/100) pour une analyse par cytométrie de flux (Figure 58).

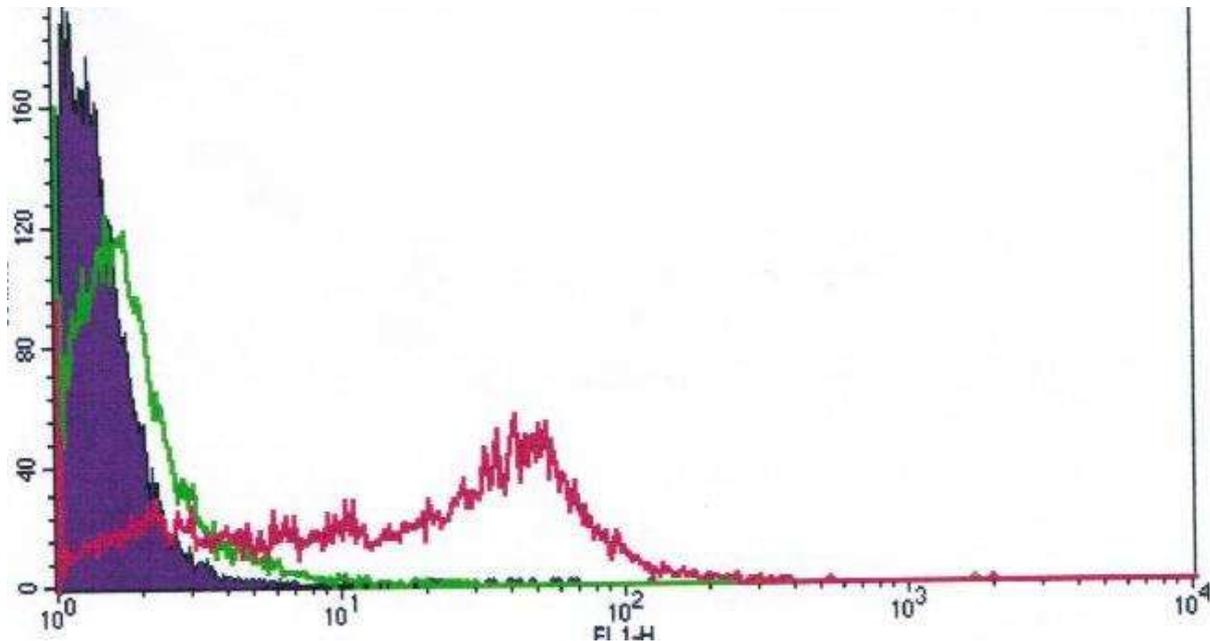


Figure 58 : Détection par FACS de l'expression cellulaire de l'EPCR humaine après transfection de cellules COS-7 par pBos-hEPCR afin de vérifier l'intégrité du transgène avant micro-injection

VI.1.2 PREPARATION DU PLASMIDE H2KB-hEPCR POUR MICRO-INJECTION

Après digestion de pBOS-hEPCR par Eco-RI pour libérer l'insert, le fragment obtenu a été intégré dans le site Eco-RI du vecteur murin H-2Kb contenant un TCR α enhancer, un promoteur CMH de classe I, un intron hybride et un signal SV40 retard de polyadénylation (Figure 59). Ce vecteur avait déjà été utilisé dans le laboratoire pour l'expression de plusieurs gènes dont CD55 et CD59 humains chez la souris et le porc, avec un large niveau d'expression particulièrement fort au niveau de l'endothélium vasculaire (Cowan et al. 2000). Les différents clones obtenus ont été sélectionnés après contrôle de la bonne présence de l'insert et de sa bonne orientation dans le plasmide. Le plasmide a été nommé H2Kb-hEPCR. Le fragment compris entre le promoteur, l'intron, l'ADNc de l'EPCR humaine et le signal de polyadénylation a été excisé de la colonne plasmidique après une double digestion par XhoI et Not I. Le fragment obtenu était ensuite purifié et dilué à une concentration de 10 ng/ μ l pour les micro-injections dans des ovocytes de souris fertiles CBA/ C7B16 F1.

Les micro-injections étaient réalisées au sein même de l'équipe par Mme Helen Barlow, du laboratoire de recherche d'immunologie de l'hôpital St Vincent.

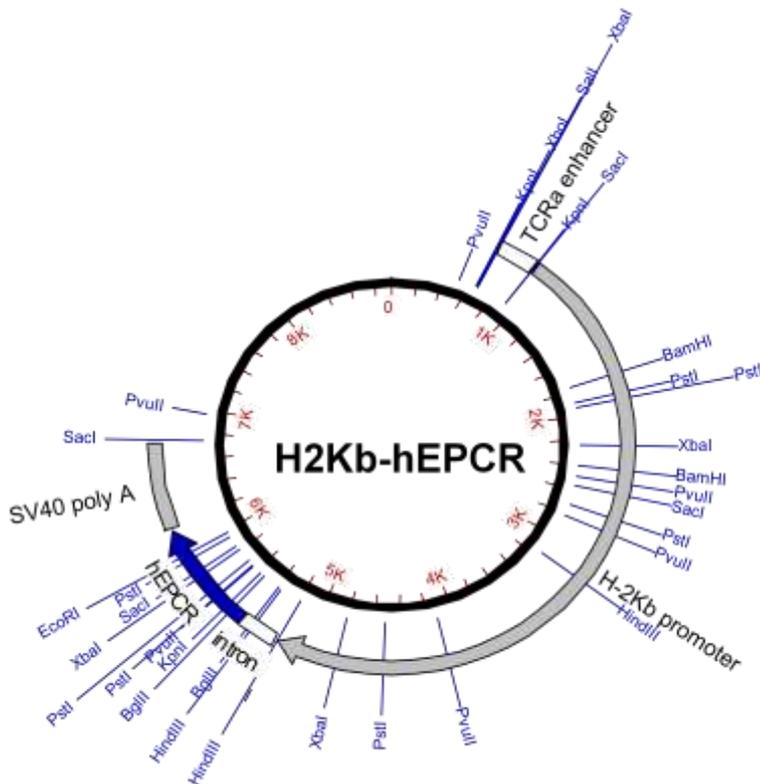


Figure 59 : Cartographie du plasmide H2Kb-hEPCR utilisé lors des micro-injections.

VI.2 NAISSANCE ET DEPISTAGE DES SOURIS TRANSGENIQUES POUR L'EPCR HUMAIN

VI.2.1 PHENOTYPE DES SOURICEAUX

Aucun effet délétère direct du transgène n'a été remarqué au cours des grossesses. Les portées semblaient normales sans augmentation du nombre de mort in-utéro ou après la naissance. Le phénotype des souriceaux semblait normal. Vingt-sept souris ont été obtenues après une série de plusieurs micro-injections et ont été dépistées pour la présence du transgène.

VI.2.2 DEPISTAGE DU TRANSGENE PAR PCR

La présence du transgène a été dépistée par PCR, à partir d'ADN génomique obtenu de la queue de l'animal. Sur 27 souris nées après micro-injection, 7 ont été retrouvées porteuses du transgène (Figure 60).

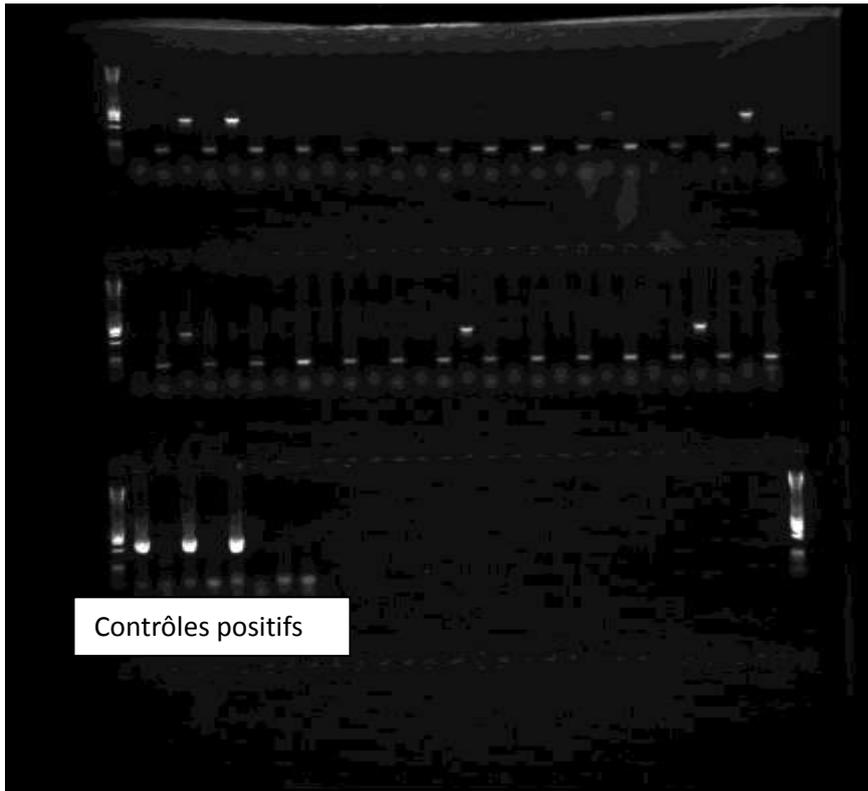


Figure 60 : Dépistage par PCR de la présence dans le génome des souris du transgène hEPCR.

VI.2.3 EXPRESSION DE L'EPCR HUMAIN SUR LES CELLULES SANGUINES PERIPHERIQUES

Le promoteur H-2Kb produit une expression du transgène largement répandue à tous les tissus et aux cellules sanguines circulantes de la lignée blanche (Cowan et al. 2000). L'expression de l'EPCR humain a donc été recherchée par cytométrie de flux à partir de leucocytes prélevés chez les souris dont le transgène était détecté par PCR en utilisant un Ac anti-CD201 humain (EPCR) conjugué. Sur les 7 souris porteuses du transgène, 5 exprimaient l'EPCR humain à des niveaux d'expressions différents (Figure 61).

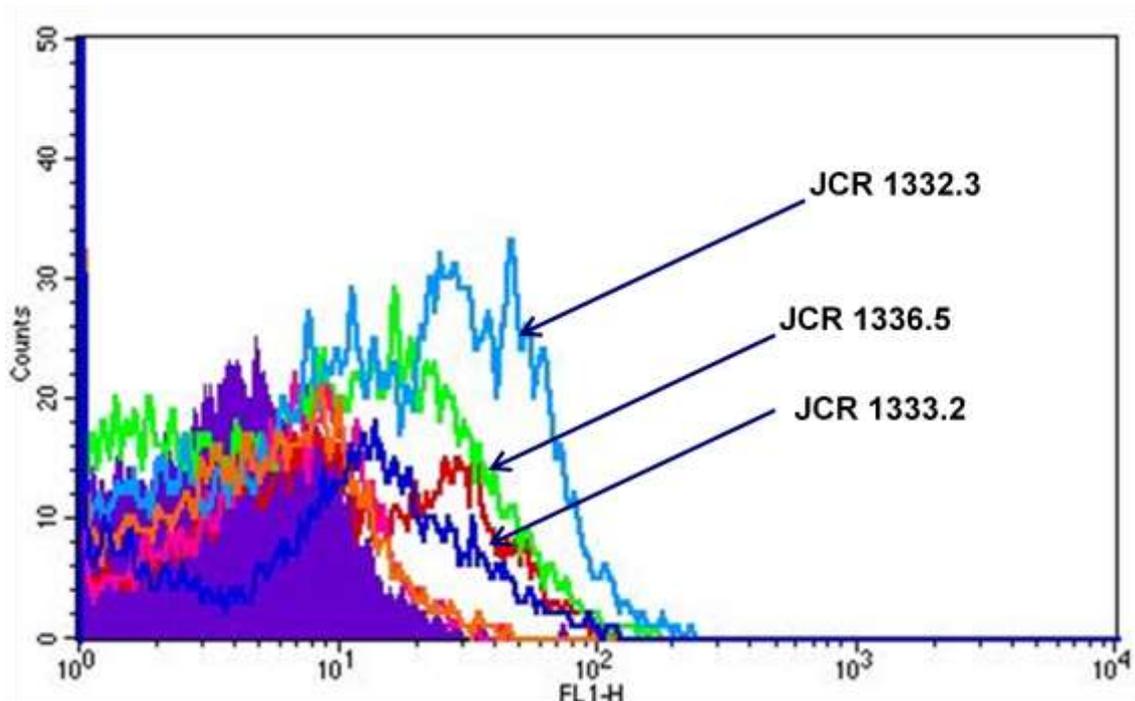


Figure 61 : Dépistage de l'expression de l'EPCR humain chez les 7 souris porteuses du transgène. Cinq souris exprimaient la molécule à des niveaux différents. Les animaux les plus expresseurs étaient les souris JCR 1332.3 (++++), JCR 1333.2 (++) et JCR 1336.5 (+++).

Seules les trois souris les plus « expresseurs » (Figure 61) ont été maintenues en vie (JCR 1332.3, JCR 1336.5 et JCR 1333.2) pour élevage et génération de lignées transgéniques (Figure 62).

L'expression et l'incorporation du transgène paraissait n'avoir aucun impact sur la fertilité des males et des femelles qui avaient des portées considérées comme normales de 3 à 9 souriceaux. La première génération appelée « génération A » a été dépistée en cytométrie de flux. Le transgène était transmis de manière autosomique dominante.

Parents	Mouse #	coat	sex	genotype	phenotype	
		colour		PCR	FACS	
JCR #1330	1	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	2	Bl	F	+ve	POS+	BREED x1 litter
	3	Bl	F	+ve	POS++	BREED x1 litter
	4	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	5	Bl	M	NEG	NEG	CULL
JCR #1331	1	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	2	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	3	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	4	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	5	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	6	Bl	M	+ve	NEG	CULL
JCR #1332	1	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	2	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	3	Bl	M	+ve	POS+++	BREED x3 litters, then keep mating 2 wkly
JCR #1333	1	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	2	Bl	F	+ve	POS++	BREED x1 litter
	3	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	4	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	5	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	6	Bl	M	NEG	NEG	CULL
JCR #1335	1	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	2	Bl	M	+ve	NEG	CULL
JCR #1336	1	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	2	Bl	F	NEG	NEG	CULL
	3	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	4	Bl	M	NEG	NEG	CULL
	5	Bl	M	+ve	POS+++	BREED x1 litter

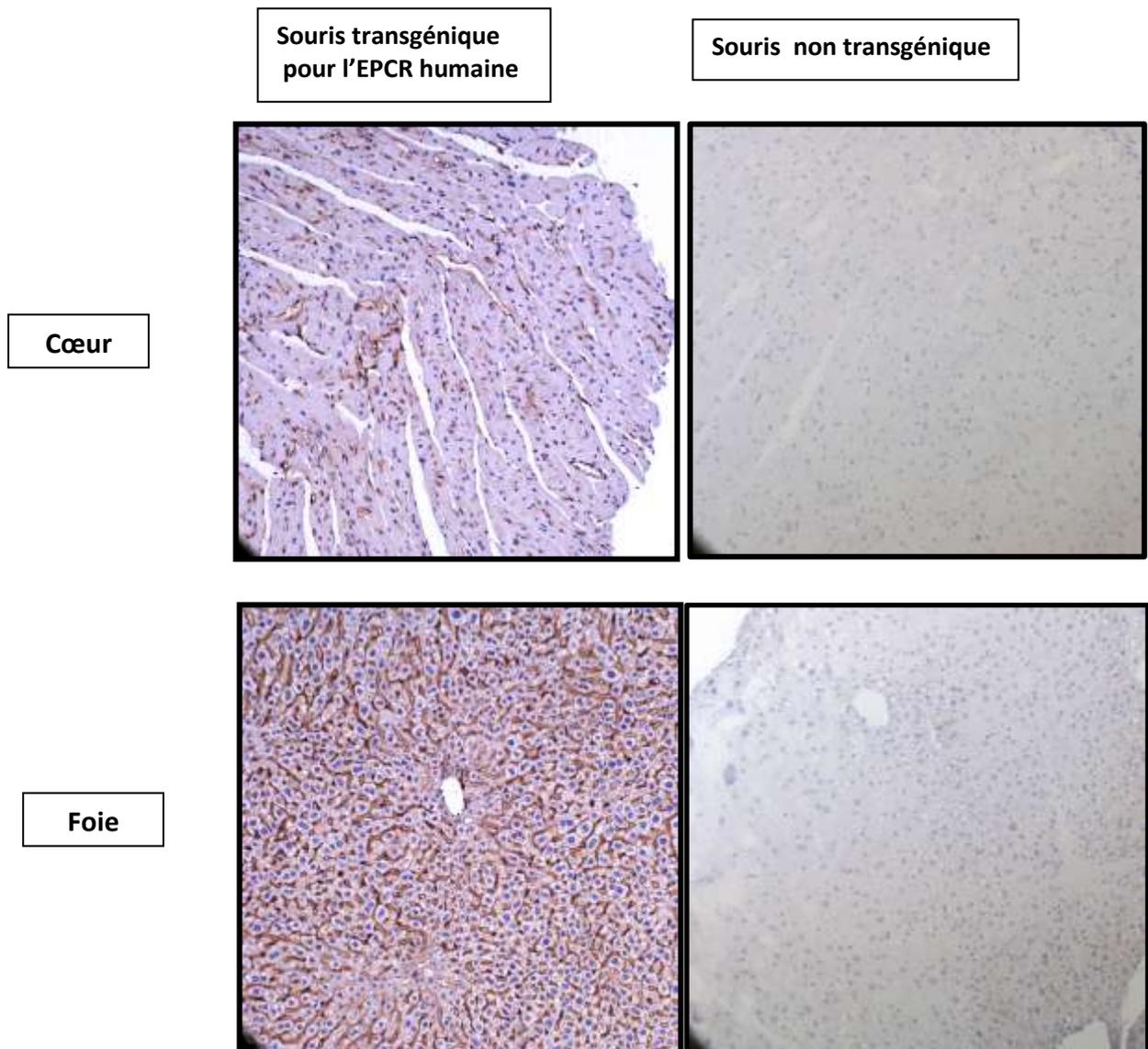
Figure 62 : Répertoire des différentes lignées de souris transgénique après micro-injection pour l'EPCR humain.

