

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

LA XENOTRANSPLANTATION INTRA-CEREBRALE :
RECHERCHES SUR L'IMMUNOGENICITE
DES CELLULES TRANSPLANTEES
ET UTILISATION DE LA TRANSGENESE
COMME STRATEGIE D'IMMUNOSUPPRESSION

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Médecine

Spécialité : Neuroimmunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Caroline MARTIN

Le 25 Juin 2004, devant le jury ci-dessous :

<i>Président</i>	Pr Marie-France GARDAHAUT , CNRS UMR 6204, Nantes
<i>Rapporteurs</i>	Dr Nora ABROUS , INSERM U588, Bordeaux Dr Claudia MONTERO-MENEI , INSERM U646, Angers
<i>Examineur</i>	Dr Bernard VANHOVE , INSERM U643, Nantes

Directeur de Thèse : Dr Philippe BRACHET

INSERM U643, Nantes, Directeur : Pr Jean Paul SOULILLOU

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	8
AVANT PROPOS	10
INTRODUCTION	
<hr/>	
I. LA TRANSPLANTATION INTRA-CEREBRALE : APPLICATION DANS LA MALADIE DE PARKINSON	12
<hr/>	
I.1. LA MALADIE DE PARKINSON	13
I.1.1. La pathologie	13
I.1.2. Les modèles animaux de maladie de Parkinson	15
I.1.2.1. Les lésions par l'hydroxy-6-dopamine (6-OHDA) chez le rat	16
I.1.2.2. Les lésions par le MPTP chez le rongeur et le primate	16
I.1.2.3. L'analyse du comportement rotatoire	17
I.1.3. Les traitements actuels de la maladie de Parkinson	18
I.1.3.1. Les traitements médicamenteux	18
I.1.3.2. Le traitement chirurgical	19
I.1.4. Les nouvelles stratégies réparatrices	19
I.1.4.1. La neuroprotection	19
I.1.4.2. La substitution neuronale	21
a. La transplantation de cellules souches	21
b. La transplantation de neuroblastes embryonnaires	23
I.2. L'ALLOTTRANSPLANTATION INTRA-CÉRÉBRALE	24
I.2.1. L'expérimentation animale	24
I.2.2. L'allogreffe en clinique	25
I.2.2.1. Le suivi des greffes intra-striatales chez l'homme : l'imagerie par TEP	25
I.2.2.2. Les essais cliniques	26
I.3. LA XÉNOTRANSPLANTATION INTRA-CEREBRALE DE TISSU PORCIN	29
I.3.1. La xénotransplantation, alternative aux limites de l'allogreffe	29
I.3.2. Le tissu fœtal porcin	30
I.3.2.1. Intérêts logistiques	30
I.3.2.2. Biosécurité et risque infectieux	31
I.3.3. Les effets restaurateurs des embryons porcins	32
I.3.3.1. Age optimal des embryons porcins	32
I.3.3.2. Intérêt fonctionnel dans le modèle de rat parkinsonien	33
I.3.3.3. Les premiers essais cliniques de xénotransplantation chez l'homme	33
I.4. LE REJET IMMUNITAIRE DES XÉNOGREFFES INTRA-CEREBRALES	36
I.4.1. Les mécanismes généraux du rejet en xénotransplantation	36

