

COMMUNICATION

Les rétrovirus endogènes porcins (PERV) : inactivation des gènes viraux par CRISPR-Cas9 et perspectives en xénogreffes

MOTS-CLÉS : RÉTROVIRUS ENDOGÈNES. GAMMARETROVIRUS. PARVOVIRUS PORCIN. PROTÉINES ASSOCIÉES AUX CRISPR. TESTS D'ACTIVITÉ ANTITUMORALE SUR MODÈLE DE XÉNOGREFFE

The porcine endogenous retroviruses (PERV): gene inactivation by CRISPR-Cas9 and perspectives in xenotransplantation

KEY-WORDS: ENDOGENOUS RETROVIRUSES. GAMMARETROVIRUS. PARVOVIRUS, PORCINE. CRISPR-ASSOCIATED PROTEINS. XENOGRAFT MODEL ANTITUMOR ASSAYS

André JESTIN *, Antonin DEMANGE *, Yannick BLANCHARD *

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

La présence dans le génome du porc de rétrovirus endogènes porcins, potentiellement transmissibles à l'homme, est l'un des obstacles au développement de techniques visant à utiliser des organes de porcs pour les greffer chez l'homme. Les rétrovirus endogènes porcins (PERV) appartiennent au genre gamma-rétrovirus et comprennent trois sous-types : PERV-A, -B et -C. Les virus PERV-A et -B infectent les cellules humaines in vitro. La technique d'ingénierie génétique CRISPR-Cas9 a récemment permis l'inactivation de gènes essentiels à la sortie des virus des cellules épithéliales de rein de porc in vitro et à la production de porcelets sans virus PERV infectieux. L'application de cette nouvelle technologie relance l'intérêt pour les xénogreffes d'organes de porc, et offre de nouvelles perspectives en recherche biomédicale.

* Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation Environnement Travail (Anses), 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort Cedex ; e-mail : andre.jestin@anses.fr

Tirés-à-part : André JESTIN, même adresse.

Article reçu le 24 novembre 2017, accepté le 8 janvier 2018

SUMMARY

Since swine are a potential source of organs for xenotransplantation, the risk of porcine endogenous retrovirus transmission to human is a major concern. Porcine endogenous retroviruses (PERV) are members of the genus gamma-retrovirus and include three subtypes: PERV-A, -B and -C. PERV-A and -B have been shown to infect human cells in vitro. The new genome-editing CRISPR-Cas9 tool has been successfully used to disrupt a set of genomic copies of porcine endogenous retrovirus in cultured pig kidney epithelial cells and to produce PERV free piglets. The application of this new technology has revived interest in xenotransplantation, offering new perspectives for the pig model in biomedical research.

INTRODUCTION

La disponibilité d'organes ou de tissus pour les allogreffes chez l'homme reste déficitaire par rapport à la demande : c'est notamment le cas pour les greffes de reins, d'ilots pancréatiques et de poumons [1]. La xénotransplantation représente une alternative prometteuse. Les organes du porc sont considérés comme des sources potentielles pour la xénotransplantation car ils sont similaires aux organes humains en taille et en fonction. De plus les porcs peuvent être génétiquement modifiés et élevés en grand nombre [2]. L'identification de rétrovirus endogènes porcins (PERV) dans le génome des porcs donneurs d'organes et l'absence de protocoles efficaces contre les réactions de rejet ont représenté des obstacles sanitaires et immunologiques majeurs au développement des xéno-greffes [3]. Les résultats de l'analyse du génome du porc ont été publiés à la fin de l'année 2012 [4]. Il a été observé qu'il était composé d'environ 4,5 % de séquences rétrovirales [4]. Le présent article se propose de faire une revue des connaissances acquises sur les propriétés de ces PERV et, à la lumière des dernières avancées technologiques relatives à la manipulation des génomes, de préciser de nouvelles perspectives en matière de xéno-greffes. La maîtrise d'une nouvelle technologie permettant d'introduire des modifications ciblées dans le génome des cellules de mammifères et particulièrement celles de porcs contribue à relancer l'intérêt pour les tissus porcins répondant à des critères de biosécurité virale à des fins de greffes chez l'homme.