VI.3 PHENOTYPAGE DES SOURIS TRANSGENIQUES POUR L'EPCR HUMAIN

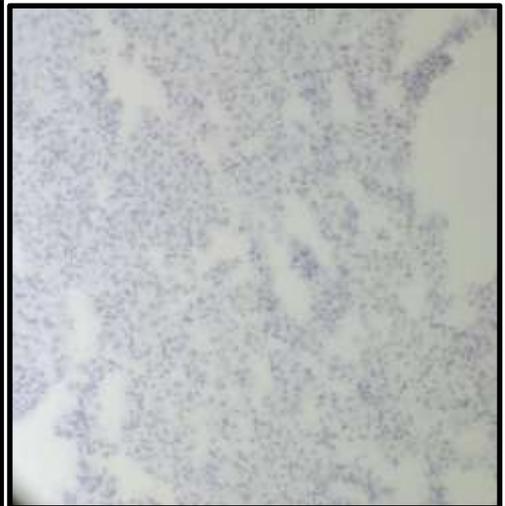
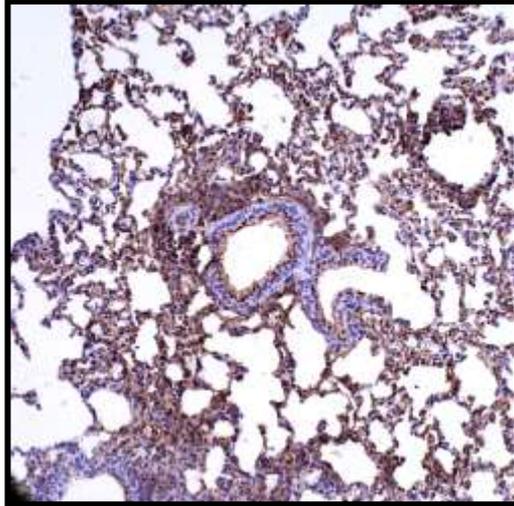
VI.3.1 EXPRESSION TISSULAIRE DE L'EPCR HUMAIN

VI.3.1.1 Détection Immunohistochimique

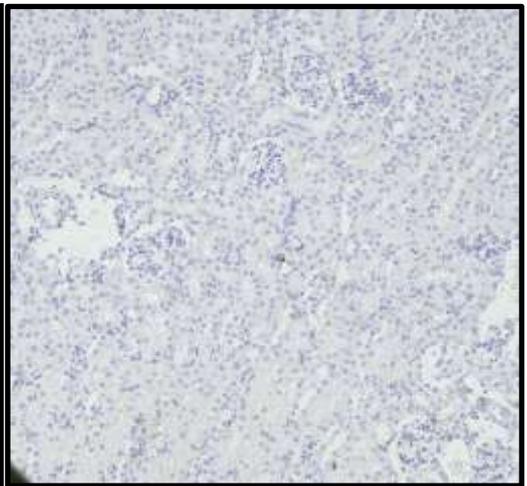
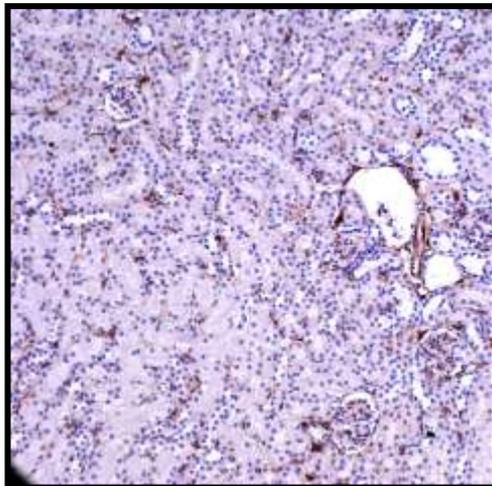
L'expression tissulaire du transgène a été analysée par immunohistochimie dans le cœur, le rein, le poumon et le foie. Des biopsies issues d'animaux non transgéniques étaient utilisées comme contrôles négatifs (Figure 63).



Poumon



Rein



Pancréas

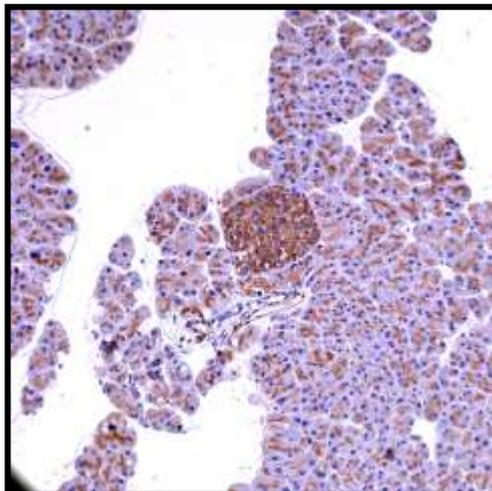


Figure 63 : Marquage du transgène EPCR humain par immuno-histochimie

VI.3.2 CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DE LA SOURIS TRANSGENIQUE POUR L'EPCR HUMAIN

Les souris transgéniques étaient similaires au phénotype sauvage des souris de même lignée en termes de poids, d'activité et de fertilité. L'examen macroscopique des organes internes ne révélait aucune différence morphologique, en poids ou en taille. Il n'y avait pas de complications hémorragiques plus fréquentes lors des parturitions chez les femelles ou lors des procédures de routine telles que le prélèvement de sang au niveau orbitaire ou au niveau de la queue des animaux.

VI.3.3 PARAMETRES HEMATOLOGIQUES

Les paramètres biologiques étaient tous dans des valeurs normales par rapport à des animaux non-transgéniques.

VI.3.4 TEST D'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

Les plaquettes s'agrègent normalement lorsqu'elles sont exposées à des stimuli tels que l'ADP ou le collagène. Cette agrégation plaquettaire peut être analysée ex-vivo en utilisant un agrégomètre chromogénique à lumière transmise. Ce système enregistre la transmission de lumière au travers d'un échantillon et cette transmission augmente dès que les plaquettes s'agrègent. En réponse à des stimuli, les plaquettes modifient leur morphologie et commencent à s'agréger. C'est l'agrégation primaire. Cette étape initiale est accélérée par la libération d'ADP intracellulaire, à l'origine d'un rebond secondaire dans l'agrégation plaquettaire.

Pour examiner l'agrégation plaquettaire de la souris H2kB-hEPCR par rapport à des souris non-transgéniques, des plaquettes issues d'animaux transgéniques et non-transgéniques ont été prélevées puis lavées et resuspendues à une concentration de $2 \times 10^5 / \mu\text{l}$ dans une solution riche en calcium et fibrinogène. Les plaquettes issues de souris transgéniques présentaient une agrégation normale et une réponse adaptée à l'ADP par rapport à des souris normales (Figure 64).

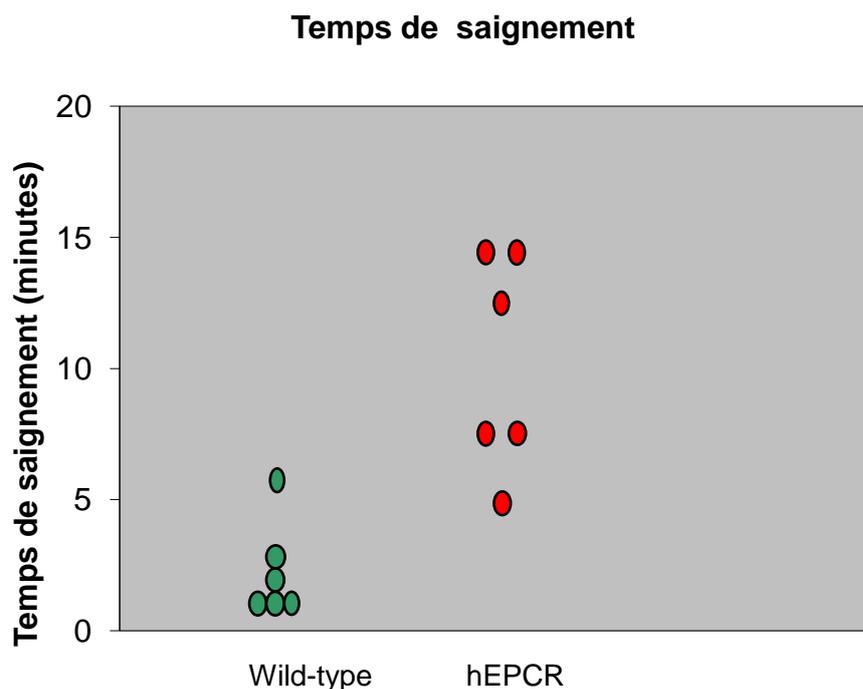


Figure 65 : Temps de saignement obtenu après section de la queue des animaux transgéniques pour l'EPCR humaine par rapport à des animaux non- transgéniques.

VI.4 RESISTANCE DE LA SOURIS TRANSGENIQUE POUR L'EPCR HUMAIN DANS UN MODELE D'INDUCTION DE THROMBOSE EMBOLIQUE DE L'ARTERE PULMONAIRE

Ces résultats ont été obtenus grâce au travail d'Eddy Lee et Lisa Murray-Segal du département d'immunologie de l'hôpital Saint Vincent à Melbourne.

La thrombose intra-vasculaire, qui est une lésion caractéristique des xénorejets, peut être induite expérimentalement en provoquant une agrégation plaquettaire par injection intraveineuse de collagène. Afin de déterminer si l'expression de l'EPCR humain pouvait conférer une protection vis-à-vis de la thrombose, du collagène seul ou en combinaison avec de l'ADP était administré par la veine jugulaire à des animaux transgéniques et non transgéniques. La dose létale minimale a été déterminée expérimentalement avec des souris non transgéniques et selon les travaux de Favre et al (Fabre et al. 1999). La concentration en ADP était constante à 200 μ M. La plus petite dose de collagène avec laquelle tous les animaux sauvages décédaient d'une embolie pulmonaire était 60 μ g/ml. La procédure a été réalisée chez 9 souris sauvages et 8 souris transgéniques à la dose de 60 μ g/ml de collagène ainsi que chez 4 animaux sauvages à la dose de 50 μ g/ml. L'ensemble des paramètres expérimentaux et des résultats en terme de survie sont indiqués dans le Tableau 11 .

Souris	phenotype	Age	sexe	Poids (g)	dose (μ g)	Début	fin	Survie
JCR 1332-3 B:139	WT	73	f	21,2	0,6	10:49:00	10:54:00	00:05:00
JCR 1332-3 C:112	WT	100	f	22,6	0,6	10:33:00	10:36:00	00:03:00
JCR 1332-3 C:131	WT	86	f	20,7	0,6	11:47:38	11:52:15	00:04:37
JCR 1332-3 C:154	WT	64	f	20,3	0,6	12:38:05	12:42:52	00:04:47
JCR 1332-3 C:153	WT	64	f	20	0,6	01:07:41	00:00:00	>24hrs
KA 1079-4 O:156	WT	73	f	20,2	0,6	09:49:50	00:00:00	>24hrs
KA 1079-4 O:166	WT	73	f	20	0,6	10:07:40	10:11:10	00:03:30
KA 1079-4 O:168	WT	73	f	22,3	0,6	09:44:03	09:46:40	00:02:37
KA 1079-4 O:169	WT	73	f	21,1	0,6	09:33:44	09:36:41	00:02:57
JCR 1332-3 C:122	EPCR het	89	f	22,2	0,6	10:21:30	00:00:00	>24hrs
JCR 1332-3 C:132	EPCR het	86	f	04:48	0,6	10:36:30	00:00:00	>24hrs
JCR 1332-3 C:130	EPCR het	86	f	20	0,6	11:58:40	00:00:00	>24hrs
JCR 1332-3 C:123	EPCR het	89	f	21,3	0,6	12:10:17	12:13:18	00:03:01
JCR 1332-3 C:141	EPCR het	74	f	20,5	0,6	12:21:30	00:00:00	>24hrs
JCR 1332-3 C:136	EPCR het	86	f	20,3	0,6	12:33:24	00:00:00	>24hrs
JCR 1332-3 C:163	EPCR het	66	f	21,7	0,6	12:49:18	00:00:00	>24hrs
JCR 1332-3 C:164	EPCR het	66	f	20,4	0,6	12:55:57	12:58:33	00:02:36
KA 1079-4 O:165	WT	73	f	20,7	0,5	09:57:48	00:00:00	>24hrs
KA 1079-4 O:167	WT	73	f	19,1	0,5	10:14:31	10:17:17	00:02:46
JCR 1332-3 B:137	WT	73	f	21,2	0,5	11:03	00:00:00	>24hrs
JCR 1332-3 B:146	WT	57	f	21,9	0,5	11:10	00:00:00	>24hrs

Tableau 11 : Conditions expérimentales du modèle d'induction de thrombose jugulaire.

La survie obtenue dans le groupe transgénique a été significativement plus élevée par rapport au groupe sauvage (75% versus 22%) (Figure 66).

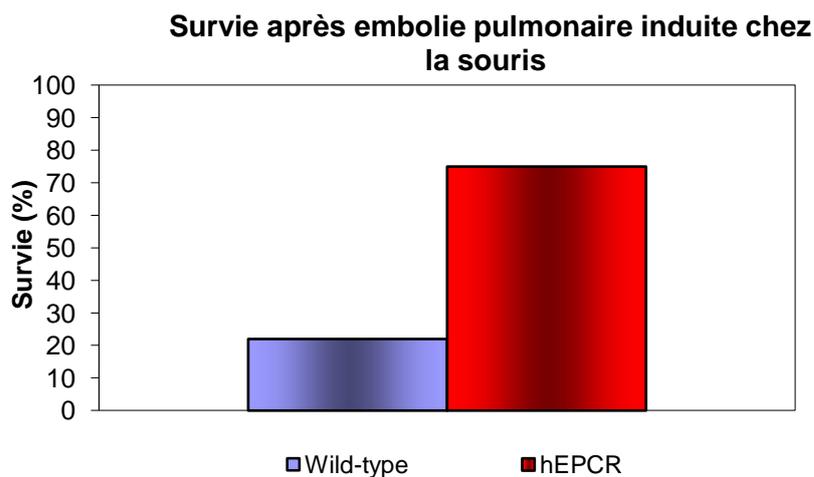


Figure 66 : Survie après induction d'une embolie pulmonaire chez des souris sauvages par rapport à des souris transgéniques pour l'EPCR humain.

VI.5 RESISTANCE DE LA SOURIS TRANSGENIQUE POUR L'EPCR HUMAIN DANS UN MODELE D'ISCHEMIE- REPERFUSION RENALE

Les phénomènes d'ischémie- reperfusion en transplantation d'organes sont à l'origine de nombreux effets délétères dont le mécanisme n'est pas allogéniquement dépendant. Ces lésions ont un rôle important à court et moyen termes dans la survenue des rejets aigus et chroniques. Ils induisent notamment des lésions d'apoptose initiées par le stress oxydatif. Il nous est donc paru important de déterminer si la surexpression de l'EPCR humain pouvait conférer une protection vis-à-vis des conséquences délétères induites par une ischémie- reperfusion rénale. Les conditions expérimentales appliquées dans cette étude ont été déterminées dans notre laboratoire afin d'induire constamment des anomalies biologiques et histologiques rénales chez des animaux sauvages.

VI.5.1 EVALUATION DE LA FONCTION RENALE APRES ISCHEMIE- REPERFUSION

Le temps d'ischémie appliqué au rein gauche était de 18 minutes et les mêmes conditions expérimentales étaient méticuleusement suivies dans les deux groupes de souris non-transgéniques (n=14) et transgéniques (n=9). Un groupe contrôle (groupe sham) avec une procédure factice de clampage rénal a été réalisé avec 7 animaux non-transgéniques. Les conséquences de l'ischémie- reperfusion sur la fonction rénale étaient évaluées à la 24^{ème} heure par le dosage sanguin de l'urée et de la créatinine. Les résultats pour chaque groupe sont représentés dans le Tableau 12.

Souris non-transgéniques	Créatinine (µmol/L)	Urée (mmol/L)	Age (sem)
1332-3 C:179	61	24,1	14,0
JCR X KB B:26	94	32,9	13,4
JCR X KB B:25	87	34,8	13,4
JCR X KB B:30	81	34,2	13,4
JCR X KB B:34	34	16,8	13,0
1332-3 D:143	101	33,3	11,3
1332-3 D:141	196	49,3	11,3
1332-3 D:142	40	12,1	11,3
JCR X KB B:37	114	41,6	13,0
A2A x KA A:25	39	20,8	12,0
A2A x KA A:32	101	33,9	12,0
1332-3 E:35	68	31,9	11,1
1332-3 E:50	44	21,3	9,4
1332-3 E:51	39	16,7	10,3

Souris hEPCR transgéniques	Créatinine (µmol/L)	Urée (mmol/L)	Age (sem)
1332-3 E:28	35	15,8	13,4
1332-3 E:18	54	21,9	13,7
1332-3 E:20	40	18,2	13,7
1332-3 D:150	45	18,2	13,9
1332-3 D:152	37	12,6	13,9
1332-3 E:36	39	17,3	11,1
1332-3 E:37	34	11,3	11,1
1332-3 D:157	33	14,2	13,4
1332-3 E:39	34	14,2	11,1

Groupe factice	Créatinine (µmol/L)	Urée (mmol/L)	Age (sem)
1332-3 C:180	29	11	14,0
1332-3 D:149	30	8,4	10,7
A2A x KA	38	11,5	14,0
A2A x KA	30	8	11,0
1332-3 C:206	28	10,6	11,1
1332-3 E:49	30	10,8	10,3
C57BL6#50	46	24,3	13,3

Tableau 12 : Evaluation de la fonction rénale 24 heures après ischémie- reperfusion rénale par la mesure des taux sanguins en urée et créatinine.

La créatininémie moyenne à 24 heures (Figure 67) était de $78,5 \pm 43 \mu\text{mol/l}$ dans le groupe d'animaux non- transgéniques et de $39 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$ dans le groupe des souris transgéniques pour l'EPCR humain ($p=0,007$). L'urémie moyenne à 24 heures (Figure 68) était de $28,8 \pm 10,5 \text{ mmol/l}$ dans le groupe non- transgénique et de $16,0 \pm 3,2 \text{ mmol/l}$ dans le groupe hEPCR ($p=0,001$).

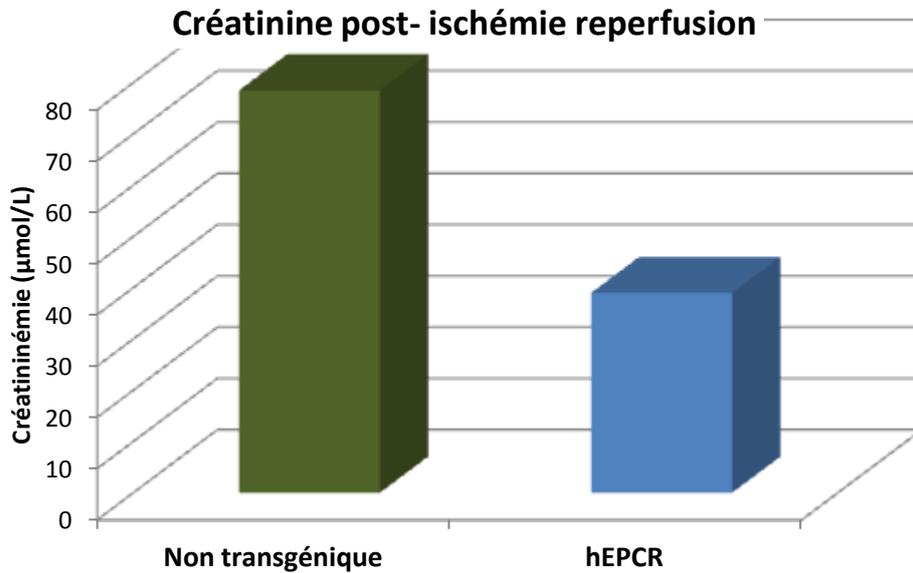


Figure 67: Taux de créatininémie 24 heures après ischémie- reperfusion rénale.