I.4.1.1.	Définition des combinaisons xénogéniques	36
I.4.1.2.	Le rejet hyper-aigu d'organe vascularisé	37
I.4.1.3.	Le rejet aigu retardé	37
I.4.1.4.	Le rejet cellulaire	38
I.4.2.	Caractérisation du rejet des xéno greffes intra-cérébrales	39
I.4.2.1.	La composante humorale	39
a.	Le rôle des immunoglobulines	39
b.	Le rôle du complément	39
I.4.2.2.	La composante cellulaire	40
a.	Le rôle des cellules NK	40
b.	Le rôle des lymphocytes T	41
 II. LA REPONSE CELLULAIRE T EN TRANSPLANTATION : MECANISMES ET CONTROLE		43
<hr/>		
II.1.	LES LYMHOCYTES T PERIPHERIQUES : POPULATIONS ET DIFFERENCIATION	43
II.1.1.	Les populations de cellules T périphériques	43
II.1.2.	Les cellules T CD4+	45
II.1.2.1.	La polarisation des cellules T CD4+	45
II.1.2.2.	Le rôle des cellules CD4+ Th1/Th2	45
II.1.2.3.	Les cellules T CD4+ régulatrices	46
II.1.3.	Les cellules T CD8+	47
II.2.	L'ACTIVATION DES CELLULES T	48
II.2.1.	La reconnaissance de l'antigène	48
II.2.1.1.	Les deux types d'antigènes	48
II.2.1.2.	L'engagement du TCR	48
II.2.1.3.	Les voies de reconnaissance de l'antigène en transplantation	49
II.2.2.	La co-stimulation	50
II.2.2.1.	La voie CD28 :B7	50
II.2.2.2.	La voie CTLA-4 :B7	52
II.2.2.3.	Les autres voies de co-stimulation	53
a.	La voie ICOS :ICOSL	53
b.	La voie PD-1 :PDL	54
c.	La voie CD40 :CD40L	55
II.3.	LE BLOCAGE DE LA REPONSE CELLULAIRE T PAR CTLA4-Ig	56
II.3.1.	Les concepts d'immunosuppression conventionnels	56
II.3.2.	La tolérance : généralités	57
II.3.3.	L'anergie induite par CTLA4-Ig	58
II.3.3.1.	La protéine recombinante CTLA4-Ig	58
II.3.3.2.	Les effets de CTLA4-Ig en allo et xénotransplantation	58
II.3.3.3.	Un autre mécanisme d'action de CTLA4-Ig : le blocage de la voie B7-tryptophane	59
 III. LE STATUT IMMUNITAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL		62
<hr/>		
III.1.	LA STRUCTURE ANATOMIQUE UNIQUE DU SNC	62
III.1.1.	L'architecture du SNC	62
III.1.2.	La structure et les fonctions de la BHE	63
III.2.	LA CIRCULATION LEUCOCYTAIRE DANS LE SNC	66
III.2.1.	Le drainage lymphatique du SNC cérébral	66
III.2.2.	La migration leucocytaire dans le SNC cérébral	67
III.2.2.1.	Le trafic leucocytaire à travers la BHE	67
a.	Les chimiokines	67
b.	Les étapes du passage transendothélial	68
III.2.2.2.	Les différentes voies de migration dans le SNC	69
a.	Du sang au LCR par les plexus choroïdes	69
b.	Du sang vers l'espace subarachnoïdien	70
c.	Du sang vers le parenchyme cérébral	70

III.3. LES CELLULES IMMUNOCOMPÉTENTES DU SNC	72
III.3.1. Les cellules microgliales	72
III.3.1.1. La cytotoxicité et les effets protecteurs des cellules microgliales	73
III.3.1.2. Les fonctions immunes des cellules microgliales	74
III.3.2. Les astrocytes	75
III.3.3. Les cellules endothéliales microvasculaires	78
III.3.4. Les macrophages périvasculaires	79

TRAVAIL DE THESE

OJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	81
PREMIÈRE PARTIE :	
RÔLE DES CELLULES GREFFÉES DANS LE REJET DES XENOGEFFES NEURONALES PORCINES	84
- Première Publication -	86
Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain	
- Deuxième Publication -	103
β1 integrin as a xenoantigen in fetal porcine mesencephalic cells transplanted into the rat brain	
SECONDE PARTIE :	
EXPRESSION TRANSGENIQUE DE CTLA4-IG PAR LES NEURONES PORCINS	130
- Troisième Publication -	132
Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	166
BIBLIOGRAPHIE	173