LES RÉTROVIRUS ENDOGÈNES PORCINS

Les PERV-A, -B et -C endogènes

Les gamma-rétrovirus sont des agents exogènes (infectieux) ou endogènes ayant une large distribution chez les mammifères. Chez le porc trois classes de PERV A, B et C, définies selon la séquence du gène *env* (Figure 1), appartiennent au groupe γ -1 du genre gamma-rétrovirus [4-6]. Ces PERV sont proches des virus des leucémies murines (MLV). Les études réalisées chez les *Suidae* estiment que l'intégration des PERV est survenue il y a entre 3,5 et 7,5 millions d'années pour les sous-groupes A

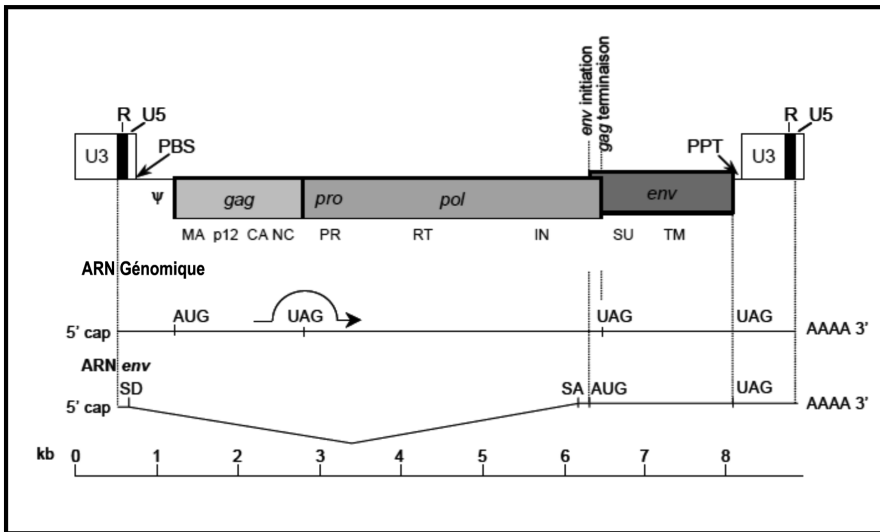


FIG. 1. — Organisation génomique d'un provirus PERV

La transcription du provirus donne un ARNm génomique qui va servir de support pour la synthèse des polyprotéines Gag (ou GagPol par suppression du codon stop entre les 2 ORF). Ces polyprotéines subissent une maturation par clivage protéolytique. L'ORF *env* est en dehors du cadre de lecture des ORF *gag* et *pol* et sa traduction se fait à partir d'un ARN messager délété par épissage (SD site donneur, SA site accepteur). MA : protéine de matrice, CA : protéine de capsid, PR : protéase, RT : transcriptase réverse, IN : intégrase, SU : glycoprotéine de surface, TM : protéine transmembranaire.

et B et entre 1,5 et 3,5 millions d'années pour le sous-groupe C [7]. L'analyse de différentes lignées de porcs domestiques et de lignées cellulaires (Pig kidney cells ou PK15) évaluait à 30 à 50 le nombre de copies de provirus, toutes défectives, réparties dans le génome porcin,. Le séquençage du génome du porc a identifié 20 loci PERV complets dont aucun ne présente simultanément les trois phases de lecture (*Open Reading Frame*, ORF) *gag*, *pol* et *env* intacts (Fig. 1). Individuellement aucune de ces séquences PERV ne peut donc générer de particules infectieuses [4, 8]. Le nombre de copies de PERV-A est en général plus élevé que celui de PERV-B, tandis que le PERV-C est présent en quantité moindre et peut même être absent dans certains troupeaux [9-11]. Le nombre de copies de PERV varie d'un porc à l'autre au sein d'un même élevage [12].

Activité transcriptionnelle des PERV

Les PERV sont dotés d'une activité transcriptionnelle dans les tissus du porc avec des niveaux d'expression plus élevés dans certains tissus tels que les poumons. Les différences de niveau d'expression observées entre les tissus dépendent de la présence et de l'abondance de facteur de transcription cellulaire, de l'intégrité des LTR

et notamment du nombre des répétitions des sites de liaison de facteur de transcription dans la région U3 [13]. Les niveaux de transcription des séquences PERV dépendent toutefois des méthodes utilisées, des porcs étudiés et de leur état de santé [14]. Bosch et Col ont montré que plus de la moitié des transcrits présentaient des délétions dans le gène de l'enveloppe [9].