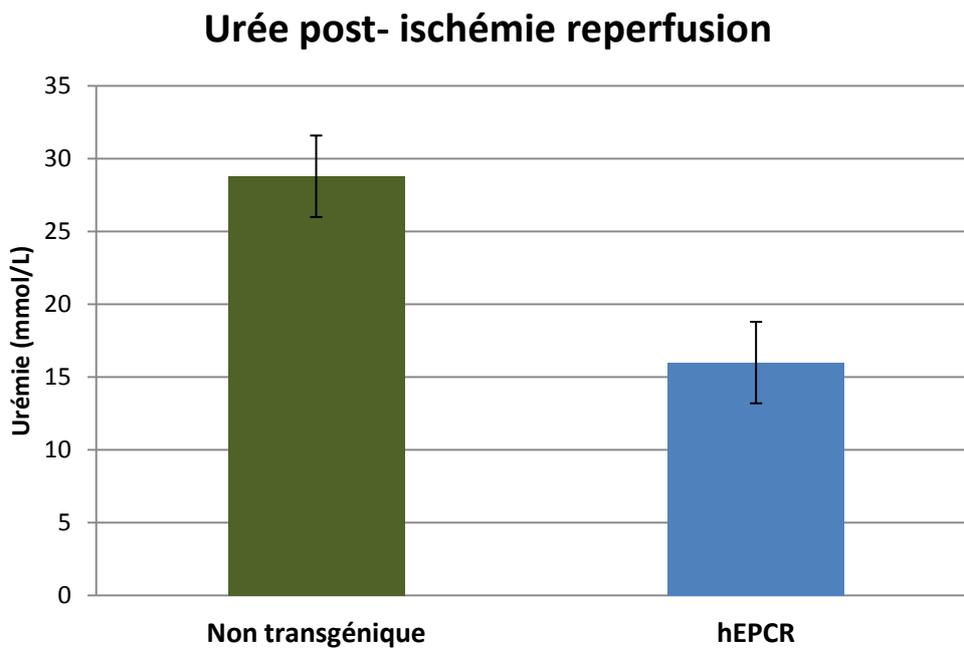


Figure 68: Taux d'urée 24 heures après ischémie- reperfusion rénale

VI.5.2 EVALUATION HISTOLOGIQUE DES LESIONS D'ISCHEMIE- REPERFUSION

Les lésions histologiques ont été évaluées par deux personnes indépendantes en double aveugle et selon un score lésionnel qui reflétait le pourcentage de dommages histologiques observés dans le cortex, la jonction cortico-médullaire et la médulla. Le détail des scores observés pour chaque groupe d'animaux est représenté dans le Tableau 13.

SHAM	Créatinine (µmol/L)	Score anapath 1	Grade (0-4)	Score anapath 2	Grade (0-4)	Moyennes des scores	Grade (0-4)
1332-3 C:180	29	20	2	10	1	15	2
1332-3 D:149	30						
A2A x KA A:16	38	20	2	15	2	17,5	2
A2A x KA A:33	30	10	1	3	1	6,5	1
1332-3 C:206	28	25	2	15	2	20	2
1332-3 E:49	30	15	2	0	0	7,5	1
C57BL6#50	46	0	0	0	0	0	0
WILDTYPE	Créatinine (µmol/L)	Score anapath 1	Grade (0-4)	Score anapath 2	Grade (0-4)	Moyennes des scores	Grade (0-4)
1332-3 C:179	61	75	3	75	3	75	3
JCR X KB B:26	94	65	3	65	3	65	3
JCR X KB B:25	87	75	3	60	3	67,5	3
JCR X KB B:30	81	70	3	85	4	77,5	4
JCR X KB B:34	34	45	3	40	3	42,5	3
JCR X KB B:37	114	55	3	55	3	55	3
A2A x KA A:25	39	60	3	60	3	60	3
A2A x KA A:32	101	70	3	70	3	70	3
1332-3 E:35	68	15	2	15	2	15	2
1332-3 E:50	44	35	3	60	3	47,5	3
1332-3 E:51	39	45	3	30	3	37,5	3
hEPCR	Créatinine (µmol/L)	Score anapath 1	Grade (0-4)	Score anapath 2	Grade (0-4)	Moyennes des scores	Grade (0-4)
1332-3 E:28	35	40	3	40	3	40	3
1332-3 E:18	54	60	3	60	3	60	3
1332-3 E:20	40	25	2	15	2	20	2
1332-3 D:150	45	20	2	30	2	25	2
1332-3 D:152	37	70	3	70	3	70	3
1332-3 E:36	39	30	2	15	2	22,5	2
1332-3 E:37	34	15	2	5	1	10	1
1332-3 D:157	33	5	1	5	1	5	1
1332-3 E:39	34	25	2	30	2	27,5	2

Tableau 13 : Scores histologiques des lésions post-ischémie reperfusion des trois groupes d'animaux (factice, sauvage et transgénique).

Les lésions histologiques étaient significativement plus importantes dans le groupe des animaux non-transgéniques par rapport aux animaux transgéniques pour l'EPCR humain et le nombre des corps apoptotiques était plus élevé dans le groupe non-transgénique (Figure 69) (Figure 70).

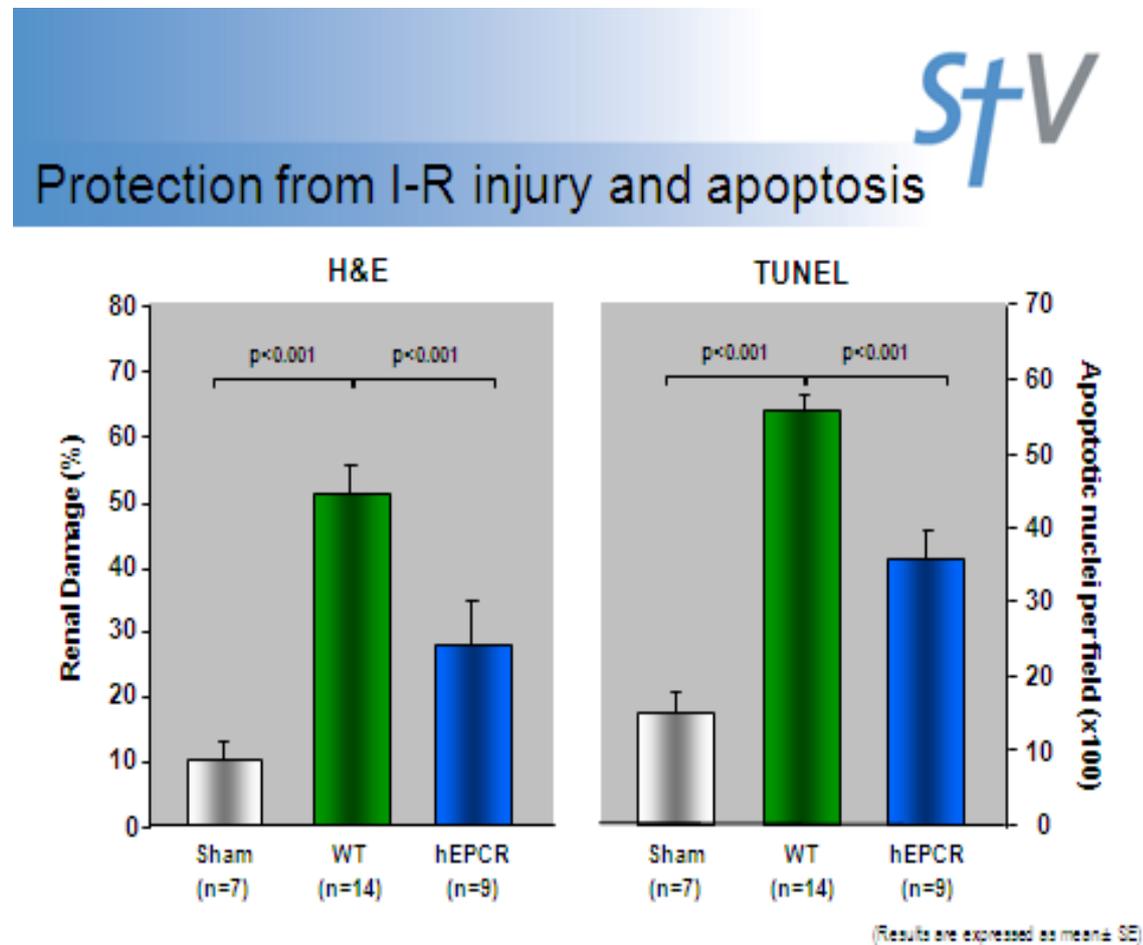


Figure 69 : Quantification des lésions histologiques et du nombre d'apoptose observées dans les 3 groupes d'animaux 24 heures après ischémie-reperfusion.

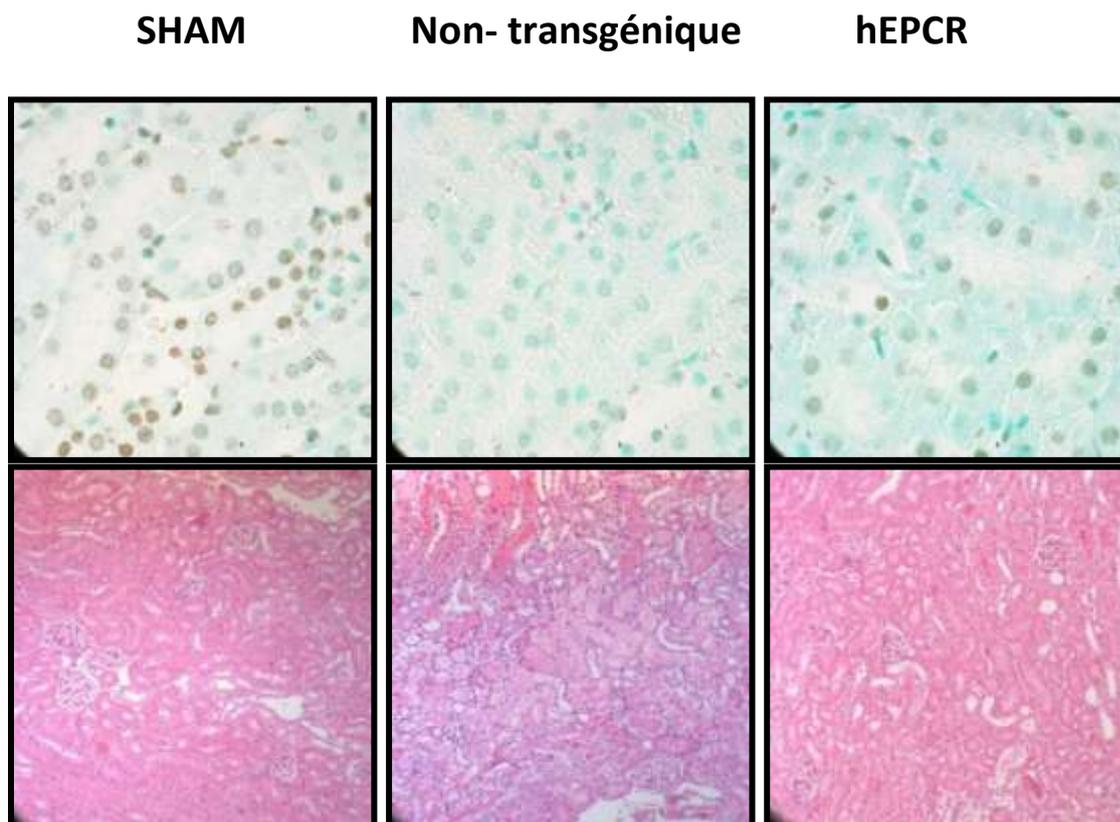


Figure 70 : Coupes histologiques des lésions rénales après ischémie- reperfusion et détection des corps apoptotiques.

VI.6 DISCUSSION

Initialement créée pour étudier et vaincre une incompatibilité moléculaire d'espèce, la génération d'une souris transgénique pour l'EPCR humain a montré que les caractéristiques d'un tel animal n'étaient pas seulement limitées à des propriétés anticoagulantes exclusives. Tout comme Esmon qui a été le premier à identifier l'EPCR en 1994 (Fukudome et al. 1994) et démontré que l'EPCR était un co-facteur d'activation de la protéine C ainsi qu'un régulateur de l'activité anti-inflammatoire de la PCa, notre souris transgénique montre également d'étonnantes fonctions anti-inflammatoires associées à ses propriétés anticoagulantes. Notre équipe de recherche n'est cependant pas la première à avoir conçue une telle souris puisque c'est l'équipe de Charles Esmon qui a obtenu en 2005 la première souris transgénique sur-exprimant l'EPCR (Li et al. 2005), à la différence près que le promoteur Tie2 utilisé par Esmon dans son vecteur était un promoteur d'expression endothéliale spécifique et que l'ADNc était celui de l'EPCR murin. Le vecteur plasmidique H2kB utilisé dans notre étude engendre quant à lui une forte expression du transgène au niveau endothéliale, tissulaire et des lignées sanguines (Cowan et al. 2000). L'origine humaine de l'EPCR ne semble pas avoir perturbé la fonctionnalité du transgène puisque selon nos études

in vitro et *in vivo*, l'EPCR est une molécule compatible entre espèces. En effet, l'EPCR porcin fixe la protéine C humaine tout comme l'EPCR humain et le niveau d'homologie entre l'homme et la souris pour l'EPCR est de 78% en terme d'AA similaires et de 80% entre l'homme et le porc (Tableau 10). De même, Esmon (Li et al. 2005) a montré que la liaison de la PC à l'EPCR n'était pas spécifique d'espèce et que la PC humaine ou murine pouvait se lier à l'EPCR murin ou humain. Aussi, la souris H2kb-hEPCR ne présenterait pas de caractéristiques physiologiques si le transgène souffrait d'une incompatibilité moléculaire d'espèce.

Normalement, l'EPCR est exprimé préférentiellement au niveau des gros vaisseaux plutôt qu'au niveau des capillaires (Laszik et al. 1997). Surexprimer l'EPCR au niveau de la microcirculation aurait pu causer des désordres hémorragiques sévères par inactivation excessive des facteurs FVIIIa et FVa par la PCa. Cependant, tout comme pour la souris Tie2-EPCR (Li et al. 2005), la surexpression de l'EPCR humain par la souris H2kb-hEPCR est parfaitement bien tolérée, notamment lors des procédures de routine réalisées au laboratoire ou lors des parturitions. Une possible explication selon Li et al. (Li et al. 2005) pourrait être liée à l'augmentation de l'EPCR soluble dans la circulation par rapport aux animaux non-transgéniques. Bien que nous n'ayons pas eu la possibilité technique de mesurer ce paramètre chez notre animal transgénique, la souris Tie-EPCR présentait des taux élevés en EPCR soluble (Li et al. 2005). Hors, la forme soluble de l'EPCR est capable d'inhiber à la fois l'activation de la protéine C au niveau de la surface endothéliale et d'inhiber l'inactivation du facteur Va par la PCa (Liaw et al. 2000), ce qui en soit pourrait contre-balancer une tendance hémorragique. Parallèlement, il a été démontré que la souris Tie2-EPCR présentait des taux circulants en PC diminués de 50% par rapport aux souris contrôles (Li et al. 2005). Ce déficit en PC circulante serait apparemment dû à la séquestration de la PC par sa liaison avec l'EPCR exprimé en excès à la surface endothéliale.

Cependant, l'exploration globale de l'hémostase appréciée par le temps de saignement, retrouve des anomalies qui dans le contexte de notre souris H2kb-hEPCR ne sont pas attribuables à une thrombopénie ou une thrombopathie car la souris H2kb-hEPCR avait un taux de plaquettes normale et une agrégation plaquettaire similaire à des souris sauvages. L'explication la plus vraisemblable pour cet allongement du temps de saignement est l'inactivation en excès des facteurs VIIIa et Va par la protéine C activée, qui aura elle-même été activée en excès par le complexe thrombomoduline-thrombine après fixation de la PC à l'EPCR. En effet, l'augmentation de l'activation de la PC par l'EPCR est dépendante de la concentration en EPCR, même si la concentration en EPCR est en excès par rapport à la TM (Taylor et al. 2001), on comprend alors facilement l'ampleur de cette boucle d'amplification avec une souris surexprimant l'EPCR. L'absence de complications hémorragiques est due à l'absence de stimuli déclenchant l'activation de la PC à l'état basal. La voie de la PC est en effet une voie régulatrice dite « à la demande » car elle s'active seulement en cas de formation de thrombine. Ainsi la souris transgénique Tie-EPCR chez qui le taux sanguin en PC est anormalement bas à l'état basal, présente un taux sanguin en PCa 8 fois plus élevé

qu'une souris non-transgénique après perfusion de thrombine (Li et al. 2005). Cette augmentation d'activation de la PC en cas de « stress vasculaire » est dans notre étude confirmée indirectement par un allongement du temps de saignement et par les résultats obtenus dans le modèle *in vivo* d'induction de thrombose pulmonaire après injection de collagène et ADP. La présence du transgène a conféré un effet protecteur significatif sur l'étendue du thrombus intra-artériel pulmonaire et sur la survie des animaux. La génération de thrombine nécessaire à l'amplification de la boucle de la coagulation et à la formation du clou plaquettaire semble avoir été freinée chez les animaux transgéniques grâce au rétro-contrôle négatif de la PCa, ce qui a diminué la taille de l'embolie pulmonaire et amélioré la survie des animaux transgéniques.

Le bénéfice d'une surexpression de l'EPCR ne se limite pas qu'aux effets anticoagulants de la voie de la protéine C et permet de bénéficier des propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotique et cytoprotectives de cette voie physiologique. Ainsi, dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale, la présence du transgène préservait la fonction rénale et diminuait les lésions histologiques rénales, le nombre d'apoptose et l'infiltrat cellulaire à neutrophiles. Cet effet protecteur de l'EPCR lié à une augmentation en PCa, a été également retrouvé dans plusieurs études où la perfusion de PCa prévenait les dommages post-ischémiques au niveau cérébral (Cheng et al. 2003; Yesilirmak et al. 2008), cardiaque (Pirat et al. 2007) et intestinal (Teke et al. 2008). Plusieurs études *in vitro* ont en effet mis en évidence que la PCa inhibait l'adhésion sélectine-dépendante des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire (Grinnell et al. 1994) ainsi que le chimiotactisme des neutrophiles induit par l'interleukine 8, le formyl-Met-LeuPhe, l'antithrombine et le C5a. Ce contrôle du chimiotactisme cellulaire semble être médié par l'EPCR exprimé sur les neutrophiles puisque l'usage d'Ac anti-EPCR diminuait l'effet inhibiteur de la PC et PCa sur la migration cellulaire (Sturn et al. 2003). Il a été retrouvé que la PCa diminuait également la sécrétion de TNF des monocytes-macrophages exposés à des endotoxines (Grey et al. 1994).

Il existe donc un bénéfice à surexprimer l'EPCR en cas de situations de stress vasculaire où de phénomènes de thrombose ou d'ischémie reperfusion pouvant endommager l'endothélium vasculaire. Néanmoins, afin de préciser si l'effet protecteur du transgène provient de son expression endothéliale ou bien des lignées cellulaires sanguines, un modèle de transfert adoptif devra être réalisé.

Enfin, en raison d'une probable potentialisation de leur action activatrice de la PC, les deux lignées exprimant soit la TM humaine ou soit l'EPCR humain sont en cours de croisement dans le laboratoire d'immunologie de l'hôpital St Vincent pour obtenir des animaux doublement transgéniques. Ces animaux permettraient également de tester un modèle de transplantation de cœur de souris chez le rat chez lequel il a été démontré que la TM humaine conservait une activité anticoagulante *in vivo* par sa capacité à lier la thrombine endogène (Hasegawa et al. 1996; Kaneko et al. 2000) mais était incapable d'activer la protéine C *in vitro* (Mohri et al. 1997).

A ce stade actuel de nos connaissances, il est encore prématuré d'affirmer que la génération de porc transgénique pour l'EPCR humain permettrait d'améliorer le devenir des xéno greffes mais les résultats obtenus à partir de ce modèle murin sont très prometteurs.