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Fig. 1** La voie dopaminergique nigro-striée
- Fig. 2** Les mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-OHDA et du MPTP
- Fig. 3** La synthèse des catécholamines
- Fig. 4** Les effets protecteurs du GDNF dans le modèle de lésion intra-striatale par la 6-OHDA
- Fig. 5** Stratégie de restauration de la neurotransmission dopaminergique
- Fig. 6** Le suivi de l'effet des greffes neuronales *in vivo* par TEP
- Fig. 7** La spécificité de nouvelles croissances axonales dans le cerveau de rat adulte
- Fig. 8** Le système cytotoxique perforine/granzyme
- Fig. 9** La différenciation des lymphocytes T CD4+ en sous-populations Th1 ou Th2
- Fig. 10** La différenciation des lymphocytes T CD8+ en sous-populations Tc1 ou Tc2
- Fig. 11** Les voies de reconnaissance directes et indirectes selon les disparités de CMH entre donneur et receveur
- Fig. 12** Les voies de co-stimulation B7 :CD28/CTLA-4
- Fig. 13** Les molécules de co-stimulation et leurs ligands
- Fig. 14** Le rôle pivot de l'interaction CD40 :CD40L dans la réponse cellulaire T CD4+
- Fig. 15** Le rôle immunosuppresseur de CTLA4-Ig *via* B7
- Fig. 16** Les structures anatomiques impliquées dans la circulation du liquide céphalo-rachidien (LCR) et le réseau sanguin du SNC
- Fig. 17** L'environnement cellulaire de la barrière hémato-encéphalique
- Fig. 18** Illustration du drainage lymphatique dans le SNC
- Fig. 19** La migration transendothéliale des leucocytes à travers la BHE

Table 1 Expression des protéines du complément par les cellules du cerveau

Table 2 Effets de CTLA4-Ig en allo et xénotransplantation

LISTE DES ABREVIATIONS

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AAV	Virus associé à l'adénovirus
Ad	Adénovirus
ADCC	Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity
Ag	Antigène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAM	Cellular adhesion molecule
CD	Cluster of differentiation
CD40L	CD40 ligand
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CsA	Ciclosporine A
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DST	Donor specific transfusion
EAE	Encéphalomyélite allergique expérimentale
FACS	Fluorescent-activated cell sorting
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
ICAM-1	Intercellular adhesion molécule-1
ICOS	Inducible costimulatory molecule
ICOS	ICOS ligand
IDO	Indolamine 2,3 dioxygénase
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-XR	Récepteur à l'interleukine X
INFγ	Interféron γ
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LFA-1	Leukocyte function-associated molecule-1

LPS	Lipopolysaccharide
MAO	Mono-amine oxydase
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MLR	Mixed lymphocytic reaction
MPP+	Ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP	Méthyl phényl tétrahydropyridine
NGF	Nerve growth factor
NK	Cellule natural killer
NO	Monoxyde d'azote
NSE	Neuron specific enolase
PAEC	Porcine aortic endothelial cell
PD-1	Programmed death-1
PDL	Programmed death ligand
PERV	Porcine endogen retrovirus
PNEU	Porcine neuron
RANTES	Regulated on activation, normal T expressed and secreted
RT-PCR	Retrotranscription polymerase chain reaction
sLe^x	Sialyl Lewis X
SNC	Système nerveux central
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tc	T cytotoxique
TCR	T cell receptor
TEP	Tomographie par émission de positons
TGF	Tumor growth factor
TH	Tyrosine hydroxylase
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor
Tr	T régulatrice
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late antigen-4
αGal	Résidu α 1,3-galactosyl

AVANT PROPOS

AVANT PROPOS

Bien que les maladies neurodégénératives présentent chacune une étiologie différente, elles sont toutes caractérisées par le dysfonctionnement ou la perte d'un groupe de neurones relativement bien défini. Ainsi, la maladie de Huntington résulte du principalement de la perte des neurones striataux GABAergiques qui projettent leurs axones dans la substance noire et le *globus pallidus*. Dans la sclérose amyotrophique latérale, ce sont les neurones moteurs cholinergiques de la moelle épinière et du cortex moteur du cerveau qui dégénèrent progressivement. Autre désordre neurodégénératif, la maladie de Parkinson est caractérisée par la perte sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* qui se projettent dans le striatum. Le caractère sélectif de ces pathologies permet de développer de nouvelles approches thérapeutiques. La transplantation cellulaire est ainsi une stratégie substitutive qui vise à remplacer les neurones morts par des neuroblastes embryonnaires. L'utilisation de tissu embryonnaire, dès qu'elle concerne l'être humain, présente de nombreuses limites d'ordre essentiellement éthique, mais également logistique. C'est pourquoi de nouvelles approches sont étudiées, notamment la greffe de neurones provenant d'espèces différentes (xénotransplantation). Cependant, les xéno greffes de neurones embryonnaires sont presque systématiquement rejetées par le receveur. La xénotransplantation intra-cérébrale constitue dès lors un outil permettant d'étudier le statut immunologique au système nerveux central (SNC). Ce travail a été entrepris dans le but d'approfondir nos connaissances des mécanismes gouvernant la réaction de rejet des xéno greffes dans le SNC.