Les PERV répliatifs

Il a été démontré dès 1997 que des rétrovirus répliatifs étaient produits spontanément par deux lignées cellulaires porcines (Pig kidney cells ou PK15 et Porcine aortic endothelial cells ou PAE) et qu'ils étaient capables de se répliquer dans des cellules humaines [10]. Dès 2002, un rétrovirus répliatif a été isolé de cellules humaines (Lignée HEK293) à partir des cellules mononuclées du sang périphérique d'un porc miniature. L'existence de recombinaisons entre PERV a été suspectée pour expliquer la production de ces rétrovirus répliatifs par des cellules porcines dont le génome ne comprend que des PERV défectifs. Ces recombinaisons entre les PERV ont été caractérisées et les propriétés des recombinants analysées [15]. Des recombinaisons sont observées entre les PERV-A et B qui présentent 70 % d'identité [16] et plus fréquemment entre les PERV-A et C qui présentent 85 % d'identité [7]. Le recombinant PERV-A/C est observé *in vitro* dans les cellules de rein (PK15) et dans divers organes de porc à l'exception des cellules des lignées germinales [17].

Interaction avec leurs hôtes

Les PERV sont proches de gamma-rétrovirus exogènes tels que le virus GALV (gibbon-ape leukemia virus), le virus de la leucémie féline (FeLV) ou le virus de la leucémie murine (MLV) qui peuvent induire des leucémies ou des lymphomes chez leurs hôtes respectifs. Chez le porc en revanche, l'implication des PERV répliatifs dans de telles pathologies n'a jamais été démontrée, bien que l'activité transcriptionnelle des gènes PERV soit augmentée dans certains cas de lymphomes, de mélanomes ou de leucémies induites par irradiations [18-21]. Il a été mis en évidence que les PERV s'intègrent, comme le MLV, préférentiellement au niveau des promoteurs des gènes transcrits [22, 23].

Franchissement de la barrière inter-espèce du porc à l'homme

L'étude de l'évolution des rétrovirus endogènes chez les mammifères a fait apparaître l'existence de transmissions entre espèces différentes [26]. En ce qui concerne le PERV, la question centrale est de savoir si le passage du porc à l'homme est possible et dans quelles conditions.

Répliation des PERV dans les cellules humaines en culture

La répliation d'un virus dans un type cellulaire donné nécessite d'une part l'entrée du virus dans la cellule et d'autre part un cycle répliatif efficace assurant sa

multiplication. Les PERV réplicatifs A et B sont polytropes, en effet leur enveloppe reconnaît des récepteurs présents sur de nombreuses cellules de mammifères. Chez l'homme, deux récepteurs du PERV-A ont été identifiés [24]. Ces récepteurs permettent l'infection spécifique par le PERV-A et ses recombinants, tel que le PERV-A/C. Bien que le PERV se réplique faiblement *in vitro* sur des cellules humaines [25], son passage répété dans ces cellules conduit à une adaptation du virus à ce nouvel environnement ce qui se traduit par un temps d'infection plus court et l'obtention de titres infectieux plus élevés. Afin d'évaluer les effets à long terme d'une infection par les PERV, des cellules humaines infectées par un mélange de PERV-A et de PERV-B ont été maintenues en culture durant 72 repiquages. Cela a permis de mettre en évidence un faible taux de mutations dans le génome proviral et une tendance à la recombinaison entre le PERV-A et le PERV-B. Mais aucun cas de recombinaison n'a été observé entre les PERV et des rétrovirus endogènes humains (HERV) [26]. Il apparaît donc que, *in vitro*, les PERV peuvent infecter des cellules humaines et que leur potentiel infectieux augmente avec le temps. Le risque de transmission du virus à l'homme dans le cas de xéno greffe est donc tout à fait fondé.

Transmission du PERV à l'homme

Les travaux ont d'abord porté sur l'étude du pouvoir infectieux du PERV chez des primates non humains. Une étude de 2009 a porté sur la recherche d'une réplication du PERV chez trois singes rhésus, deux macaques « pig-tailed » et deux babouins, ces trois espèces de singes ayant été sélectionnées parce qu'il avait été démontré que le PERV se répliquait dans les cellules dérivées de ces singes [27]. Après administration de fortes doses d'immunosuppresseurs, les sept singes ont reçu de façon répétée, par voie intramusculaire, du virus PERV à dose élevée. La production d'anticorps spécifiques du PERV n'a pas été observée, et il n'a pas été détecté de traces d'ADN proviral intégré dans le génome des cellules sanguines. De plus aucune séquence de PERV n'a été détectée dans les organes de ces singes après euthanasie réalisée 11 mois après les administrations. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une absence de réplication du PERV chez les primates non humains [27]. Ces travaux n'ont pas abouti à la mise au point d'un modèle animal d'infection *in vivo* par le PERV [28].