VI.7 REMARQUES COMPLEMENTAIRES : RESULTATS DE LA XENOTRANSPLANTATION D'ORGANES PORCINS GAL K.O

A cette même époque, vers les années 2005, les premiers résultats de xénotransplantations à partir d'organes de porcs Gal-KO étaient publiés. Malgré des durées de survie globalement améliorées, la communauté scientifique n'a pu masquer sa déception car malgré l'éradication de l'épitope Gal, un rejet tardif survenait de manière inéluctable. Trois études ont ainsi caractérisé le rejet vasculaire au cours de xénotransplantation rénale ou cardiaque chez le babouin à partir d'organes Gal K.O. Dans une première étude, le protocole immunosuppresseur n'a pu prévenir une induction d'Ac anti-non-Gal capables d'activer le complément et de provoquer un rejet vasculaire aigu sévère à l'origine d'une perte des xéno greffons rénaux entre le 8^{ème} et 16^{ème} jours (Chen et al. 2005). Les xéno greffons rejetés présentaient des lésions hémorragiques massives, des infarctus et de plages de nécroses et d'infiltrations polynucléaires ainsi que des dépôts d'IgM, IgG, C3 et C4d. Plusieurs animaux receveurs avaient développé une thrombocytopénie juste avant la perte de fonction des greffons. Une seconde étude (Yamada et al. 2005), utilisant cette fois-ci des donneurs avec un fond génétique différent et un protocole immunosuppresseur incluant un traitement anti-CD154, a reporté des survies plus longues (entre 20 et 34 jours) mais avec au final la survenue d'un rejet similaire à l'étude précédente. Néanmoins, une greffe de thymus vascularisé combinée à la xéno greffe rénale, permettait d'améliorer dans cette étude la survie des greffons (entre 16 et 83 jours). Le xéno greffon avec la survie la plus longue présentait aucun dépôt d'Ac mais une micro-angiopathie thrombotique (Yamada et al. 2005). La troisième étude était une série de xénotransplantation de cœur Gal K.O en position hétérotopique chez le babouin. Les greffons étaient rejetés entre 59 et 179 jours et présentaient tous des signes de rejets humoraux associés au développement d'une microangiopathie thrombotique (Shimizu et al. 2008). Cette étude était particulièrement importante puisqu'elle détaillait pour la première fois la physiopathologie du rejet des xéno greffons Gal K.O. Elle montrait ainsi qu'au cours de la xéno greffe, la microangiopathie thrombotique touchait d'abord les capillaires puis les artères de toute taille, conduisant à des zones d'ischémie puis d'infarctus et de nécrose sur un fond d'hémorragies focalisées. Des dépôts d'IgM, d'IgG, de C3, C4d et C5b-9 étaient également retrouvés, associés à une activation des cellules endothéliales au niveau capillaire puis artériel, avec sur-régulation de facteur von Willebrand et de facteur tissulaire et diminution d'expression de CD39. Malgré une déplétion des cellules -T et une immunosuppression continue, une

infiltration par des cellules CD3+ était observées précocément après la transplantation. L'auteur de cette étude concluait que le régime immunosupresseur, malgré une absence d'Ac anti-porc circulant détectables, était probablement incapable de prévenir complètement une réponse humorale anti-non Gal dépendant des cellules T. L'activation et les dommages subits par les cellules endothéliales étaient à l'origine de microthrombi plaquettaires et du développement d'une microangiopathie thrombotique.

Ainsi, les Ac anti-non Gal développés chez le primate en réponse à une xénotransplantation d'organe Gal K.O étaient soit des IgM ou soit des IgG ayant une forte cytotoxicité complément- dépendant. L'identification de ces épitopes non-Gal à l'origine de la réponse humorale devenait donc un objectif majeur mais l'existence d'incompatibilités moléculaires affectant les mécanismes régulateurs de la coagulation devait être pris également en compte afin de minimiser les lésions de microangiopathie thrombotique au niveau endothélial.

VII. PROJET V : Etude *in vitro* des troubles de la coagulation en Xénotransplantation : Voie de l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI) dans une combinaison porc sur primate

Après avoir étudié l'incompatibilité moléculaire d'espèce touchant la voie de la protéine C dans une combinaison porc- primate, il nous semblait pertinent d'étudier la voie anticoagulante du TFPI. Des études antérieures utilisant des cellules endothéliales porcines et humaines avaient montré que l'activité du facteur tissulaire était conservée voire même amplifiée dans une combinaison porc- primate (Kopp et al. 1998) et que les cellules porcines ne fixaient pas efficacement le FXa humain, malgré une forte homologie (92%) entre les séquences aminées partielles des domaines K2 du TFPI entre l'homme et le porc (Kopp et al. 1997). L'ensemble de ces résultats suggèrait l'existence d'une probable incompatibilité de la voie du TFPI en xénotransplantation.

Nous avons au cours de cette étude cloné et exprimé le TFPI- α porcin afin d'étudier sa compatibilité avec les différents composants humains de la voie du facteur tissulaire (FT). Nous avons trouvé que les séquences aminées du TFPI- α porcin et humain étaient hautement conservées et que les protéines recombinantes exprimées dans un modèle cellulaire présentaient la même capacité à fixer efficacement le FXa humain et à inhiber l'activité du complexe FVIIa/FT *in vitro*, témoignant donc d'une parfaite compatibilité du TFPI porcin dans un contexte de xénotransplantation.

VII.1 ARTICLE : «RECOMBINANT PIG TFPI EFFICIENTLY REGULATES HUMAN TISSUE FACTOR PATHWAYS» XENOTRANSPLANTATION 2008: 15: 191-197

Brief Communication

Recombinant pig TFPI efficiently regulates human tissue factor pathways

Lee KFE, Salvaris EJ, Roussel J-C, Robson SC, d'Apice AJF, Cowan PJ. Recombinant pig TFPI efficiently regulates human tissue factor pathways.

Xenotransplantation 2008; 15: 191–197. © 2008 Blackwell Munksgaard

Abstract: Rejected pig-to-primate organ xenografts almost invariably exhibit significant microvascular thrombosis, believed to be due in part to several molecular incompatibilities affecting the regulation of coagulation. In this study, we tested one such proposed incompatibility: whether there is, at least in part, a functional incompatibility in pig tissue factor pathway inhibitor (TFPI) that impedes binding of human factor Xa and regulation of human tissue factor-initiated coagulation. TFPI α cDNA was cloned from pig aortic endothelial cells and found to encode a 279-residue mature protein with 79% overall identity to human TFPI α , increasing to 88 to 90% in the functional Kunitz-1 and Kunitz-2 domains. Transfected primate cells expressing equivalent levels of GPI-linked pig or human TFPI α were assayed for binding of human factor Xa and inhibition of the human factor VIIa/tissue factor complex. The activity of the expressed pig anticoagulant was equivalent to that of the human protein in both measures of TFPI function in these systems. These data indicate that there are no apparent incompatibilities between recombinant pig TFPI and the human tissue factor pathway. Other factors must account for the thromboregulatory failure of pig endothelium and aberrant tissue factor activity in xenograft rejection.

K. F. Eddy Lee,¹ Evelyn J. Salvaris,¹ Jean-Christian Roussel,¹ Simon C. Robson,² Anthony J. F. d'Apice^{1,3} and Peter J. Cowan^{1,3}

¹Immunology Research Centre, St. Vincent's Health, Melbourne, Vic., Australia, ²Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, ³Department of Medicine, University of Melbourne, Melbourne, Vic., Australia

Key words: coagulation – molecular incompatibilities – TFPI

Address reprints request to Dr Peter J. Cowan, Immunology Research Centre, St. Vincent's Hospital Melbourne, PO Box 2900, Fitzroy, Vic. 3065, Australia (E-mail: peter.cowan@svhm.org.au)

Received 8 May 2008;
Accepted 15 May 2008

Introduction

Intragraft microvascular thrombosis and consumptive coagulopathy are recurring and important themes in pig-to-primate organ xenotransplantation. Although persistent activation of xenograft endothelium by elicited anti-pig antibodies has been suggested as the primary cause of these problems, putative molecular incompatibilities in the control of coagulation will compound xenograft rejection and may also play a role in systemic complications [1]. At least two critical endothelial anticoagulant proteins, thrombomodulin and tissue factor pathway inhibitor, have been implicated. Thrombomodulin, an integral component of the protein C pathway, regulates the propagation phase of coagulation by binding thrombin and acting as a cofactor for its activation of protein C. We have recently cloned pig thrombomodulin and demonstrated that although it binds human

thrombin, it is a poor cofactor for human protein C activation [2], confirming previous reports [3,4].

Tissue factor pathway inhibitor-1 (TFPI-1) is the key physiological regulator of the initiation phase of coagulation. The α isoform (TFPI α) has three Kunitz-type domains, the first of which (K1) binds to the active site of factor VIIa in the fVIIa/TF complex, and the second of which (K2) binds and inhibits factor Xa [5]. Inhibition of fVIIa/TF is fXa-dependent; kinetic data favour a model in which TFPI interacts with fXa that has not yet been released from the activating fVIIa/TF complex, forming an inactive quaternary complex on the plasma membrane [6]. The third Kunitz domain (K3) has no described inhibitory function but may mediate the ionic binding of TFPI α to cell surfaces [5]. The β isoform of TFPI-1, generated by alternative splicing, contains only K1 and K2 and is directly attached to endothelial cells by a GPI linkage [7].

Prior studies using cultured pig and human endothelial cells have suggested that the xenogenic combination of cells boosts TF activity [8] and that pig endothelium fails to efficiently bind human FXa, despite partial amino acid sequence data showing high identity (92%) between the pig and human TFPI K2 domains [9]. In this study, we cloned and expressed pig TFPI α to directly examine its compatibility with components of the human tissue factor pathway. We found that pig and human TFPI α are highly conserved at the amino acid sequence level, and that the cell-associated recombinant proteins demonstrate similar efficiency in both binding of human FXa and inhibition of human VIIa/TF activity in vitro. Thus while the failure of pig endothelial cells to regulate the initiation of human clotting remains incompletely understood, our results indicate that it is not due to molecular incompatibility in the control of the tissue factor pathway.

Methods

Isolation of pig TFPI cDNA

The sequence of pig TFPI cDNA was determined by simultaneous 5'/3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) [10] as follows. Total RNA was isolated from cultured pig aortic endothelial cells (PAEC) with TRIzol (Invitrogen, Mount Waverley, Australia) and used to prepare cDNA by reverse transcription-PCR (RT-PCR) with the oligo(dT) anchor and T-S primers, using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) as per manufacturer's instructions. After further amplification using the T-S PCR and PCR anchor primers, the cDNA was purified, phosphorylated and ligated to generate a library containing circular full-length cDNA species. Degenerate PCR primers (pTFPI-Fdeg and pTFPI-Rdeg) were used to amplify an internal segment of pig TFPI cDNA from the library. Degenerate primer sequence was based on an alignment of the reported TFPI-1 cDNA sequences from six mammalian species (human, rhesus, bovine, rabbit, rat, and mouse) plus a partial pig TFPI amino acid sequence [9]. The sequence of the resulting PCR product was used to design nested gene-specific primers (GSP) pointing away from the known sequence. Products from sequential PCR of the ligated cDNA library with GSP5'-1/GSP3'-1 and GSP5'-2/GSP3'-2 were cloned and their sequence was used to reassemble the pig TFPI cDNA sequence, which was subsequently amplified as a single product using the primers pTFPI-F and pTFPI-R and cloned into the ZEROBlunt vector (Invitrogen).

Construction of TFPI-GPI expression vectors

We have previously fused the human TFPI α open reading frame (ORF) to the glycosyl phosphatidylinositol (GPI) membrane attachment signal from human CD55 (Dwyer KM, d'Apice AJF, Cowan PJ, unpublished data). A similar strategy was used to replace the human TFPI α ORF in this construct with the pig TFPI α ORF. TFPI α -GPI expression vectors were then constructed using the plasmid pEF-BOS-FLAG [11]. Pig and human TFPI α -GPI fusion ORFs lacking their native signal peptide sequences were amplified using the primer sets pTFPI-*Mlu*-F/TFPI-*Mlu*-R and hTFPI-*Mlu*-F/TFPI-*Mlu*-R, respectively. After cloning of the products into ZEROBlunt, they were excised using *Mlu*I and cloned into pEF-BOS-FLAG. Both constructs were confirmed by sequencing.

Primers

Sequences of the oligo(dT) anchor, T-S, T-S PCR and PCR anchor primers are given elsewhere [10]. Other primers were:

pTFPI-Fdeg = 5'-GCTTTTTGGAAGARGA-TCTGG-3'

pTFPI-Rdeg = 5'-ATTTCCCCCACATCCAS-TGTA-3'

GSP5'-1 = 5'-AGATTGCCAAGGCAGCCA-CCATACT-3'

GSP3'-1 = 5'-GACTCTCCAGCCTACCAAA-GCACCAGC-3'

GSP5'-2 = 5'-GCGTTCACACTGCTTTGAC-TG-3'

GSP3'-2 = 5'-TTTTACGGCCCCTCCTGGT-GTCTGACCC-3'

pTFPI-F = 5'-TCTTCAGAGATTTCACTCA-GA-3'

pTFPI-R = 5'-CAGGAGAGAAACTATAG-GAGTCA-3'

pTFPI-*Mlu*-F = 5'-ACGCGTATTCCTGAG-GAAGGTGAAGA-3'

hTFPI-*Mlu*-F = 5'-ACGCGTGATTCTGAG-GAAGATGAAGA-3'

TFPI-*Mlu*-R = 5'-ACGCGTCTAAGTCAGC-AAGCCAT-3'

Cell culture and transfection

COS-7 cells were cultured at 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (HyClone, Tauranga, New Zealand) and 15 mM HEPES buffer (Invitrogen). 5×10^6 cells were transfected by electroporation with 10 μ g of plasmid DNA as described [2]. Transfectants were

stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody KM5-1C5 (anti-FLAG; WEHI Monoclonal Laboratory, Bundoora, Australia) and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Sydney, Australia).

Human factor Xa binding assay

Twenty-four hour after transfection, cells were seeded at 3×10^4 cells per well in 96-well flat bottom plates and incubated at 37 °C for 24 h. Cultures seeded and grown in parallel were analyzed by flow cytometry immediately prior to the binding assay to confirm equivalent expression of human and pig TFPI. The cells to be assayed were washed three times in wash buffer (0.15 mM NaCl₂, 4 mM KCl, 11 mM glucose, 10 mM HEPES, 0.5% fatty acid-free BSA, 2 µg/ml polybrene, pH 7.5), then incubated for 15 min at 25 °C in 50 µl fXa assay buffer (wash buffer containing 5 mM CaCl₂). Human factor Xa (Merck, Kilsyth, Australia) was added at a range of amounts (0, 1, 2, 3 pmol/well) in a total final volume of 100 µl, followed by incubation for a further 15 min at 25 °C. The reaction was terminated by the addition of 5 µl stop buffer (wash buffer containing 100 mM EDTA). One hundred microliters of supernatant from each well was transferred to a 96-well flat-bottom plate and warmed to 37 °C in a FLUOStar Galaxy kinetic plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Spectrozyme fXa chromogenic substrate (American Diagnostica, Stamford, CT, USA) was added to a final concentration of 1 mM, and the absorbance at 405 nm was measured. The slope of the absorbance curve at each concentration of factor Xa was compared to that in the absence of cells with and without 12.5 nM recombinant human TFPI (American Diagnostica). All assays were performed in triplicate.

Inhibition of human factor VIIa/TF activity

Transient transfectants were prepared and washed as described for the factor Xa binding assay. Recombinant human TF was prepared by dissolving the contents of one vial of Innovin (Dade Behring, Marburg, Germany) in 2 ml fXa assay buffer. Fifty microliters of 200 pM human fVIIa (Merck) in fXa assay buffer was mixed on ice with a range of volumes (0 to 50 µl) of Innovin in a final volume of 100 µl, followed by incubation for 15 min at 37 °C. The resulting fVIIa/TF complexes were added at 100 µl per well to the transfected cells, followed by incubation for 15 min at 37 °C. One hundred microliters of 120 nM human fX (Merck) in fXa assay buffer was then added, with

incubation for a further 15 min at 37 °C. The reaction was terminated by the addition of 10 µl stop buffer, and factor Xa activity was determined as described for the factor Xa binding assay. Inhibition of fVIIa/TF activity was measured as the decrease in fXa generated and compared to that observed in the presence of recombinant human TFPI. All assays were performed in triplicate.

Statistical analysis

Data were analyzed for statistical significance using Student's unpaired *t*-test. P-values of <0.05 were considered significant.

Sequence analysis

Sequence analysis including ClustalW alignment was performed using Accelrys Gene 2.0 (Accelrys, Tokyo, Japan). Amino acid sequences were analyzed for the presence of signal peptides and *N*- and *O*-linked glycosylation sites using the programs SignalP 3.0 [12], NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>), and NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>), respectively.

Results

Cloning of pig TFPI α

Simultaneous 5'/3' RACE of PAEC total RNA was used to isolate a 1079-basepair (bp) cDNA containing an 870-bp open reading frame (Fig. 1). The deduced 303-residue protein showed significant amino acid sequence homology with TFPI-1 from various species and contained three Kunitz-type domains, indicating that it represented the α form of pig TFPI-1. The sequence of the mature pig TFPI α protein was 79% identical to that of human TFPI α (data not shown). Two *N*-linked glycosylation sites (one in K2 and one between K2 and K3) and one *O*-linked site in human TFPI α were present in pig TFPI α , which had two additional *N*-linked glycosylation motifs on either side of K1 (Fig. 1). Alignment of the nucleotide sequence with the incomplete sequence of the pig genome revealed identity with stretches within a chromosome 15 clone (EMBL Accession No. CU570823.1).