Bien que limité à une zone très précise du SNC, le tissu embryonnaire utilisé pour les greffes contient plusieurs types cellulaires. Certains d'entre eux pourraient se révéler plus immunogènes que d'autres, et il est important de déterminer leur rôle dans les mécanismes de rejet du greffon. C'est pourquoi, la première partie de mon travail de thèse a

eu pour objectif d'étudier la présence et la participation éventuelle de l'endothélium embryonnaire du donneur dans le processus de rejet des xénogreffes neuronales.

La caractérisation du rejet immunitaire des xénogreffes neuronales dans le SNC nous a également amené à concevoir une stratégie immunosuppressive originale basée sur une immunosuppression locale dans le SNC, dont la mise en place a constitué la seconde partie de mon travail de thèse.

INTRODUCTION

I. LA TRANSPLANTATION INTRA-CÉRÉBRALE : APPLICATION DANS LA MALADIE DE PARKINSON

1. LA MALADIE DE PARKINSON

1.1. La pathologie

Après la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson est une des affections neurodégénératives les plus fréquentes chez le sujet de plus de 60 ans. Elle se définit cliniquement par des troubles moteurs, une akinésie (absence de mouvement) et une bradykinésie (lenteur des mouvements) associées à une rigidité extra-pyramidale dite crantée, un tremblement de repos et une instabilité posturale. L'akinésie est le maître symptôme, caractérisé par une perte de l'automatisme des mouvements avec un retard à l'initiation du mouvement et des anomalies de son exécution. Elle s'exprime de manière caractéristique aux membres supérieurs, tout particulièrement lors de la répétition prolongée d'un même geste et dans les mouvements alternatifs. Les mouvements complexes ont alors tendance à être décomposés. Toute la gamme des actes moteurs, dont la marche (démarche lente à pas raccourcis, perte du balancement des bras), la mimique (appauvrissement du réflexe de clignement des paupières), la parole (monotonie et assourdissement de la voix), l'écriture (micrographie), se trouve atteinte par la bradykinésie. Son aggravation au cours de la maladie, responsable d'une gêne à l'alimentation, à la toilette, à l'habillement, aboutit à une perte de l'autonomie du malade.

Anatomiquement, cette pathologie neurodégénérative est essentiellement caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (*locus niger pars compacta*). Ces neurones envoient leurs projections axonales dans les noyaux gris centraux (putamen et noyau caudé, ou striatum) et donnent ainsi naissance à la voie dopaminergique nigro-striée (fig. 1). Leur perte s'accompagne donc d'une réduction considérable du taux de dopamine dans les noyaux gris centraux. La dopamine y exerçant une action globalement modulatrice sur l'activité des neurones (inhibition des inter-neurones

cholinergiques striataux), en particulier dans le domaine de la motricité, son déficit est à l'origine de la symptomatologie caractéristique de cette maladie.