En l'absence de maîtrise de modèles animaux, les études ont porté sur le suivi de patients ayant reçu des tissus de porc. Khazal Paradis a publié dès 1999 les résultats d'une étude portant sur des échantillons collectés chez 160 patients ayant bénéficié de perfusions extracorporelles (rate, foie, rein) ou de greffes (peau, îlots pancréatiques) utilisant du matériel biologique d'origine porcine [29]. L'ADN PERV n'a pas été retrouvé dans leurs cellules sanguines et aucun anticorps spécifiques n'a été détecté chez 137 patients. En 2000, l'étude d'une cohorte de 24 patients ayant reçu des cellules neuronales de fœtus de porcs n'a pas montré la présence de l'ADN proviral du porc dans leurs cellules sanguines [30]. Aucune transmission de PERV n'a été mise en évidence après un essai de greffe d'îlots pancréatiques de porc en

capsule d'alginate, réalisé en 2014 sur 14 patients en Nouvelle-Zélande. [31]. Une étude équivalente conduite plus récemment en Argentine sur 8 patients confirme l'innocuité de ce type de greffe [32]. Toutefois, l'Association Internationale de Xéno-transplantation a précisé dans sa déclaration de consensus de 2009 sur les protocoles d'essais cliniques de greffes d'ilots pancréatiques [28] que bien que la transmission du PERV du porc à l'homme n'ait pu être démontrée, ces résultats doivent être considérés dans un contexte où le nombre de patients exposés à des produits potentiellement infectieux était relativement faible et que les durées d'exposition étaient brèves comparées à celles des possibles expositions de patients à des produits de xéno-transplantation. Les auteurs rappellent que les essais de greffes chez l'homme ont été effectués soit sans l'administration d'immunosuppresseurs soit avec une administration à faibles doses. Ce *guideline* tout en concluant à l'absence de preuve de transmission du PERV du porc à l'homme, n'exclut pas l'existence d'un risque potentiel de transmission dans des conditions particulières. Cette question demeure ainsi une des préoccupations des autorités sanitaires même si le risque rétroviral n'est plus perçu comme majeur, comme cela a pu être le cas en 1999 conduisant le Conseil de l'Europe à émettre un moratoire proscrivant les xéno-greffes pour des impératifs de sécurité sanitaire.

ÉLIMINATION DES PERV DU GÉNOME PORCIN

Le système CRISPR-Cas9

Le système « *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and Associated Nuclease Cas9* », ou CRISPR-Cas9 est dérivé d'un mécanisme d'immunité adaptative héréditaire contre les phages, les plasmides et autres éléments génétiques mobiles décrits chez les procaryotes. Un ARN guide (*small guide RNA, sgRNA*) est introduit pour permettre le ciblage du complexe CRISPR-Cas9 vers une séquence génétique d'intérêt (Figure 2) [33, 34]. Il est essentiel que l'introduction de cet ARN guide soit effectuée simultanément à l'introduction du gène de la protéine Cas9. Dans cette stratégie, l'endonuclease Cas9 guidée par l'ARN guide vers la séquence d'intérêt, coupe le double brin d'ADN (*Double Strand Break, DSB*) activant le système de réparation de l'ADN de la cellule. Les mécanismes de réparation des extrémités d'ADN (Non Homologous End Joining, NHEJ) permettent l'inactivation des gènes ciblés [35].

Délétions des séquences PERV du génome des cellules porcines

Dans le cas du PERV, deux ARN guides (sgRNAs 1 et 2) ont été définis afin de cibler le site catalytique de la protéine Pol. Ces séquences ont été optimisées pour permettre le ciblage spécifique d'un nombre maximum de copies de gènes *pol*. Un total de 62 copies de gène *pol* par cellule a été dénombré. Par la technique CRISPR-Cas9, les sites catalytiques de ces 62 copies de gène *pol* ont été délétés au sein du génome des cellules épithéliales de rein de porc (lignée PK15). Dans les faits, ces objectifs n'ont