The TFPI β isoform results from the use of an alternate in-frame exon in the 3' coding region, resulting in a protein with a C-terminus that is shorter than and distinct to the alpha isoform. We attempted to isolate TFPI β cDNA by PCR of the

```

TCFTCAGAGATTTCACTCAGATCATTGAAACAATGAAGGAAGGACAGATTTTTGGGGCTTCTGTAT 66
      M K E G Q I F G A S V -11
GTCTGCTGCTTAGTTGTGCTTTGGACCTCTTACTGCTATTCTGAGGAAGGTGAAGAATATGCAA 132
C L L L L S C A F G P L T A I P E E G E E Y A 9
ACATTACAGATGCAAAGTTGCCACCAATGAAACCTATACATTCAATTTGTGCAATGAAAGCAGATG 198
N I T D A K L P P M K P I H S F C A M K A D 31
ATGGCCCATGCAAAGCAATGATGAAGAGATTTTTTTCAATATTAACACGCAACAGTGTGAAGAAT 264
D G P C K A M M K R P P F N I N T Q Q C E E 53
      Kunitz-1
TTATATATGGGGGATGTGAAGGAAATCAAATCGATTGAAAGTCTGGAAGAATGCAAAGAAAAAT 330
F I Y G G C E G N Q N R F E S L E E C K E K 75
GTACAAGAGATTATCCAAGAAGACTAGAAGATTAACACACACATTCGAAAAAGAAAAGCCAGACT 396
E T R D Y P K K T R R L N T T L Q K E K P D 97
TCCTGCTTTTGGAAAGATGCTGGAATCTGTGGAGTTATATTACTAGGTATTTTATAACAATC 462
F C F L E E D A G I C R G Y I T R Y F Y N N 119
      Kunitz-2
AGTCAAAGCAGTGTGAAGCGCTTCAAGTATGGTGGCTGCTGGCAATCTAAACAACCTTGAATCGC 528
Q S K Q C E R F K Y G G C L G N L N N F E S 141
TGGAAGAATGCAAGAACACCTGTGAGGATGCAATGAATGATCTCCAGGTGGATGATTATAGAACC 594
L E E C K N T C E D A L N D L Q V D D Y R T 163
CTCTTGAGGCTTTGAATAATGACTCCTTGACTCTCCAGCCTACCAAAGCACCAGCTTCTTTGAAT 660
P L E A L N N D S L T L Q P T K A P S F F E 185
TTTACGGCCCTCTGCTGTGACCCCGGCAGACAGGATTATGTCAAGCAATGAACGCAGAT 726
F Y G P S W C L T P A D R G L C Q A N E R R 207
      Kunitz-3
TCTACTACAATTCAGTCAATGGGAAATGCCGCCCTTAAGTACAGTGGATGGAGGGAATGAAA 792
F Y Y N S V I G K C R P F K Y S G C G G N E 229
ATAATTTACTTCTAAAAAGCATGCTTAAGACTTGTA AAAAAGGTTTTGTCCAAAGAATATCAA 858
N N F T S E K A C L K T C K K G P V Q R I S 251
AAGATGGATTAATTAACCAAAAAGAAAAGAAAAGAACGACCCAGTGAARATAGTATATGAAGAAA 924
K D G L I K T K E E E K K O P V K I V Y E E 273
TTTTGTGTA AAAAGATATAAAATTTATTACAGCTCAACATTATTTCTACTAAATATTTTGATAAAA 990
I F V K K I * 279
CTTTTCATTATGACTCCTATAGTTTTCTCTCCTGAAATCTTTAATAAACATTTTCATGGATTATC 1056
TATGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1079

```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of pig TFPI α cDNA. Putative structural features of the protein are indicated as follows: signal peptide, underlined; Kunitz domains, boxed; N-linked glycosylation motifs, bold; O-linked glycosylation site, thick underlined; heparin binding site, double underlined. Amino acid numbers represent the position of residues in the deduced mature protein sequence. 5'- and 3'-untranslated regions of the cDNA are shown in italics. The cDNA sequence of pig TFPI α is available in GenBank with Accession No. EU090729.

ligated PAEC cDNA library using the PCR anchor primer with nested primers within the K2-encoding exon (common to both isoforms). However, only the longer TFPI α product was generated (data not shown), suggesting that PAEC express less TFPI β than TFPI α at the transcriptional level.

The Kunitz domains of pig and human TFPI α are highly conserved

Alignment of K1, K2, and K3 of pig and human TFPI α revealed identity of 88%, 90%, and 88%, respectively (Fig. 2). The critical P1 residues in K1 (Lys36 in human) and in K2 (Arg107 in human) were identical in seven mammalian species with the exception of the P1 of rabbit K1, which had a conservative (Lys \rightarrow Arg) substitution. The P1 residue in K3, which has no inhibitory function, exhibited greater variation between species: Gln in pig, rabbit and bovine TFPI; Arg in human and rhesus TFPI; and Lys in mouse and rat TFPI.

Pig TFPI α efficiently binds human factor Xa and inhibits human factor VIIa/TF

The TFPI activity was measured in COS-7 cells transfected with expression vectors for pig or human TFPI α . Normally, attachment of TFPI α to the surface of endothelial cells is indirect, with a proportion binding to an unidentified GPI-linked co-receptor and the remainder associating with glycosaminoglycans [13]. As it is not known whether this co-receptor is expressed by COS-7 cells, we engineered directly membrane-bound forms of TFPI α by fusing a GPI attachment signal to the C-terminus of each open reading frame (Fig. 3A). We also added a FLAG epitope tag to the N-terminus to allow detection of pig TFPI α (which is not recognized by commercially available monoclonal antibodies to human TFPI) and to facilitate comparison of the expression levels of pig and human TFPI α . Strong and equivalent surface

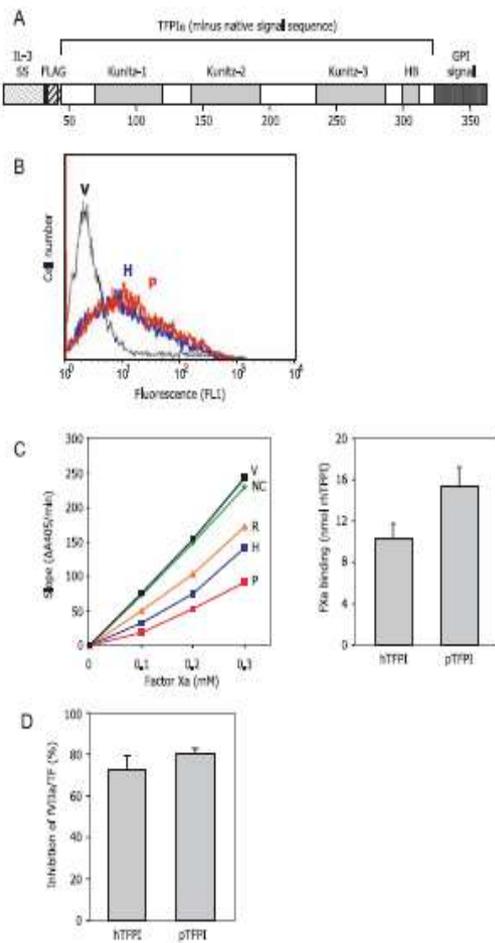


Fig. 3. Pig TFPI α binds human factor Xa and inhibits human factor VIIa/TF. (A) Expression vectors were constructed for full length human and pig TFPI α , modified to incorporate a FLAG epitope tag at the N-terminus and the human CD55 GPI membrane attachment signal at the C terminus. IL-3 SS = IL-3 signal sequence; HB = heparin-binding domain of TFPI α . (B) The expression vectors were transiently transfected into COS-7 cells. Similar expression of human (H, blue line) and pig (P, red line) TFPI α was demonstrated by flow cytometric analysis using an anti-FLAG antibody (vector-transfected cells = V, black line). (C) Pig TFPI α efficiently bound human factor Xa. Left panel, representative experiment showing fXa binding by transfectants expressing human (H) or pig (P) TFPI α , relative to 12.5 nM recombinant human TFPI (R) (vector-transfected cells = V, no cells control = NC). Right panel, comparison of fXa binding by human and pig TFPI α (mean \pm SD of two independent experiments). (D) Pig TFPI α neutralized human factor VIIa/TF activity as efficiently as human TFPI α (mean \pm SD of three independent experiments; $P = 0.12$). Under the same conditions 3 nM recombinant human TFPI inhibited FVIIa/TF activity by 66% (data not shown).

TFPI α , including one in K2, are conserved in pig TFPI α . The two novel *N*-linked glycosylation motifs in pig TFPI α flank K1 and would not be expected to disrupt binding of fXa to K2. Glycosylation of human TFPI has been postulated to influence its cell

binding properties and plasma clearance, but not the direct inhibitory function [5].

Although our findings indicate that pig TFPI should function normally in the xenograft setting, they do not weaken the case for overexpression of some form of membrane-bound TFPI—human or pig—in porcine donor tissue. Our data at least suggest that the expression of either pig or human TFPI α engineered to be cell associated via a GPI anchor should have equivalent efficacy. TFPI has been shown to be lost in conjunction with heparan sulfates from the porcine vasculature during delayed rejection of pig-to-baboon cardiac xenografts, potentially promoting the development of a procoagulant environment [9]. Furthermore, overexpression of human TFPI α in transgenic mice completely prevents acute humoral rejection of mouse-to-rat cardiac xenografts [14] and transgenic pigs are being developed to test efficacy in a primate model of xenotransplantation. Whether the remarkable protective effect of human TFPI α in mice can be reproduced in the pig-to-primate model is yet to be determined.

Acknowledgments

This study was funded in part by the Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) and NIH USA (to SCR and AJF'd'A; U01 AI066331 and P01 AI045897).

References

1. CHEN D, DORLING A. Microcoagulation processes after xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2005; 10: 240–245.
2. ROUSSEL JC, MORAN CJ, SALVARIS EJ, NANDURKAR HH, D'ARCE AJF, COWAN PJ. Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am J Transplant* 2008; 8: 1101–1112.
3. SIEGEL JB, GREY ST, LESNIKOSKI BA et al. Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin. *Transplantation* 1997; 64: 888–896.
4. KOPP CW, GREY ST, SIEGEL JB et al. Expression of human thrombomodulin cofactor activity in porcine endothelial cells. *Transplantation* 1998; 66: 244–251.
5. CRAWLEY JTB, LANE DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 233–242.
6. LU G, BROZE GJ JR, KRISHNASWAMY S. Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *J Biol Chem* 2004; 279: 17241–17249.
7. ZHANG J, PIRO O, LU L, BROZE GJ JR. Glycosyl phosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 2003; 108: 623–627.
8. KOPP CW, ROBSON SC, SIEGEL JB et al. Regulation of monocyte tissue factor activity by allogeneic and xeno-

Characterization of pig TFPI

- genic endothelial cells. *Thromb Haemost* 1998; 79: 529–538.
9. KOPP CW, SIEGEL JB, HANCOCK WW et al. Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors. *Transplantation* 1997; 63: 749–758.
 10. HUANG JC, CHEN F. Simultaneous amplification of 5' and 3' cDNA ends based on template-switching effect and inverse PCR. *Biotechniques* 2006; 40: 187–189.
 11. KAWAKATSU T, OGITA H, FUKUHARA T et al. Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J Biol Chem* 2005; 280: 4940–4947.
 12. BENDTSEN JD, NIELSEN H, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; 340: 783–795.
 13. MARONEY SA, CUNNINGHAM AC, FERREL J et al. A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1114–1124.
 14. CHEN D, WEBER M, McVEY JH et al. Complete inhibition of acute humoral rejection using regulated expression of membrane-tethered anticoagulants on xenograft endothelium. *Am J Transplant* 2004; 4: 1958–1963.

VIII. Conclusion finale et Perspectives

La xénotransplantation d'organes vascularisés entre espèces discordantes telle que porc sur primate est soumise à une suite de réactions immunologiques majeures aboutissant immédiatement à un rejet hyperaigu (RHA) ou plus tardivement à un rejet vasculaire aigu (RVA) lorsque des animaux donneurs transgéniques pour des molécules régulatrices du complément humain sont utilisés.

Nous avons démontré que le RVA était soumis à une activation du complément par des xénoanticorps naturels dirigés contre l'épitope Gal α 1,3 Gal. L'espoir d'un meilleur contrôle de cette réponse humorale n'a pu être atteint avec l'obtention de porcs Gal K.O car il existe également des Ac non-Gal préformés capables d'activer le complément et les cellules endothéliales aboutissant à la perte du greffon (Chen et al. 2005).

Les lésions histologiques majeurs thrombotiques qui caractérisent les xénorejets peuvent être accentuées par une incompatibilité moléculaire d'espèce touchant les mécanismes régulateurs de l'hémostase, notamment au niveau de la voie de la protéine C.

L'activation du système du complément par des Ac naturels préformés reste donc un problème majeur en xénotransplantation malgré l'obtention de porcs transgéniques pour des molécules régulatrices du complément et malgré l'obtention de porcs Gal-KO. Un meilleur contrôle du système du complément reste donc un objectif capital devant orienter les futurs stratégies visant à améliorer le devenir des xénogreffons. Grâce à une meilleure compréhension de l'incompatibilité moléculaire touchant les voie régulatrice de l'hémostase, l'intégration de transgènes ayant une fonction anticoagulante comme la TM ou l'EPCR dans le génome porcin devrait être pris en compte dans le choix des prochains programmes de transgénèses.

VIII.1 ARTICLE "THE VASCULAR AND COAGULATION ISSUES IN XENOTRANSPLANTATION" CURRENT OPINION IN ORGAN TRANSPLANTATION, 2009, APRIL; 14 (2): 161-7

The vascular and coagulation issues in xenotransplantation

Peter J. Cowan^{a,b}, Jean C. Roussel^c and Anthony J.F. d'Apice^{a,b}

^aImmunology Research Centre, St. Vincent's Hospital Melbourne, ^bDepartment of Medicine, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia and ^cService de chirurgie thoracique, Hôpital Nord Laennec, Nantes, France

Correspondence to Professor Peter J. Cowan, Immunology Research Centre, St. Vincent's Hospital Melbourne, PO Box 2900, Fitzroy 3065, VIC, Australia. Tel: +61 3 9288 3140; fax: +61 3 9288 3151; e-mail: peter.cowan@svhm.org.au

Current Opinion in Organ Transplantation 2009, 14:161–167

Purpose of review

Vascular injury is a complex process that is central to the rejection of solid-organ xenografts in the preclinical pig-to-primate model of xenotransplantation. This review summarizes recent work that provides insights into the mechanisms of vascular injury in GalT KO pig xenografts.

Recent findings

Several groups have reported further evidence for the importance of preexisting and elicited non-GalT antibodies, which are capable of fixing complement and activating graft endothelial cells. One important study showed that without complete suppression of these antibodies, there is a progressive activation and injury of xenograft endothelium, resulting in the development of thrombotic microangiopathy and graft loss. The mechanism of molecular incompatibilities affecting the control of coagulation across the species barrier has been examined in finer detail. The failure of pig thrombomodulin to promote activation of human protein C was found to be due to a deficiency in cofactor activity rather than to its capacity to bind human thrombin. On a positive note, pig tissue factor pathway inhibitor appears to be capable of efficiently regulating the human tissue factor pathway, contrary to earlier reports. We and others remain optimistic that overexpressing complement regulators anticoagulant proteins or both on the GalT knockout background will provide a significant protective effect, but definitive testing of this approach in the preclinical model is still forthcoming.

Summary

Preventing the activation of xenograft endothelium and consequent intravascular coagulation is critical to the future success of solid-organ xenotransplantation.

Keywords

antibody, coagulation, complement, endothelium, xenograft

Cur Opin Organ Transplant 14:161–167
© 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1087-2418

Introduction

Despite important advances in recent years, vascular injury and microvascular thrombosis remain as critical problems in pig-to-primate solid-organ xenotransplantation. Since the generation of the GalT knockout (KO) pig, hyperacute rejection of cardiac and renal xenografts is no longer an issue [1^{**},2–4], except perhaps in unusual circumstances, such as a particularly high titre of preexisting anti-non-Gal antibodies in the recipient. However, acute humoral/vascular rejection of xenografts has not been solved by the deletion of GalT. This review will begin by examining the interrelated causes of vascular injury to porcine xenografts, including binding of antibodies, fixing of complement, activation of endothelial cells, triggering of coagulation, and the interaction of innate immune cells, platelets, and cytotoxic lymphocytes (CTLs) with the endothelium. The injury process, no doubt, forms a continuum; however, for the purposes of discussion, we will arbitrarily divide it into an early phase, involving

predominantly innate mechanisms and covering the hours to days immediately after transplantation, and a later phase during which grafts are mostly lost due to the development of a humoral response and thrombotic microangiopathy. Next, we will look at the failure of key protective systems to function efficiently across the species barrier and discuss some of the attempts that have been made to solve these problems by pharmacological intervention. We will conclude by summarizing several existing and proposed donor genetic modifications designed to protect the vascular endothelium of the xenograft from injury. As GalT KO pigs are now relatively widely available [5^{*},6,7] and are clearly the background of choice, the review will be heavily weighted towards studies using GalT KO organs and cells, but insights from research using Gal-positive pigs will be included where relevant. We will also focus on heart and kidney xenotransplantation; readers seeking information on other organs are directed to recent reviews by Hara *et al.* [8] and Ekser *et al.* [9].

The early phase of vascular injury

The vasculature of the xenograft is the target of a range of immune and nonimmune challenges in the period immediately after reperfusion [10]. This finding has implications not only for early graft function but also for long-term outcome, because there is ample evidence that early injury of any type contributes significantly to late graft failure [11].

Preexisting antibodies to non-GaIT-specified antigens

Higher primates possess preexisting natural antibodies (nAbs) recognizing porcine antigens in addition to α Gal. We will refer to these antibodies as anti-non-GaIT rather than anti-non-Gal, because there is still some controversy over whether the α Gal epitope is completely absent in all GaIT KO pigs [12,13*,14]. The existence of anti-non-GaIT nAbs has been demonstrated *in vitro* by incubating naïve human or nonhuman primate (NHP) sera with wild-type and GaIT KO pig endothelial cells. The absence of GaIT reduced, but did not eliminate, antibody binding [13*,15*,16]. In a recent study using sera from 80 healthy human volunteers, anti-non-GaIT nAbs were detected in all samples, with considerable variability in both the immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) titres [16]. It seems likely that at least some of these antibodies recognize carbohydrate targets [17]. One candidate of particular interest is the Hanganutziu-Deicher antigen, which contains the *N*-glycolylneuraminic acid form of sialic acid and is expressed in pigs but not in humans [18]. Anti-Hanganutziu-Deicher IgM and IgG were detected in all of 19 human sera tested [16]. Although anti-Hanganutziu-Deicher constituted only a small fraction of total human anti-non-GaIT nAbs, it was suggested that these antibodies may nevertheless be important because they are efficient activators of porcine endothelial cells [15*,16].

Depending on their isotype, anti-non-GaIT nAbs are capable of causing early vascular injury by fixing complement, activating endothelial cells, promoting antibody-dependent cellular cytotoxicity, and binding platelets. But how relevant are these antibodies likely to be in clinical xenotransplantation, given that they are usually unable to induce hyperacute rejection in the pig-to-NHP model? This question is not easy to answer. Just as there is great variability in the titer and isotype spread of anti-pig nAbs in humans and NHPs, there may be variability in antigen expression in different strains of pig. Furthermore, the NHP preclinical model, although the best available, has several shortcomings including the fact that baboons (unlike humans) express the Hanganutziu-Deicher antigen [18]. Nevertheless, the limited data available suggest that early antibody-mediated injury to GaIT KO xenografts can and does occur. Biopsies taken within an hour of transplantation of GaIT KO

pig hearts or kidneys into baboons showed weak but detectable endothelial deposition of IgM and IgG [1**,4]. At the gross level, the renal xenografts developed widespread discoloration, which, although mostly resolved by 1 h, was clearly indicative of injury [4]. One caveat is that not all of the initial IgM binding may be attributable to preexisting antigens. Data from small animal models suggest that ischemia-reperfusion injury (IRI) exposes neo-epitopes that are recognized by natural IgM, triggering a complement-mediated acute inflammatory response [19]. These effects of IRI add further complexity to the task of identifying which anti-non-GaIT nAbs are important, and, therefore, which of their target antigens may need to be considered for elimination. Our view is that it is probably more practical and realistic to prevent the downstream effects of early IgM deposition.

Complement activation

There are three traditional routes of complement activation: the classical pathway, triggered by the binding of complement-fixing antibodies; the lectin pathway, initiated by interactions between mannan-binding lectin (MBL) and certain carbohydrate arrays; and the alternative pathway, activated by membrane-bound C3b. However, recent studies have revealed that there are several bypass activation pathways. Probably the most relevant to xenotransplantation is that thrombin can directly activate C5 independent of C3 [20**], representing a new link between coagulation and complement. In addition, MBL can directly activate C3 independent of C2 [21], and there may be a direct interaction between MBL and IgM to activate the lectin pathway [22]. C4d deposition has been observed in biopsies of GaIT KO cardiac and renal xenografts taken soon after transplantation [1**,4], indicating activation of the classical or lectin pathways or both. The relative importance of nAb binding, MBL and IRI have not been examined, but preventing the consequences of early complement activation may be simpler than trying to dissect the contributions of different mechanisms.