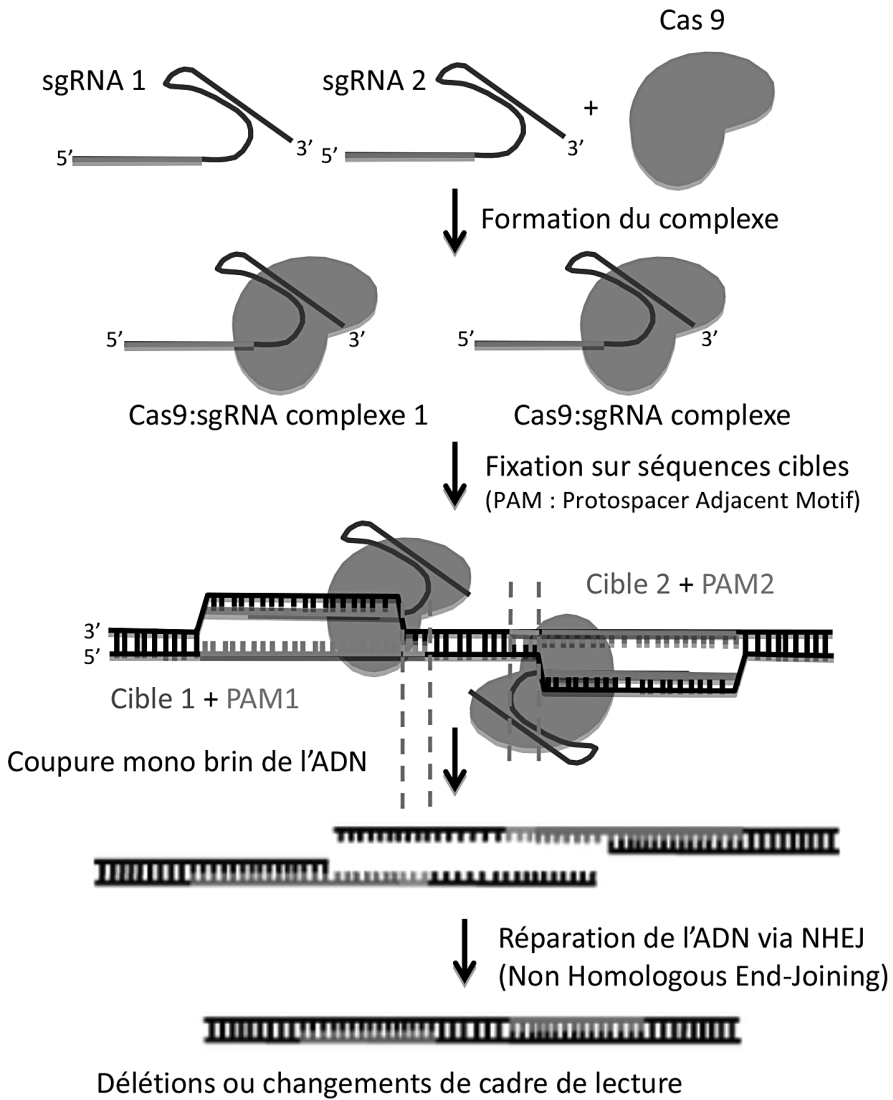


FIG. 2. — Schéma du mode d'action du système CRISPR-Cas9

La molécule d'ARN guide (sgRNA) est composée de deux séquences de nucléotides qui sont complémentaires de la séquence d'ADN à découper. Le sgRNA active l'endonucléase Cas9 qui clive l'ADN de façon spécifique en amont d'une séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif) localisée sur l'ADN génomique (D'après Jinek *et al.* 2012 [33]).

pu être atteints qu'au prix de mises au point de protocoles complexes faisant appel à des systèmes de vectorisation (lentivirus, piggyBac) [36], avec production inductible de Cas9 et des deux sgRNAs. Différents clones cellulaires ont été sélectionnés et leur génome séquencé. Aucun réarrangement chromosomique n'a été signalé. Par co-culture des clones PK15 mutés et de cellules rénales d'embryon humains (HEK293), la transmission de génomes de PERV a été réduite de 3 logs. Ces résultats représentent une vraie avancée dans les techniques de modification des génomes porcins appliquées à la délétion des PERV [37]. De plus le séquençage complet des génomes des cellules porcines montre que l'action de CRISPR-Cas9 ne générerait pas de mutations hors cible, confirmant la spécificité de la méthode [37].

Production de porcelets sans PERV

Ces mêmes auteurs ont appliqué des protocoles identiques à la modification du génome de cellules fibroblastiques de fœtus de porc [38]. Les 25 séquences les plus conservées de PERV identifiées dans le génome de ces cellules ont été mutées au niveau du gène *pol* par l'application du même protocole CRISPR-Cas9. Trois clones cellulaires ont été produits et par séquençage il a été montré que les délétions étaient bien présentes au niveau de la séquence de tous les gènes *pol*. Le protocole de transfert nucléaire de cellules somatiques (SCNT) a été appliqué pour transférer le noyau des cellules portant les délétions dans des oocytes matures énucléés [39]. Les blastocystes au stade 64 cellules ont ensuite été implantés dans des truies receveuses. Ces truies ont donné naissance à 15 porcelets qui, à la date de publication relatant ces résultats, avaient atteints l'âge de 4 mois [38]. Les recherches de PERV effectuées sur les tissus des fœtus et des jeunes porcelets se sont révélées négatives, confirmant la maîtrise du protocole de production de porcelets sans virus PERV. Les génomes de porcelets n'ont cependant pas été séquencés en totalité, il n'est donc pas possible d'exclure l'existence de modifications hors cibles, même si les auteurs précisent qu'aucune modification des caryotypes n'a été identifiée. En effet, des mutations hors cibles ont été retrouvées dans des génomes édités par l'action de CRISPR-Cas9 [40]. Afin d'éviter toute modification hors-cibles de l'action de CRISPR-Cas9, des travaux sont en cours afin d'améliorer la spécificité des guides (sgRNA) ainsi que la fidélité de l'enzyme Cas9 [40]. Les protocoles de transgénése chez le porc étaient basés par ailleurs sur la manipulation des cellules primaires porcines et le clonage par transfert nucléaire [37]. Récemment les techniques de micro-injection de systèmes CRISPR-Cas9 dans les zygotes ont été appliquées avec succès à l'édition du génome de porc [41].

Si des recherches ont été menées avec succès ces dernières années dans la maîtrise du volet sanitaire, de nombreux obstacles restent encore à franchir dans le domaine de la modulation de la réponse immunitaire du receveur contre le greffon. Les techniques de transgénése ont abouti à la production de porcs portant des délétions dans les gènes codant pour différentes molécules intervenant dans la réponse immunitaire [42-46], prolongeant les périodes de survie des organes de porc (cœurs, reins) greffés chez des primates non humains sous traitements immunosuppresseurs. Ainsi, les

techniques très efficaces d'édition des génomes de porc augurent de rapides progrès en xénotransplantation [3, 47, 48].

CONCLUSION

De grands progrès ont été réalisés dans la connaissance des génomes des PERV et dans les stratégies d'élimination de ces séquences du génome du porc. Les systèmes CRISPR-Cas9, de par leur capacité à cibler des séquences spécifiques et à les modifier, permettent de modifier le génome des mammifères et en particulier celui des porcs. Les progrès les plus significatifs ont porté sur la production de porcelets dont les séquences PERV ont été inactivées et ne permettent plus l'émergence d'éléments infectieux indésirables. Les travaux de recherche sur la modification de la réponse immunitaire et des mécanismes de rejet se poursuivent. La maîtrise des nouvelles technologies de modification des génomes va contribuer au regain d'intérêt pour les xénotreffes. Il est prévisible que les porcs génétiquement modifiés seront à l'avenir utilisés en recherche biomédicale, le modèle porcin présentant de nombreuses homologues avec l'homme en matière de physiologie, de métabolisme, d'organisation du génome, de pathologies et des phénomènes de vieillissement.

RÉFÉRENCES

- [1] Shafran D, Kodish E, Tzakis A. Organ shortage: the greatest challenge facing transplant medicine. *World J Surg.* 2014;38:1650-7.
- [2] Deschamps JY, Roux FA, Sai P, Gouin E. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2005;12:91-109.
- [3] Denner J. Recent Progress in Xenotransplantation, with Emphasis on Virological Safety. *Ann Transplant.* 2016;21:717-27.
- [4] Groenen MA, Archibald AL, Uenishi H, Tuggle CK, Takeuchi Y, Rothschild MF, et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature.* 2012;491:393-8.
- [5] Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, Griffiths DJ, Goward ME, Heneine W, et al. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol.* 2001;75:2771-5.
- [6] Takeuchi Y, Patience C, Magre S, Weiss RA, Banerjee PT, Le Tissier P, et al. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol.* 1998;72:9986-91.
- [7] Niebert M, Tonjes RR. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in the suiformes. *J Virol.* 2005;79:649-54.
- [8] Niebert M, Rogel-Gaillard C, Chardon P, Tonjes RR. Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J Virol.* 2002;76:2714-20.
- [9] Bosch S, Arnauld C, Jestin A. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J Virol.* 2000;74:8575-81.