Endothelial cell activation

In the transplant setting, graft endothelial cells can be activated by a variety of stimuli including antibody binding, complement activation, innate immune cells and IRI, with the resulting phenotypic changes promoting inflammation and coagulation [23]. Using E-selectin expression as a measure of type II endothelial cell activation, Saethre *et al.* [24] showed that wild-type pig endothelial cells were activated *in vitro* by purified human IgG nAbs, particularly IgG3, in a complement-dependent manner. Deletion of GaIT greatly reduced the activation of endothelial cells by pooled human sera [15*], reflecting the absence of binding of anti-Gal nAbs and perhaps also the relative scarcity of the IgG3 isotype

among anti-non-GalT nAbs [16]. However, there was significant variability in activation of endothelial cells when 80 individual human sera were tested, with a range of 57–365 arbitrary units on GalT KO endothelial cells and 27–227 on wild-type endothelial cells. This discrepancy underlines the potential importance of carefully screening the antipig nAb repertoire of human recipients prior to solid-organ clinical xenotransplantation.

Immune cells, platelets, and coagulation

The interaction of human/NHP innate immune cells with porcine endothelial cells, particularly in the early phase, has been reviewed recently [25,26], but in-vivo data from GalT KO pig-to-primate xenografts is scarce. In a study of GalT KO pig-to-baboon cardiac xenografts, it was noted that polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells infiltrated the capillaries soon after transplantation [1**]. On the contrary, early biopsies showed few microthrombi in capillaries, with no evidence of ischemia or hemorrhage. In our own studies, a GalT KO renal xenograft removed 1 day after transplantation for reasons unrelated to rejection showed moderate platelet deposition in peritubular capillaries and a sparse macrophage infiltrate [4]. These very limited data make it difficult to gauge the importance of cellular infiltration and thrombosis in the early phase of vascular injury.

The late phase of vascular injury: acute rejection and thrombotic microangiopathy

Three studies using immunosuppressed baboons as recipients have characterized vascular injury to GalT KO renal and cardiac xenografts occurring beyond the early phase [1**,2,3,27,28]. In one study, the immunosuppressive protocol was insufficient to prevent a strong induction of complement-fixing anti-non-GalT antibodies, resulting in severe acute humoral rejection of renal xenografts after 8–16 days [3]. Rejected xenografts exhibited massive hemorrhage, infarction, necrosis, thrombosis, infiltration by polymorphonuclear cells, and deposition of IgM, IgG, C3, and C4d. Several recipients developed thrombocytopenia (platelet count less than $100 \times 10^9/l$) within a few days of transplantation, before graft function failed [3]. A second study, using a different donor genetic background and a different protocol including anti-CD154, reported longer renal xenograft survival (20–34 days), but a similar pathogenesis of rejection [2]. Composite vascularized thymus/kidney xenografts performed significantly better, with grafts functioning for between 16 and 83 days before recipients died from complications. The longest surviving graft showed only mild focal thrombotic microangiopathy and no detectable deposition of IgM [2], highlighting the promise of protocols aimed at tolerance induction.

In the third study, GalT KO hearts transplanted heterotopically into baboons were rejected after 59–179 days by a slowly progressing humoral process and the development of thrombotic microangiopathy [1**,27,28]. The third paper from this study [1**] is particularly important because it provides the first detailed pathology report of GalT KO solid-organ xenografts in baboons. Xenografts were classified as stage 1 (stable function and normal troponin T levels), stage 2 (deteriorating function and increasing troponin T), or stage 3 (little or no function, i.e., rejected). As grafts progressed from stage 1 to stage 3, thrombotic microangiopathy spread from capillaries to arteries of all sizes, with increasing myocardial ischemia, necrosis, and focal hemorrhage. Deposition of IgM, IgG, C3, C4d, and C5b-9 increased in capillary walls, with colocalization of antibody, complement, and platelets. Endothelial cells in capillaries and arteries became activated, with upregulation of von Willebrand factor and tissue factor (TF) and reduced expression of CD39; this progressed to apoptosis, necrosis and finally cell loss. Despite T-cell depletion and continuous immunosuppression, infiltration by CD3⁺ cells was observed soon after transplantation. These cells were especially prominent in stage 3 grafts, and some – presumably cytotoxic T cells or natural killer (NK) T cells – were in direct contact with apoptotic capillary cells. Shimizu *et al.* [1**] concluded that the immunosuppressive protocol, despite resulting in an absence of detectable circulating antipig antibodies, was probably unable to completely prevent a T-cell-dependent anti-non-GalT humoral response; the consequent activation, injury and death of endothelial cells triggered the formation of platelet-rich microthrombi and the development of thrombotic microangiopathy.

The anti-non-GalT antibodies elicited in primates in response to GalT KO xenografts [3,29**] or immunization with GalT KO cells [13*] have been shown to be either IgM or IgG and to possess strong complement-dependent cytotoxicity. Identifying the primary target(s) of these antibodies remains an elusive goal, although it has been suggested that a carbohydrate epitope(s) that is structurally related to but distinct from α Gal may be important [13*].

Molecular incompatibilities affecting vascular integrity

Homologous restriction – the apparent inability of complement regulatory factors (CRFs) from one species to efficiently control activation of complement from another species – was the rationale for developing the human decay-accelerating factor (hDAF) transgenic pig [30], which was the first solution to hyperacute rejection. As it turns out, pig CRFs regulate human complement

activation quite well [31], and the success of the hDAF pig was probably due to an increase in overall regulatory capacity rather than correction of an inherent incompatibility. Nevertheless, there are other confirmed examples of molecular incompatibility, which may contribute to endothelial injury and xenograft rejection.

Aberrant regulation of coagulation and inflammation

The endothelial membrane protein thrombomodulin is a critical anticoagulant and anti-inflammatory molecule. Thrombomodulin modulates thrombin's activity by altering its preferred substrate range, preventing cleavage of fibrinogen and activation of PAR-1, and promoting activation of protein C and thrombin-activated fibrinolysis inhibitor (TAFI), as well as cleavage of the potent pro-inflammatory protein HMGB1. Following on from original work by Siegel *et al.* [32], we demonstrated recently that pig thrombomodulin efficiently binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI [33**]. It would be interesting to extend these studies to HMGB1, which has been implicated as a potentially important effector molecule in acute allograft rejection [34,35]. Co-culture of pig endothelial cells with human T cells stimulates significant release of HMGB1 by both cell types [36*].

Another endothelial protein, tissue factor pathway inhibitor-1 (TFPI-1), is a key physiological regulator of the initiation phase of coagulation, forming an inactive quaternary complex with factor Xa and factor VIIa/TF. Early studies suggested a molecular incompatibility between pig TFPI and the human TF pathway [37]. However, we have cloned and expressed pig TFPI and showed that it binds human factor Xa and inactivates human factor VIIa/TF with a similar efficiency to human TFPI, at least *in vitro* [38*].

A recent *in-vitro* study has revealed that there may be a prothrombotic pathway in the pig-to-human setting that operates independently of endothelial cells activation [39**]. Incubation of quiescent wild-type pig endothelial cells with human platelets or monocytes in the absence of human serum caused upregulation of active TF on the human cells [39**]. This suggests that even if the humoral response to xenografts can be completely suppressed, there may yet be some degree of systemic coagulation due to expression of blood-borne TF. The mechanism of this unexpected effect, its relevance *in vivo*, and the role (if any) of α Gal remain to be determined.

Aberrant interactions of innate immune cells with the endothelium

Accumulating *in-vitro* data indicate that human innate immune cells interact abnormally with pig endothelial

cells. These data are reviewed elsewhere [25,26,40], but to summarize, the problem appears to lie with the failure of some porcine ligands to activate inhibitory receptors on human NK cells and macrophages. Suggested strategies to deal with this problem include transgenic expression of HLA-E [41] and CD47 [42] on pig endothelium.

Absence of protective interferon- γ signalling

Interferon- γ (IFN γ) is normally viewed as a pro-inflammatory cytokine, but Sis *et al.* [43] and Famulski *et al.* [44*] have reported that early IFN γ signalling may play a key role in protecting the microcirculation of allografts from injury by CTLs and macrophages. It was proposed that major histocompatibility complex class I on donor tissue, upregulated by IFN γ , engaged inhibitory receptors on recipient inflammatory cells to limit perforin/granzyme-mediated damage and prevent alternative macrophage activation. As noted by the authors, the early (day 5–7) microcirculatory collapse in mouse renal allografts lacking IFN γ receptors may have parallels in the pig-to-primate setting because of species-specific defects in IFN γ signalling in the latter [43].

Pharmacological intervention

Several therapies aimed at inhibiting thrombosis have shown some promise in *ex-vivo* organ perfusion models, albeit using Gal-positive pigs. These include activated protein C [45], desmopressin [46], and tirofiban [47]. However, *in-vivo* studies using various agents have generally been disappointing [48,49]. The delayed development of thrombotic microangiopathy in a baboon recipient of a GalT KO cardiac xenograft hinted at some protective benefit of aspirin treatment [28], although this was by no means conclusive.

Genetic modification of the donor

Genetic modification of pigs for xenotransplantation has been practiced for more than 13 years [30], and techniques such as cloning by somatic cell nuclear transfer have dramatically improved the process. The combined ability to clone GalT KO pigs [5*] and to clone pigs from transfected adult fibroblasts [50*] should allow rapid progress. Some of the more relevant modifications, existing or planned, are listed below.

Carbohydrate remodelling of the pig cell surface

Transgenic expression of particular glycosyltransferases in the pig has been proposed as a means of downregulating non-GalT carbohydrate antigens [51] or masking carbohydrate antigens exposed by deletion of GalT [29**]. Although this approach seems simple in principle, we would advocate caution because carbohydrate biology

is extraordinarily complex, and interfering with the glycosyltransferase balance can have unpredictable and detrimental effects *in vivo* [52,53].

Expression of human complement regulatory factors

There is no doubt that human complement regulatory factor (hCRF) expression protects Gal-positive xenografts, but two questions remain: is it still necessary to overexpress hCRFs in the age of the GalT KO pig, and if so, which one(s)? Although there are no definitive *in-vivo* data published at present, it seems logical that hCRF expression will complement (pardon the pun) the GalT KO mutation by dealing with the many sources of 'non-GalT-mediated' complement activation outlined earlier in this review. This view is supported by an *in-vitro* study of endothelial cells isolated from genetically modified pigs which showed that the combination of GalT KO and human CD46 expression afforded greater protection from human complement-dependent cytotoxicity than either did alone [29**].

Which molecule(s) to express is perhaps a more difficult question to answer. CD55 (hDAF) has been the most widely used, but CD46 has also generated impressive results [29**,48,54]. It is conceivable that direct activation of C5 by thrombin will bypass the regulatory capacity of CD46 and CD55, which act at the level of the C3 and C5 convertases. One could, therefore, make a case for co-expression of CD59, which inhibits the formation of membrane attack complex [55].

Expression of anticoagulant/antiplatelet molecules

Although hCRF expression may have a limited impact on thrombosis by inhibiting the crosstalk that is known to take place between complement and coagulation [56], it is hoped that overexpression of anticoagulant or antiplatelet proteins or both on the endothelium of xenografts will have a more powerful effect [10,57]. Among the molecules to be successfully tested in small animal models are human CD39, thrombomodulin, and endothelial protein C receptor [58,59], and human TFPI and the leech antithrombin hirudin [60]. Which one or more of these will be effective *in vivo* in the pig-to-primate model remains to be tested.

Conclusion

The events occurring at the endothelial interface between a porcine xenograft and a human recipient are highly complex and difficult to model accurately. Nevertheless, the past year has brought some important advances. A more complete picture of the rejection process of GalT KO organs by NHPs has been established. There is also a better understanding of the mechanisms of particular molecular incompatibilities, along with steadily improving techniques for genetic

modification of the pig. These developments augur well for the future of clinical xenotransplantation of solid organs.

Acknowledgement

This work was supported in part by funding from the National Health and Medical Research Council of Australia.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (p. 214).

- 1 Shimizu A, Hisashi Y, Kuwaki K, *et al.* Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am J Pathol* 2008; 172:1471–1481.
- 2 Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, *et al.* Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 2005; 11:32–34.
- 3 Chen G, Qian H, Starzl T, *et al.* Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 2005; 11:1295–1298.
- 4 Cowan PJ, Sakaris EJ, Critik S, *et al.* Gal KO pig renal xenografts are not hyperacutely rejected by nonimmunosuppressed baboons. *Am J Transplant* 2008; 8:1050.
- 5 Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, *et al.* Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 2007; 14:339–344.
- 6 Fujimura T, Takahagi Y, Shigehisa T, *et al.* Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene-deficient pigs by somatic cell nuclear transfer: a novel selection method for gal alpha 1,3-Gal antigen-deficient cells. *Mol Reprod Dev* 2008; 75:1372–1378.
- 7 Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, *et al.* Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:7335–7340.
- 8 Hara H, Gridelli B, Lin YJ, *et al.* Liver xenografts for the treatment of acute liver failure: clinical and experimental experience and remaining immunologic barriers. *Liver Transpl* 2008; 14:425–434.
- 9 Ekser B, Rigotti P, Gridelli B, Cooper DKC. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl Immunol* 2008. [Epub ahead of print].
- 10 Cowan PJ. Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* 2007; 14:7–12.
- 11 Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2008; 81:643–654.
- 12 Christiansen D, Millard J, Moutouris E, *et al.* Humans lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation. *PLoS Biol* 2008; 6:e172.
- 13 Kernan K, Hamden I, Gunthart M, *et al.* The anthogal xenoantibody response to xenoantigens on gal knockout pig cells is encoded by a restricted number of germline progenitors. *Am J Transplant* 2008; 8:1829–1839.
- 14 Diswell M, Angstrom J, Schuurman HJ, *et al.* Studies on glycolipid antigens in small intestine and pancreas from alpha1,3-galactosyltransferase knockout miniature swine. *Transplantation* 2007; 84:1348–1356.

- 15 Saethre M, Baumann BC, Fung M, *et al.* Characterization of natural human antinongal antibodies and their effect on activation of porcine gal-deficient endothelial cells. *Transplantation* 2007; 84:244–250.
- The interest in this paper is in the large number of naïve human serum samples tested and the great variation that was observed in anti-non-GaIT antibody titres and in the ability of individual sera to activate GaIT KO endothelial cells. This situation may add to the unpredictability likely to be faced with clinical xenotransplantation and suggests the need for rigorous pretesting of human recipients.
- 16 Baumann BC, Stuesi G, Huggel K, *et al.* Reactivity of human natural antibodies to endothelial cells from Gal α (1,3)Gal-deficient pigs. *Transplantation* 2007; 83:193–201.
- 17 Ezzelarab M, Ayares D, Cooper DK. Carbohydrates in xenotransplantation. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:396–404.
- 18 Morozumi K, Kobayashi T, Usami T, *et al.* Significance of histochemical expression of Hanganutziu–Deicher antigens in pig, baboon and human tissues. *Transplant Proc* 1999; 31:942–944.
- 19 Zhang M, Carroll MC. Natural antibody mediated innate autoimmune response. *Mol Immunol* 2007; 44:103–110.
- 20 Huber-Lang M, Sama JV, Zebune FS, *et al.* Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 2006; 12:682–687.
- This paper is not from the field of xenotransplantation, but nevertheless may have a significant impact, because it demonstrates that human thrombin can directly activate C5 without the participation of earlier components of the complement pathway. In the procoagulant environment of the xenograft, this can potentially generate the membrane attack complex even in the presence of CD46 and CD55.
- 21 Selander B, Marfensson U, Weintraub A, *et al.* Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest* 2006; 116:1425–1434.
- 22 McMullen ME, Hart ML, Walsh MC, *et al.* Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology* 2006; 211:759–766.
- 23 Aird WC. Endothelium and allotransplantation. *Transplantation* 2006; 82:56–58.
- 24 Saethre M, Lea T, Borgen MS, *et al.* Human complement-activating immunoglobulin (Ig)G3 antibodies are essential for porcine endothelial cell activation. *Xenotransplantation* 2006; 13:215–223.
- 25 Schneider MK, Seebach JD. Current cellular innate immune hurdles in pig-to-primate xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13:171–177.
- 26 Le Bas-Bernardet S, Blancho G. Current cellular immunological hurdles in pig-to-primate xenotransplantation. *Transpl Immunol* 2008. [Epub ahead of print]
- 27 Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, *et al.* Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 2005; 11:29–31.
- 28 Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJ, *et al.* alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* 2005; 80:1493–1500.
- 29 Hara H, Long G, Lin YJ, Tai HC, Ezzelarab M, Ayares D, Cooper DK. In vitro investigation of pig cells for resistance to human antibody-mediated rejection. *Transpl Int* 2008; 21:1163–1174.
- This in-vitro study shows that transgenic CD46 expression on the GaIT KO background significantly protects pig endothelial cells from lysis by human serum. It strongly supports the argument that expression of human complement regulatory factors will be a critical adjunct to the deletion of GaIT.
- 30 Rosengard AM, Cary N, Horsley J, *et al.* Endothelial expression of human decay accelerating factor in transgenic pig tissue: a potential approach for human complement inactivation in discordant xenografts. *Transplant Proc* 1995; 27:326–327.
- 31 Morgan BP, Berg CW, Harris CL. 'Homologous restriction' in complement lysis: roles of membrane complement regulators. *Xenotransplantation* 2005; 12:258–265.
- 32 Siegel JB, Grey ST, Lesnikoski BA, *et al.* Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin. *Transplantation* 1997; 64:888–896.
- 33 Roussel JC, Moran CJ, Salvaris EJ, *et al.* Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am J Transplant* 2008; 8:1101–1112.
- This study dissects the molecular incompatibility between pig thrombomodulin and human thrombin and demonstrates for the first time that the pig regulator is an inefficient cofactor for activating human TAFI in addition to protein C.
- 34 Huang Y, Yin H, Han J, *et al.* Extracellular hmgb1 functions as an innate immune-mediator implicated in murine cardiac allograft acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7:799–808.
- 35 Moser B, Szabolcs MJ, Ankersmit HJ, *et al.* Blockade of RAGE suppresses alloimmune reactions in vitro and delays allograft rejection in murine heart transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7:293–302.
- 36 Kawahara K, Setoyama K, Kikuchi K, *et al.* HMGB1 release in co-cultures of porcine endothelial and human T cells. *Xenotransplantation* 2007; 14:636–641.
- HMGB1 is a potent pro-inflammatory molecule that has been implicated in transplant rejection, so the release of pig and human HMGB1 detected in this co-culture system may be relevant to xenograft rejection.
- 37 Kopp CW, Siegel JB, Hancock WW, *et al.* Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors. *Transplantation* 1997; 63:749–758.
- 38 Lee KF, Salvaris EJ, Roussel JC, *et al.* Recombinant pig TFPI efficiently regulates human tissue factor pathways. *Xenotransplantation* 2008; 15:191–197.
- This paper refutes the long-held view that pig TFPI is incompatible with human tissue factor. It does not however, negate the case for transgenic expression of TFPI on pig endothelium.
- 39 Lin CC, Chen D, McVey JH, *et al.* Expression of tissue factor and initiation of clotting by human platelets and monocytes after incubation with porcine endothelial cells. *Transplantation* 2008; 86:702–709.
- This study shows that resting pig endothelial cells promote the expression of TF on human platelets and monocytes even in the absence of human serum, raising concerns that thrombosis may remain a problem for xenografts even in the absence of a humoral response.
- 40 Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:519–531.
- 41 Lilienfeld BG, Crew MD, Forte P, *et al.* Transgenic expression of HLA-E single chain trimer protects porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Xenotransplantation* 2007; 14:126–134.
- 42 Wang H, VerHalen J, Madariaga ML, *et al.* Attenuation of phagocytosis of xenogeneic cells by manipulating CD47. *Blood* 2007; 109:836–842.
- 43 Sis B, Famulski KS, Allanach KL, *et al.* IFN-gamma prevents early perforin-granzyme-mediated destruction of kidney allografts by inducing donor class I products in the kidney. *Am J Transplant* 2007; 7:2301–2310.
- 44 Famulski KS, Sis B, Billesberger L, Halloran PF. Interferon-gamma and donor MHC class I control alternative macrophage activation and activin expression in rejecting kidney allografts: a shift in the Th1–Th2 paradigm. *Am J Transplant* 2008; 8:547–556.
- This study, following on from previous work by the same group, shows that defective IFN γ signalling – as might be expected in pig-to-human xenografts – results in alternative macrophage activation and early microcirculatory collapse in murine renal allografts.
- 45 Ramackers W, Friedrich L, Tiede A, *et al.* Effects of pharmacological intervention on coagulopathy and organ function in xenoperfused kidneys. *Xenotransplantation* 2008; 15:46–55.
- 46 Kim YT, Lee HJ, Lee SW, *et al.* Pretreatment of porcine pulmonary xenograft with desmopressin: a novel strategy to attenuate platelet activation and systemic intravascular coagulation in an ex-vivo model of swine-to-human pulmonary xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2008; 15:27–35.
- 47 Brandl U, Jockle H, Erhardt M, *et al.* Reduced fibrin deposition and intravascular thrombosis in hDAF transgenic pig hearts perfused with tirofiban. *Transplantation* 2007; 84:1667–1676.
- 48 Byrne GW, Davies WR, Oi K, *et al.* Increased immunosuppression, not anticoagulation, extends cardiac xenograft survival. *Transplantation* 2006; 82:1787–1791.
- 49 Cozzi E, Simioni P, Boldrin M, *et al.* Effects of long-term administration of high-dose recombinant human antithrombin in immunosuppressed primate recipients of porcine xenografts. *Transplantation* 2005; 80:1501–1510.
- 50 Brunetti D, Perota A, Lagutina I, *et al.* Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned pigs derived from in vitro transfected adult fibroblasts. *Cloning Stem Cells* 2006; 10:409–419.
- This paper describes a robust method for cloning pigs from transfected adult fibroblasts, representing an important technological advance in the genetic manipulation of pigs.
- 51 Matsunami K, Myagawa S, Nakagawa K, *et al.* Molecular cloning of pigGnT1 and I2: an application to xenotransplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343:677–683.
- 52 Brown SJ, Miller AM, Cowan PJ, *et al.* Altered immune system glycosylation causes colitis in alpha1,2-fucosyltransferase transgenic mice. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10:546–556.
- 53 Moore GT, Brown SJ, Winterhalter AC, *et al.* Glycosylation changes in hFUT1 transgenic mice increase TCR signalling and apoptosis resulting in thymocyte maturation arrest. *Mol Immunol* 2008; 45:2401–2410.