- [10] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med.* 1997;3:282-6.
- [11] Le Tissier P, Stoye JP, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature.* 1997;389:681-2.
- [12] Herring C, Quinn G, Bower R, Parsons N, Logan NA, Brawley A, et al. Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig. *J Virol.* 2001;75:12252-65.
- [13] Bittmann I, Mihica D, Plesker R, Denner J. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERV) in different organs of a pig. *Virology.* 2012;433:329-36.
- [14] Pal N, Baker R, Schalk S, Scobie L, Tucker AW, Opriessnig T. Detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) viremia in diseased versus healthy US pigs by qualitative and quantitative real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58:344-51.
- [15] Bartosch B, Stefanidis D, Myers R, Weiss R, Patience C, Takeuchi Y. Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J Virol.* 2004;78:13880-90.
- [16] Kuddus RH, Gandhi CR, Rehman KK, Guo F, Watkins SC, Valdivia LA, et al. Some morphological, growth, and genomic properties of human cells chronically infected with porcine endogenous retrovirus (PERV). *Genome.* 2003;46:858-69.
- [17] Scobie L, Taylor S, Wood JC, Suling KM, Quinn G, Meikle S, et al. Absence of replication-competent human-tropic porcine endogenous retroviruses in the germ line DNA of inbred miniature swine. *J Virol.* 2004;78:2502-9.
- [18] Suzuka I, Sekiguchi K, Kodama M. Some characteristics of a porcine retrovirus from a cell line derived from swine malignant lymphomas. *FEBS Lett.* 1985;183:124-8.
- [19] Dieckhoff B, Puhlmann J, Buscher K, Hafner-Marx A, Herbach N, Bannert N, et al. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in melanomas of Munich miniature swine (MMS) Troll. *Vet Microbiol.* 2007;123:53-68.
- [20] Frazier ME. Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Arch Virol.* 1985;83:83-97.
- [21] Suzuka I, Shimizu N, Sekiguchi K, Hoshino H, Kodama M, Shimotohno K. Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus. *FEBS Lett.* 1986;198(2):339-43.
- [22] Moalic Y, Blanchard Y, Felix H, Jestin A. Porcine endogenous retrovirus integration sites in the human genome: features in common with those of murine leukemia virus. *J Virol.* 2006 ; 80:10980-8.
- [23] Moalic Y, Felix H, Takeuchi Y, Jestin A, Blanchard Y. Genome areas with high gene density and CpG island neighborhood strongly attract porcine endogenous retrovirus for integration and favor the formation of hot spots. *J Virol.* 2009;83:1920-9.
- [24] Ericsson TA, Takeuchi Y, Templin C, Quinn G, Farhadian SF, Wood JC, et al. Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6759-64.
- [25] Krach U, Fischer N, Czauderna F, Tonjes RR. Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *J Virol.* 2001;75:5465-72.
- [26] Suling K, Quinn G, Wood J, Patience C. Packaging of human endogenous retrovirus sequences is undetectable in porcine endogenous retrovirus particles produced from human cells. *Virology.* 2003;312:330-6.
- [27] Specke V, Plesker R, Wood J, Coulibaly C, Suling K, Patience C, et al. No *in vivo* infection of triple immunosuppressed non-human primates after inoculation with high titers of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation.* 2009;16:34-44.
- [28] Denner J, Schuurman HJ, Patience C. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in

- type 1 diabetes-chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation*. 2009;16:239-48.
- [29] Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, et al. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*. 1999;285:1236-41.
- [30] Dinsmore JH, Manhart C, Raineri R, Jacoby DB, Moore A. No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells. *Transplantation*. 2000;70:1382-9.
- [31] Wynyard S, Nathu D, Garkavenko O, Denner J, Elliott R. Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation*. 2014;21:309-23.
- [32] Morozov VA, Wynyard S, Matsumoto S, Abalovich A, Denner J, Elliott R. No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation. *Virus Res*. 2017;227:34-40.
- [33] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816-21.
- [34] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154:1380-9.
- [35] Overballe-Petersen S, Harms K, Orlando LA, Mayar JV, Rasmussen S, Dahl TW, et al. Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:19860-5.
- [36] Wilson MH, Coates CJ, George AL, Jr. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther*. 2007;15:139-45.
- [37] Yang L, Guell M, Niu D, George H, Leshia E, Grishin D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 2015;350:1101-4.
- [38] Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 2017.
- [39] Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72:1175-84.
- [40] Schaefer KA, Wu WH, Colgan DF, Tsang SH, Bassuk AG, Mahajan VB. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing *in vivo*. *Nat Methods*. 2017;14:547-8.
- [41] Petersen B, Frenzel A, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Hassel P, Klein S, et al. Efficient production of biallelic GGTA1 knockout pigs by cytoplasmic microinjection of CRISPR/Cas9 into zygotes. *Xenotransplantation*. 2016;23:338-46.
- [42] Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med*. 2005;11:29-31.
- [43] Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, 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;11:32-4.
- [44] Kwon DN, Lee K, Kang MJ, Choi YJ, Park C, Whyte JJ, et al. Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep*. 2013;3:1981.
- [45] Fischer K, Kraner-Scheiber S, Petersen B, Rieblinger B, Buermann A, Flisikowska T, et al. Efficient production of multi-modified pigs for xenotransplantation by 'combineering', gene stacking and gene editing. *Sci Rep*. 2016;6:29081.

- [46] Bongoni AK, Kiermeir D, Jenni H, Bahr A, Ayares D, Klymiuk N, et al. Complement dependent early immunological responses during ex vivo xenoperfusion of hCD46/HLA-E double transgenic pig forelimbs with human blood. *Xenotransplantation*. 2014;21:230-43.
- [47] Cowan PJ, Tector AJ. The Resurgence of Xenotransplantation. *Am J Transplant*. 2017.
- [48] Denner J. The porcine virome and xenotransplantation. *Virol J*. 2017;14:171.

DISCUSSION

M. André-Laurent PARODI

En dépit du fait que le risque de réplication des PERV chez l'homme soit considéré comme « non majeur » et en tout cas serait réduit par les manipulations génétiques, quel est, à votre avis, l'avenir du procédé en termes d'éthique ?

Par extension la question se pose pour les souches d'animaux de production rendues réfractaires à certaines infections virales (porcs résistants au virus de la peste porcine africaine (PPA)). Quel est votre sentiment sur les réserves appliquées à la production de ces animaux « manipulés » à des fins de randomisation humaine ?

La question éthique est d'actualité. L'Académie des sciences, lors de la séance de juin 2017, a traité du sujet des ciseaux génétiques et de l'éthique. Jean-Paul Renard de l'Inra s'est prononcé sur les modifications du génome chez les animaux d'élevage par la nouvelle technologie CRISPR-Cas9. Il a parlé d'un nouveau « temps éthique ». Deux situations distinctes sont à prendre en compte, celle des modifications génétiques à des fins zootechniques et alimentaires et celle des modifications génétiques à des fins de xéno greffes. Afin d'éviter les réactions de rejet de greffe, les génomes des porcs fournisseurs de tissus et d'organes seront rendus plus compatibles par l'addition de plusieurs gènes d'origine humaine (humanisation). Cette approche destinée à soigner l'homme et non plus à l'alimenter, soulève des questions éthiques difficiles à traiter.

M. Jean-Yves LE GALL

Le génome humain contient également des séquences rétrovirales. La plupart sont tronquées et défectueuses mais certaines sont apparemment intactes et fonctionnelles. Peuvent-elles être compliquées en pathologie humaine ?

Des séquences de rétrovirus endogènes ont été trouvées dans les génomes humains (HERV), présentant des analogies avec le PERV. La famille des rétrovirus endogènes HERV-K a été étudiée par Thierry Heidmann à l'Institut Gustave Roussy. Relativement au risque viral, des expériences d'infection de cellules humaines par le PERV ont été menées à Cambridge USA par C. Patience dans l'objectif de démontrer l'existence de recombinaisons. Les résultats indiquaient que le potentiel de recombinaison entre les séquences de PERV et de HERV était faible et que l'émergence de nouveaux virus générés par ce mécanisme était peu probable et ne représentait pas un risque significatif pour les xéno greffes.

M. Jacques MILLIEZ

Les porcelets à PERV modifiés ont été obtenus par clonage. Le clonage peut-il provoquer des perturbations de leur système immunitaire ?

Les porcelets nés après modifications de leurs séquences PERV avaient 4 mois d'âge au moment de la publication des résultats, il est donc prématuré de tirer des conclusions sur l'effet de ces modifications sur l'intégrité du système immunitaire. Par ailleurs, la technique du clonage n'a pas eu d'effets significatifs sur le système immunitaire chez le porc.

M. Jacques BELGHITI

Avant d'envisager la xénotransplantation d'organes, peut-on envisager des greffes de tissus ?

Les études les plus approfondies ont été effectuées sur la xéno greffe de cellules du pancréas de porc (îlots de Langerhans) productrices d'insuline pour le traitement du diabète. Les cellules pancréatiques sont encapsulées dans des fibres d'alginate.