- 54 Loveland BE, Millard J, Kyriakou P, *et al.* Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in nonimmunosuppressed baboons. *Xenotransplantation* 2004; 11:171–183.
- 55 Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, *et al.* Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in nonimmunosuppressed baboons. *Transplantation* 2000; 69:2504–2515.
- 56 Markowski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, *et al.* Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol* 2007; 28:184–192.
- 57 Cowan PJ, d'Apice AJ. The coagulation barrier in xenotransplantation: incompatibilities and strategies to overcome them. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13:178–183.
- 58 Dwyer KM, Robson SC, Nandurkar HH, *et al.* Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J Clin Invest* 2004; 113:1440–1446.
- 59 d'Apice AJF, Cowan PJ. Xenotransplantation: the next generation of engineered animals. *Transpl Immunol* 2008. [Epub ahead of print]
- 60 Chen D, Weber M, McVey JH, *et al.* Complete inhibition of acute humoral rejection using regulated expression of membrane-tethered anticoagulants on xenograft endothelium. *Am J Transplant* 2004; 4:1958–1963.

Bibliographie

- (2009). "First WHO Global Consultation on Regulatory Requirements for Xenotransplantation Clinical Trials: Changsha, China, 19-21 November 2008. The Changsha Communiqué." *Xenotransplantation* **16**(2): 61-3.
- Bach, F. H., S. C. Robson, et al. (1994). "Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection." *Immunol Rev* **141**: 5-30.
- Bach, F. H., S. C. Robson, et al. (1995). "Barriers to xenotransplantation." *Nat Med* **1**(9): 869-73.
- Bach, F. H., H. Winkler, et al. (1996). "Delayed xenograft rejection." *Immunol Today* **17**(8): 379-84.
- Bailey, L. L., S. L. Nehlsen-Cannarella, et al. (1985). "Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate." *Jama* **254**(23): 3321-9.
- Bajzar, L., J. Morser, et al. (1996). "TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex." *J Biol Chem* **271**(28): 16603-8.
- Baron, O., A. Le Guyader, et al. (2003). "Does the pretransplant UNOS status modify the short- and long-term cardiac transplant prognosis?" *Ann Thorac Surg* **75**(6): 1878-85.
- Beller-Todd, B., L. T. Archer, et al. (1979). "Recovery from endotoxin shock after extracorporeal perfusion without anticoagulation." *Circ Shock* **6**(3): 261-9.
- Bertina, R. M., B. P. Koeleman, et al. (1994). "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C." *Nature* **369**(6475): 64-7.
- Bourin, M. C., M. C. Boffa, et al. (1986). "Functional domains of rabbit thrombomodulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(16): 5924-8.
- Bourin, M. C. and U. Lindahl (1993). "Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation." *Biochem J* **289** (Pt 2): 313-30.
- Bourin, M. C., E. Lundgren-Akerlund, et al. (1990). "Isolation and characterization of the glycosaminoglycan component of rabbit thrombomodulin proteoglycan." *J Biol Chem* **265**(26): 15424-31.
- Brauer, R. B., W. M. Baldwin, 3rd, et al. (1993). "Use of C6-deficient rats to evaluate the mechanism of hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts." *J Immunol* **151**(12): 7240-8.
- Byrne, G. W., K. R. McCurry, et al. (1997). "Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage." *Transplantation* **63**(1): 149-55.
- Calne, R. Y. (1970). "Organ transplantation between widely disparate species." *Transplant Proc* **2**(4): 550-6.
- Campbell, W., N. Okada, et al. (2001). "Carboxypeptidase R is an inactivator of complement-derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis." *Immunol Rev* **180**: 162-7.
- Candinas, D., F. H. Bach, et al. (1996). "Delayed xenograft rejection in complement-depleted T-cell-deficient rat recipients of guinea pig cardiac grafts." *Transplant Proc* **28**(2): 678.
- Chen, G., H. Qian, et al. (2005). "Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys." *Nat Med* **11**(12): 1295-8.
- Chen, Y., W. Tan, et al. (2007). "Full-length cDNA cloning and protein three-dimensional structure modeling of porcine prothrombin." *Blood Cells Mol Dis* **38**(2): 93-9.
- Cheng, T., D. Liu, et al. (2003). "Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective." *Nat Med* **9**(3): 338-42.
- Comp, P. C., R. M. Jaccobs, et al. (1982). "Activation of protein C in vivo." *J Clin Invest* **70**(1): 127-34.
- Conway, E. M., S. Pollefeyt, et al. (1997). "The amino terminal lectin-like domain of thrombomodulin is required for constitutive endocytosis." *Blood* **89**(2): 652-61.
- Conway, E. M. and R. D. Rosenberg (1988). "Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells." *Mol Cell Biol* **8**(12): 5588-92.
- Conway, E. M., M. Van de Wouwer, et al. (2002). "The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule

- expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways." *J Exp Med* **196**(5): 565-77.
- Cooper, D. K. (1998). "Xenoantigens and xenoantibodies." *Xenotransplantation* **5**(1): 6-17.
- Cooper, D. K. (2009). "Global consultation on regulatory requirements for xenotransplantation in clinical trials. Conference held in Changsha, China, November 19-21, 2008." *Xenotransplantation* **16**(2): 58-60.
- Cooper, D. K., E. Koren, et al. (1993). "Genetically engineered pigs." *Lancet* **342**(8872): 682-3.
- Cowan, P. J., A. Aminian, et al. (2000). "Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons." *Transplantation* **69**(12): 2504-15.
- Cowan, P. J., T. A. Shinkel, et al. (2003). "Targeting gene expression to endothelium in transgenic animals: a comparison of the human ICAM-2, PECAM-1 and endoglin promoters." *Xenotransplantation* **10**(3): 223-31.
- Cozzi, E., C. Vial, et al. (2003). "Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts." *Xenotransplantation* **10**(4): 300-10.
- Cozzi, E. and D. J. White (1995). "The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans." *Nat Med* **1**(9): 964-6.
- Crawley, J. T. and D. A. Lane (2008). "The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(2): 233-42.
- Dahlback, B. (1994). "Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism." *J Clin Invest* **94**(3): 923-7.
- Dalmasso, A. P., G. M. Vercellotti, et al. (1991). "Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection." *Transplantation* **52**(3): 530-3.
- Daniels, L. J. and J. L. Platt (1997). "Hyperacute xenograft rejection as an immunologic barrier to xenotransplantation." *Kidney Int Suppl* **58**: S28-35.
- d'Apice, A. J. and P. J. Cowan (2007). "Building on the GalKO platform." *Transplantation* **84**(1): 10-1.
- Dejana, E., A. Callioni, et al. (1979). "Bleeding time in laboratory animals. II - A comparison of different assay conditions in rats." *Thromb Res* **15**(1-2): 191-7.
- Delikouras, A., M. Hayes, et al. (2001). "Nitric oxide-mediated expression of Bcl-2 and Bcl-xl and protection from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in porcine endothelial cells after exposure to low concentrations of xenoreactive natural antibody." *Transplantation* **71**(5): 599-605.
- Deming, C. B., A. Y. Kim, et al. (2003). "cDNA cloning of rabbit thrombomodulin and characterization of gene expression in cardiovascular tissue." *DNA Seq* **14**(6): 399-405.
- Diamond, L. E., K. R. McCurry, et al. (1996). "Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium." *Transplantation* **61**(8): 1241-9.
- Dittman, W. A., T. Kumada, et al. (1988). "The structure and function of mouse thrombomodulin. Phorbol myristate acetate stimulates degradation and synthesis of thrombomodulin without affecting mRNA levels in hemangioma cells." *J Biol Chem* **263**(30): 15815-22.
- Dittman, W. A. and P. W. Majerus (1989). "Sequence of a cDNA for mouse thrombomodulin and comparison of the predicted mouse and human amino acid sequences." *Nucleic Acids Res* **17**(2): 802.
- Dittman, W. A. and P. W. Majerus (1990). "Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant." *Blood* **75**(2): 329-36.
- Dorling, A., C. Stocker, et al. (1996). "In vitro accommodation of immortalized porcine endothelial cells: resistance to complement mediated lysis and down-regulation of VCAM expression induced by low concentrations of polyclonal human IgG anti-pig antibodies." *Transplantation* **62**(8): 1127-36.
- Edano, T., N. Kumai, et al. (1998). "The glycosylation sites and structural characteristics of oligosaccharides on recombinant human thrombomodulin." *Int J Biochem Cell Biol* **30**(1): 77-88.

- Egan, J. O., M. Kalafatis, et al. (1997). "The effect of Arg306-->Ala and Arg506-->Gln substitutions in the inactivation of recombinant human factor Va by activated protein C and protein S." *Protein Sci* **6**(9): 2016-27.
- Esmon, C. T. (1987). "The regulation of natural anticoagulant pathways." *Science* **235**(4794): 1348-52.
- Esmon, C. T. (1989). "The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation." *J Biol Chem* **264**(9): 4743-6.
- Esmon, C. T. (2003). "The protein C pathway." *Chest* **124**(3 Suppl): 26S-32S.
- Esmon, C. T. and W. G. Owen (1981). "Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(4): 2249-52.
- Esmon, C. T., J. Xu, et al. (1999). "Endothelial protein C receptor." *Thromb Haemost* **82**(2): 251-8.
- Estelles, A., I. Garcia-Plaza, et al. (1984). "Severe inherited "homozygous" protein C deficiency in a newborn infant." *Thromb Haemost* **52**(1): 53-6.
- Fabre, J. E., M. Nguyen, et al. (1999). "Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice." *Nat Med* **5**(10): 1199-202.
- Fuentes-Prior, P., Y. Iwanaga, et al. (2000). "Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex." *Nature* **404**(6777): 518-25.
- Fukudome, K. and C. T. Esmon (1994). "Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor." *J Biol Chem* **269**(42): 26486-91.
- Fukudome, K. and C. T. Esmon (1995). "Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR." *J Biol Chem* **270**(10): 5571-7.
- Fukudome, K., X. Ye, et al. (1998). "Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor." *J Exp Med* **187**(7): 1029-35.
- Galili, U. and K. Swanson (1991). "Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7401-4.
- Gandrille, S., D. Borgel, et al. (1997). "Protein S deficiency: a database of mutations. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* **77**(6): 1201-14.
- Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes." *Nature* **397**(6718): 436-41.
- Gerlitz, B., T. Hassell, et al. (1993). "Identification of the predominant glycosaminoglycan-attachment site in soluble recombinant human thrombomodulin: potential regulation of functionality by glycosyltransferase competition for serine474." *Biochem J* **295** (Pt 1): 131-40.
- Gerson, W. T., J. D. Dickerman, et al. (1993). "Severe acquired protein C deficiency in purpura fulminans associated with disseminated intravascular coagulation: treatment with protein C concentrate." *Pediatrics* **91**(2): 418-22.
- Glomsda, B. A., R. A. Blaheta, et al. (2003). "Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil." *Spinal Cord* **41**(11): 610-9.
- Godwin, J. W., N. Fiscaro, et al. (2006). "Towards endothelial cell-specific transgene expression in pigs: characterization of the pig ICAM-2 promoter." *Xenotransplantation* **13**(6): 514-21.
- Gonda, Y., S. Hirata, et al. (1993). "Antithrombotic effect of recombinant human soluble thrombomodulin on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats." *Thromb Res* **71**(4): 325-35.
- Gonzalez-Stawinski, G. V., C. W. Daggett, et al. (2002). "Non-anti-Gal alpha1-3Gal antibody mechanisms are sufficient to cause hyperacute lung dysfunction in pulmonary xenotransplantation." *J Am Coll Surg* **194**(6): 765-73.
- Grey, S. T., A. Tsuchida, et al. (1994). "Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester." *J Immunol* **153**(8): 3664-72.
- Griffin, J. H., B. Evatt, et al. (1981). "Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease." *J Clin Invest* **68**(5): 1370-3.

- Griffin, J. H., D. F. Mosher, et al. (1982). "Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation." *Blood* **60**(1): 261-4.
- Grinnell, B. W., R. B. Hermann, et al. (1994). "Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide." *Glycobiology* **4**(2): 221-5.
- Gu, J. M., Y. Katsuura, et al. (2000). "Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo." *Blood* **95**(5): 1687-93.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, et al. (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." *Science* **287**(5453): 607-14.
- Hancock, W. W., A. Tsuchida, et al. (1992). "The anticoagulants protein C and protein S display potent antiinflammatory and immunosuppressive effects relevant to transplant biology and therapy." *Transplant Proc* **24**(5): 2302-3.
- Hanson, S. R., J. H. Griffin, et al. (1993). "Antithrombotic effects of thrombin-induced activation of endogenous protein C in primates." *J Clin Invest* **92**(4): 2003-12.
- Harris, K. W. and C. T. Esmon (1985). "Protein S is required for bovine platelets to support activated protein C binding and activity." *J Biol Chem* **260**(4): 2007-10.
- Harrison, S., A. Boquest, et al. (2004). "An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs." *Cloning Stem Cells* **6**(4): 327-31.
- Hasegawa, N., T. G. Kandra, et al. (1996). "The effects of recombinant human thrombomodulin on endotoxin-induced multiple-system organ failure in rats." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(6 Pt 1): 1831-7.
- Hayashi, T., M. Zushi, et al. (1990). "Further localization of binding sites for thrombin and protein C in human thrombomodulin." *J Biol Chem* **265**(33): 20156-9.
- Heemann, U., H. Azuma, et al. (1996). "Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts." *Transpl Immunol* **4**(1): 64-7.
- Hinshaw, L. B., A. C. Chang, et al. (1982). "Extracorporeal perfusion without exogenous anticoagulation: its protective role in endotoxin shock." *Circ Shock* **9**(3): 281-95.
- Hofsteenge, J., H. Taguchi, et al. (1986). "Effect of thrombomodulin on the kinetics of the interaction of thrombin with substrates and inhibitors." *Biochem J* **237**(1): 243-51.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Ireland, H., G. Kunz, et al. (1997). "Thrombomodulin gene mutations associated with myocardial infarction." *Circulation* **96**(1): 15-8.
- Jackman, R. W., D. L. Beeler, et al. (1987). "Human thrombomodulin gene is intron depleted: nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(18): 6425-9.
- Jackman, R. W., D. L. Beeler, et al. (1986). "Characterization of a thrombomodulin cDNA reveals structural similarity to the low density lipoprotein receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 8834-8.
- Johnson, A. E., N. L. Esmon, et al. (1983). "Structural changes required for activation of protein C are induced by Ca²⁺ binding to a high affinity site that does not contain gamma-carboxyglutamic acid." *J Biol Chem* **258**(9): 5554-60.
- Joziassse, D. H., J. H. Shaper, et al. (1991). "Characterization of an alpha 1----3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene." *J Biol Chem* **266**(11): 6991-8.
- Kaneko, H., N. Joubara, et al. (2000). "Protective effect of human urinary thrombomodulin on ischemia-reperfusion injury in the canine liver." *Eur Surg Res* **32**(2): 87-93.
- Kapiotis, S., J. Besemer, et al. (1991). "Interleukin-4 counteracts pyrogen-induced downregulation of thrombomodulin in cultured human vascular endothelial cells." *Blood* **78**(2): 410-5.
- Kawakatsu, T., H. Ogita, et al. (2005). "Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac." *J Biol Chem* **280**(6): 4940-7.

- Kokame, K., X. Zheng, et al. (1998). "Activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor requires epidermal growth factor-like domain 3 of thrombomodulin and is inhibited competitively by protein C." *J Biol Chem* **273**(20): 12135-9.
- Kopp, C. W., S. T. Grey, et al. (1998). "Expression of human thrombomodulin cofactor activity in porcine endothelial cells." *Transplantation* **66**(2): 244-51.
- Kopp, C. W., S. C. Robson, et al. (1998). "Regulation of monocyte tissue factor activity by allogeneic and xenogeneic endothelial cells." *Thromb Haemost* **79**(3): 529-38.
- Kopp, C. W., J. B. Siegel, et al. (1997). "Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors." *Transplantation* **63**(5): 749-58.
- Koren, E., M. Kujundzic, et al. (1994). "Cytotoxic effects of human preformed anti-Gal IgG and complement on cultured pig cells." *Transplant Proc* **26**(3): 1336-9.
- Kunz, G., H. A. Ireland, et al. (2000). "Identification and characterization of a thrombomodulin gene mutation coding for an elongated protein with reduced expression in a kindred with myocardial infarction." *Blood* **95**(2): 569-76.
- Kunz, G., A. K. Ohlin, et al. (2002). "Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function." *Blood* **99**(10): 3646-53.
- Kurosawa, S., C. T. Esmon, et al. (2000). "The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18." *J Immunol* **165**(8): 4697-703.
- Kurosawa, S., J. B. Galvin, et al. (1987). "Proteolytic formation and properties of functional domains of thrombomodulin." *J Biol Chem* **262**(5): 2206-12.
- Kurosawa, S., D. J. Stearns, et al. (1988). "A 10-kDa cyanogen bromide fragment from the epidermal growth factor homology domain of rabbit thrombomodulin contains the primary thrombin binding site." *J Biol Chem* **263**(13): 5993-6.
- Kuwaki, K., Y. L. Tseng, et al. (2005). "Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience." *Nat Med* **11**(1): 29-31.
- Lai, L., D. Kolber-Simonds, et al. (2002). "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning." *Science* **295**(5557): 1089-92.
- Lambrigts, D., P. Van Calster, et al. (1998). "Pharmacologic immunosuppressive therapy and extracorporeal immunoadsorption in the suppression of anti-alphaGal antibody in the baboon." *Xenotransplantation* **5**(4): 274-83.
- Lane, D. A., P. M. Mannucci, et al. (1996). "Inherited thrombophilia: Part 1." *Thromb Haemost* **76**(5): 651-62.
- Lane, D. A., P. M. Mannucci, et al. (1996). "Inherited thrombophilia: Part 2." *Thromb Haemost* **76**(6): 824-34.
- Laszik, Z., A. Mitro, et al. (1997). "Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway." *Circulation* **96**(10): 3633-40.
- Lawson, J. H. and J. L. Platt (1996). "Molecular barriers to xenotransplantation." *Transplantation* **62**(3): 303-10.
- Lentz, S. R., M. Tsiang, et al. (1991). "Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms." *Blood* **77**(3): 542-50.
- Leventhal, J. R., A. P. Dalmaso, et al. (1993). "Complement depletion prolongs discordant cardiac xenograft survival in rodents and non-human primates." *Transplant Proc* **25**(1 Pt 1): 398-9.
- Leventhal, J. R., R. John, et al. (1995). "Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies." *Transplantation* **59**(2): 294-300.
- Li, W., X. Zheng, et al. (2005). "Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin." *J Thromb Haemost* **3**(7): 1351-9.
- Liaw, P. C., P. F. Neuenschwander, et al. (2000). "Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function." *J Biol Chem* **275**(8): 5447-52.
- Lin, S. S., D. L. Kooyman, et al. (1997). "The role of natural anti-Gal alpha 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants." *Transpl Immunol* **5**(3): 212-8.

- Lin, S. S., B. C. Weidner, et al. (1998). "The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants." *J Clin Invest* **101**(8): 1745-56.
- Loss, M., B. Vangerow, et al. (2000). "Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model." *Xenotransplantation* **7**(3): 186-96.
- Lu, D., M. Kalafatis, et al. (1996). "Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V." *Blood* **87**(11): 4708-17.
- Manez, R., F. Crespo, et al. (2000). "Neutralization of anti-alphaGalactosyl antibodies without immunosuppression prevents hyperacute rejection but not acute vascular rejection of pig organs transplanted into baboons." *Transplant Proc* **32**(5): 888-9.
- Mann, K. G., M. F. Hockin, et al. (1997). "Activated protein C cleavage of factor Va leads to dissociation of the A2 domain." *J Biol Chem* **272**(33): 20678-83.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, et al. (2003). "CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments." *Nucleic Acids Res* **31**(1): 383-7.
- Maruyama, H., K. Oguma, et al. (2004). "Molecular cloning of canine thrombomodulin cDNA and expression in normal tissues." *J Vet Med Sci* **66**(11): 1423-7.
- Mazzucato, M., L. De Marco, et al. (1996). "Porcine von Willebrand factor binding to human platelet GPIb induces transmembrane calcium influx." *Thromb Haemost* **75**(4): 655-60.
- McCurry, K. R., D. L. Kooyman, et al. (1995). "Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury." *Nat Med* **1**(5): 423-7.
- Minanov, O. P., S. Itescu, et al. (1997). "Anti-GaL IgG antibodies in sera of newborn humans and baboons and its significance in pig xenotransplantation." *Transplantation* **63**(2): 182-6.
- Mohri, M., Y. Gonda, et al. (1997). "The antithrombotic effects of recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM) on tissue factor-induced disseminated intravascular coagulation in crab-eating monkeys (*Macaca fascicularis*)." *Blood Coagul Fibrinolysis* **8**(5): 274-83.
- Moore, K. L., S. P. Andreoli, et al. (1987). "Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro." *J Clin Invest* **79**(1): 124-30.
- Murphy, T. L., F. J. Walker, et al. (1980). "Endogenous anticoagulation during extracorporeal perfusion: generation of a heparinlike inhibitor." *Am J Physiol* **239**(6): H742-50.
- Nagashima, M., E. Lundh, et al. (1993). "Alanine-scanning mutagenesis of the epidermal growth factor-like domains of human thrombomodulin identifies critical residues for its cofactor activity." *J Biol Chem* **268**(4): 2888-92.
- Nandurkar H, Z. M., Dezfouli S, Crikis S, Dwyer K, Murray-Segal L, Cowan P, d'Apice (2007). "Mice transgenic for thrombomodulin exhibit protection from venous thrombosis." *J Thromb Haemost* **5**(Supplement 2): P-W-453.
- Nawroth, P. P., D. A. Handley, et al. (1986). "Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3460-4.
- Nawroth, P. P. and D. M. Stern (1986). "Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor." *J Exp Med* **163**(3): 740-5.
- Nesheim, M., W. Wang, et al. (1997). "Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis." *Thromb Haemost* **78**(1): 386-91.
- Nottle, M. B., L. F. Beebe, et al. (2007). "Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer." *Xenotransplantation* **14**(4): 339-44.
- Nottle, M. B., A. J. D'Apice, et al. (2002). "Transgenic perspectives in xenotransplantation, 2001." *Xenotransplantation* **9**(5): 305-8.
- Ohlin, A. K. and R. A. Marlar (1995). "The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease." *Blood* **85**(2): 330-6.
- Oriol, R., J. J. Candelier, et al. (1996). "Major oligosaccharide epitopes found in tissues of 23 animal species, potential donors for organ xenotransplantation." *Transplant Proc* **28**(2): 794.
- Paradis, K., G. Langford, et al. (1999). "Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group." *Science* **285**(5431): 1236-41.

- Pareti, F. I., M. Mazzucato, et al. (1992). "Interaction of porcine von Willebrand factor with the platelet glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex." *Br J Haematol* **82**(1): 81-6.
- Parker, W., D. Bruno, et al. (1994). "Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies." *J Immunol* **153**(8): 3791-803.
- Parkinson, J. F., C. J. Vlahos, et al. (1992). "Recombinant human thrombomodulin. Regulation of cofactor activity and anticoagulant function by a glycosaminoglycan side chain." *Biochem J* **283** (Pt 1): 151-7.
- Pirat, B., H. Muderrisoglu, et al. (2007). "Recombinant human-activated protein C inhibits cardiomyocyte apoptosis in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion." *Coron Artery Dis* **18**(1): 61-6.
- Powars, D. R., Z. R. Rogers, et al. (1987). "Purpura fulminans in meningococemia: association with acquired deficiencies of proteins C and S." *N Engl J Med* **317**(9): 571-2.
- Preissner, K. T., U. Delves, et al. (1987). "Binding of thrombin to thrombomodulin accelerates inhibition of the enzyme by antithrombin III. Evidence for a heparin-independent mechanism." *Biochemistry* **26**(9): 2521-8.
- Ramackers, W., L. Friedrich, et al. (2008). "Effects of pharmacological intervention on coagulopathy and organ function in xenoperfused kidneys." *Xenotransplantation* **15**(1): 46-55.
- Ramirez, P., R. Chavez, et al. (2000). "Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days." *Transplantation* **70**(7): 989-98.
- Regan, L. M., B. J. Lamphear, et al. (1994). "Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. Factor IXa inhibits activated protein C-catalyzed cleavage of factor VIIIa at Arg562." *J Biol Chem* **269**(13): 9445-52.
- Regan, L. M., D. J. Stearns-Kurosawa, et al. (1996). "The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors." *J Biol Chem* **271**(29): 17499-503.
- Reitsma, P. H., S. R. Poort, et al. (1993). "Protein C deficiency: a database of mutations. For the Protein C & S Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* **69**(1): 77-84.
- Rezaie, A. R., S. T. Cooper, et al. (1995). "Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex." *J Biol Chem* **270**(43): 25336-9.
- Riewald, M., R. J. Petrovan, et al. (2002). "Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway." *Science* **296**(5574): 1880-2.
- Rintala, E., O. Seppala, et al. (1996). "Protein C in the treatment of coagulopathy in meningococcal disease." *Lancet* **347**(9017): 1767.
- Rosing, J., L. Hoekema, et al. (1995). "Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C." *J Biol Chem* **270**(46): 27852-8.
- Rothbarth, K., C. Petzelt, et al. (1993). "cDNA-derived molecular characteristics and antibodies to a new centrosome-associated and G2/M phase-prevalent protein." *J Cell Sci* **104** (Pt 1): 19-30.
- Roussel, J. C., O. Baron, et al. (2008). "Outcome of heart transplants 15 to 20 years ago: graft survival, post-transplant morbidity, and risk factors for mortality." *J Heart Lung Transplant* **27**(5): 486-93.
- Roussel, J. C., T. Senage, et al. (2009). "CardioWest (Jarvik) total artificial heart: a single-center experience with 42 patients." *Ann Thorac Surg* **87**(1): 124-9; discussion 130.
- Saadi, S. and J. L. Platt (1995). "Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement." *J Exp Med* **181**(1): 21-31.
- Seligsohn, U., A. Berger, et al. (1984). "Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn." *N Engl J Med* **310**(9): 559-62.
- Shen, L. and B. Dahlback (1994). "Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa." *J Biol Chem* **269**(29): 18735-8.
- Shimizu, A., Y. Hisashi, et al. (2008). "Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons." *Am J Pathol* **172**(6): 1471-81.

- Shiraishi, M., T. Oshiro, et al. (2001). "Improved hepatic microcirculation by human soluble urinary thrombomodulin in the xeno-perfused porcine liver." *Transplantation* **71**(8): 1046-50.
- Siegel, J. B., S. T. Grey, et al. (1997). "Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin." *Transplantation* **64**(6): 888-96.
- Smirnov, M. D., O. Safa, et al. (1998). "A chimeric protein C containing the prothrombin Gla domain exhibits increased anticoagulant activity and altered phospholipid specificity." *J Biol Chem* **273**(15): 9031-40.
- Smith, O. P., B. White, et al. (1997). "Use of protein-C concentrate, heparin, and haemodiafiltration in meningococcus-induced purpura fulminans." *Lancet* **350**(9091): 1590-3.
- Sollinger, H. W. (2004). "Mycophenolates in transplantation." *Clin Transplant* **18**(5): 485-92.
- Stearns-Kurosawa, D. J., S. Kurosawa, et al. (1996). "The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19): 10212-6.
- Stenflo, J. (1976). "A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization." *J Biol Chem* **251**(2): 355-63.
- Sturn, D. H., N. C. Kaneider, et al. (2003). "Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils." *Blood* **102**(4): 1499-505.
- Suzuki, K., T. Hayashi, et al. (1989). "A domain composed of epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin is essential for thrombin binding and for protein C activation." *J Biol Chem* **264**(9): 4872-6.
- Suzuki, K., H. Kusumoto, et al. (1987). "Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation." *Embo J* **6**(7): 1891-7.
- Takano, S., S. Kimura, et al. (1990). "Plasma thrombomodulin in health and diseases." *Blood* **76**(10): 2024-9.
- Taoka, Y., K. Okajima, et al. (1998). "Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes." *J Neurosci* **18**(4): 1393-8.
- Taylor, F., A. Chang, et al. (1991). "C4b-binding protein exacerbates the host response to Escherichia coli." *Blood* **78**(2): 357-63.
- Taylor, F. B., Jr., A. Chang, et al. (1987). "Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon." *J Clin Invest* **79**(3): 918-25.
- Taylor, F. B., Jr., A. Chang, et al. (1984). "A model for thrombin protection against endotoxin." *Thromb Res* **36**(2): 177-85.
- Taylor, F. B., Jr. and M. S. Lockhart (1985). "A new function for activated protein C: activated protein C prevents inhibition of plasminogen activators by releasate from mononuclear leukocytes--platelet suspensions stimulated by phorbol diester." *Thromb Res* **37**(1): 155-64.
- Taylor, F. B., Jr. and M. S. Lockhart (1985). "Whole blood clot lysis: in vitro modulation by activated protein C." *Thromb Res* **37**(6): 639-49.
- Taylor, F. B., Jr., G. T. Peer, et al. (2001). "Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo." *Blood* **97**(6): 1685-8.
- Teke, Z., M. Sacar, et al. (2008). "Activated protein C attenuates intestinal mucosal injury after mesenteric ischemia/reperfusion." *J Surg Res* **149**(2): 219-30.
- Tolkatchev, D. and F. Ni (1998). "Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain from human thrombomodulin." *Biochemistry* **37**(25): 9091-100.
- Uchiba, M., K. Okajima, et al. (1995). "Recombinant human soluble thrombomodulin reduces endotoxin-induced pulmonary vascular injury via protein C activation in rats." *Thromb Haemost* **74**(5): 1265-70.
- Valentin, J. F., Y. Lebranchu, et al. (1999). "[Can man live with a pig kidney?]." *Nephrologie* **20**(4): 189-92.
- Walker, F. J. (1980). "Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S." *J Biol Chem* **255**(12): 5521-4.
- Wang, J., A. Yao, et al. (1999). "cDNA cloning and sequencing, gene expression, and immunolocalization of thrombomodulin in the Sprague-Dawley rat." *DNA Res* **6**(1): 57-62.

- Wang, W., M. Nagashima, et al. (2000). "Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombin-activable fibrinolysis inhibitor activation." *J Biol Chem* **275**(30): 22942-7.
- Waterworth, P. D., E. Cozzi, et al. (1997). "Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy." *Transplant Proc* **29**(1-2): 899-900.
- Waugh, J. M., J. Li-Hawkins, et al. (2000). "Thrombomodulin overexpression to limit neointima formation." *Circulation* **102**(3): 332-7.
- Weiler-Guettler, H., P. D. Christie, et al. (1998). "A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state." *J Clin Invest* **101**(9): 1983-91.
- Weisel, J. W., C. Nagaswami, et al. (1996). "The shape of thrombomodulin and interactions with thrombin as determined by electron microscopy." *J Biol Chem* **271**(49): 31485-90.
- Wen, D. Z., W. A. Dittman, et al. (1987). "Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene." *Biochemistry* **26**(14): 4350-7.
- Wood, M. J., B. A. Sampoli Benitez, et al. (2000). "Solution structure of the smallest cofactor-active fragment of thrombomodulin." *Nat Struct Biol* **7**(3): 200-4.
- Yamada, K., K. Yazawa, et al. (2005). "Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue." *Nat Med* **11**(1): 32-4.
- Ye, J., N. L. Esmon, et al. (1991). "The active site of thrombin is altered upon binding to thrombomodulin. Two distinct structural changes are detected by fluorescence, but only one correlates with protein C activation." *J Biol Chem* **266**(34): 23016-21.
- Ye, J., L. W. Liu, et al. (1992). "The fifth and sixth growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity." *J Biol Chem* **267**(16): 11023-8.
- Yegneswaran, S., G. M. Wood, et al. (1997). "Protein S alters the active site location of activated protein C above the membrane surface. A fluorescence resonance energy transfer study of topography." *J Biol Chem* **272**(40): 25013-21.
- Yesilirmak, D. C., A. Kumral, et al. (2008). "Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury." *Brain Res* **1210**: 56-62.
- Ysebaert, D. K., K. E. De Greef, et al. (2003). "Effect of immunosuppression on damage, leukocyte infiltration, and regeneration after severe warm ischemia/reperfusion renal injury." *Kidney Int* **64**(3): 864-73.
- Zaidi, A., M. Schmoekel, et al. (1998). "Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors." *Transplantation* **65**(12): 1584-90.
- Zhang, Y., H. Weiler-Guettler, et al. (1998). "Thrombomodulin modulates growth of tumor cells independent of its anticoagulant activity." *J Clin Invest* **101**(7): 1301-9.
- Zushi, M., K. Gomi, et al. (1991). "Aspartic acid 349 in the fourth epidermal growth factor-like structure of human thrombomodulin plays a role in its Ca(2+)-mediated binding to protein C." *J Biol Chem* **266**(30): 19886-9.
- Zushi, M., K. Gomi, et al. (1989). "The last three consecutive epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin comprise the minimum functional domain for protein C-activating cofactor activity and anticoagulant activity." *J Biol Chem* **264**(18): 10351-3.

RESUME

La xénotransplantation d'organes vascularisés entre espèces discordantes telle que porc sur primate est soumise à une suite de réactions immunologiques majeures aboutissant immédiatement à un rejet hyperaigu (RHA) ou plus tardivement à un rejet vasculaire aigu (RVA) lorsque des animaux donneurs transgéniques pour des molécules régulatrices du complément humain sont utilisés.

Nous avons au cours de cette thèse, démontré que le RVA était également soumis à une activation du complément par des xénoanticorps naturels et que les lésions histologiques majeures thrombotiques qui le caractérisent pouvaient être accentuées par une incompatibilité moléculaire d'espèce touchant les mécanismes régulateurs de l'hémostase, notamment au niveau de la voie de la protéine C. Nous avons démontré que la thrombomoduline porcine, bien que capable de fixer la thrombine humaine, était un très faible cofacteur d'activation de la protéine C et de TAFI, un inhibiteur de la fibrinolyse. Cette barrière moléculaire peut en partie être surmontée *in vitro* en surexprimant l'EPCR (Endothelial protein C receptor) qui est un puissant stimulant de cette voie d'activation. Cette hypothèse a été testée *in vivo* par la génération d'une souris transgénique pour la molécule humaine de l'EPCR. Cette souris transgénique pour l'EPCR humaine présente également des propriétés anti-inflammatoires et anticoagulantes protectrices dans des modèles d'ischémie-reperfusion rénale et de maladie thromboembolique induite. Nous avons enfin montré que la voie d'inhibition du facteur tissulaire était par contre fonctionnelle dans une combinaison porc-primate.

Transplantation of vascularized organs between discordant species such as pig and primate is hampered by a series of immunological responses leading rapidly to hyperacute rejection or later to acute vascular rejection (AVR) if transgenic organs for human complement regulatory molecules are used.

We have demonstrated that complement activation by natural xenoantibodies was also involved in the pathogenesis of AVR and molecular incompatibilities in the coagulation cascade, especially in the protein C pathway, may contribute to the rejection associated microvascular thrombosis. We have shown that pig thrombomodulin can bind thrombin and inhibit its procoagulant activity but is a poor cofactor for the activation of human protein C and TAFI. This molecular incompatibility can be *in vitro* partially resolved by over-expressing EPCR, which is an enhancer of the protein C activation. To confirm *in vivo* this hypothesis, we generated a transgenic mice for human EPCR. We also found that transgenic overexpression of human EPCR confers protection against inflammation and coagulation. Finally, we study the efficiency of pig TFPI to regulate human tissue factor pathway and we found that there are no apparent incompatibilities between pig TFPI and the human tissue factor pathway.