L'origine de la maladie de Parkinson n'est pas encore élucidée. Sur le plan étiologique, deux causes possibles sont envisagées: des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques. Les facteurs environnementaux ont été soupçonnés lorsque, à la fin des années 1970, plusieurs cas de syndrome parkinsonien, survenant brutalement, ont été observés chez de jeunes adultes de la cote californienne. Une étude révéla qu'il s'agissait de toxicomanes ayant reçu dans les jours ou les semaines précédentes, des injections d'un mauvais lot de drogue synthétique illicite, la mépéridine, substitut de l'héroïne. L'autopsie d'un des premiers cas montrait une perte neuronale sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire [Davis et coll., 1979]. Le produit toxique en cause fut ensuite identifié : le méthyl phényl tétrahydropyridine (MPTP), qui s'est révélé être un neurotoxique puissant et sélectifs des neurones dopaminergiques [Langston et coll., 1983 ; pour revue : Snyder et D'Amato, 1986]. Suite à ces observations, des études épidémiologiques ont recherché une éventuelle surexposition des patients atteints de maladie de Parkinson à des agents chimiques de structure proche de celle du MPTP. Ces études, menées aux USA, au Canada, en Chine et en Europe, ont donné dans l'ensemble des résultats concordants en faveur d'une plus grande prévalence de la maladie de Parkinson dans les pays fortement industrialisés, et plus précisément, dans les zones rurales caractérisées par une importante utilisation, de certains produits herbicides, insecticides et pesticides dont le paraquat, le diquat et la roténone. [Semchuk et coll., 1992 ; pour revue : Le Couteur et coll., 1999]. Cependant, aucune substance chimique de type MPTP n'a été isolée et aucun des produits chimiques fabriqués industriellement ne s'est avéré susceptible de provoquer un syndrome parkinsonien idiopathique chez l'homme ou l'animal, ce qui limite la portée de ces résultats épidémiologiques. Quant aux antécédents familiaux, ils ont été retrouvés chez environ 15% des patients. De façon exceptionnelle, l'hérédité est de type autosomale dominante, et dans quelques-unes des familles, une mutation a été mise en évidence dans le gène codant pour l'alpha-synucléine (chromosome

4). Cette protéine est présente dans les corps de Lewy, dont la présence constitue l'un des critères de diagnostic anatomique de la maladie de Parkinson [pour revue :Lotharius et Brundin, 2002]. Plus fréquemment, une hérédité de type autosomale récessive est observée. Ainsi, dans 10% des formes familiales, une mutation sur le gène codant pour une protéine dont la fonction reste inconnue, la parkine (chromosome 6) a été identifiée dans les populations européennes [Kitada et coll., 2000 ; Lüking et coll. 2000 ; pour revue :Damier, 2002]. La majorité des cas de maladie de Parkinson sont néanmoins sporadiques et vraisemblablement d'origine multifactorielle avec implication de facteurs génétiques et environnementaux.

Dans ces formes sporadiques, les mécanismes responsables de la mort des neurones de la substance noire demeurent mal connus. L'une des hypothèses fréquemment évoquées est que la dégénérescence des neurones dopaminergiques par apoptose surviendrait à la suite d'une cascade d'évènements dont le stress oxydatif serait l'élément majeur. Ce stress résulterait de l'augmentation de la production de radicaux libres oxygénés et de peroxyde d'hydrogène. Deux facteurs générateurs de radicaux libres ont été mis en évidence dans la substance noire de patients décédés de la maladie de Parkinson : un déficit du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et une augmentation de la teneur en fer [pour revue : Fahn et Cohen, 1992]. Les cellules gliales qui se trouvent dans l'environnement proche des neurones dopaminergiques pourraient également intervenir dans le mécanisme de dégénérescence en amplifiant l'atteinte neuronale primaire par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [pour revue : Michel et coll., 2002].

1.2. Les modèles animaux de maladie de Parkinson

Les modèles expérimentaux consistent à obtenir chez l'animal, une dégénérescence de la voie dopaminergique et une symptomatologie la plus proche possible du syndrome parkinsonien. Non seulement, ces modèles sont des outils pharmacologiques utilisés pour estimer les effets des thérapies médicamenteuses dans le traitement de la maladie de

Parkinson, mais ils permettent également de vérifier la faisabilité de nouvelles stratégies visant à restaurer le taux de dopamine dans le striatum, ou à protéger les neurones restants.

1.2.1. Les lésions par l'hydroxy-6-dopamine (6-OHDA) chez le rat

La 6-OHDA est une substance chimique qui entraîne une dégénérescence sélective de certains neurones catécholaminergiques, par induction de radicaux libres lors de son catabolisme (oxydation en quinone) (fig. 2). Son injection stéréotaxique dans la substance noire, ou le faisceau ascendant nigro-strié, induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques et de leurs terminaisons axonales dans le striatum [Sachs et Jonsson, 1975]. Cette technique de lésion par la 6-OHDA est très reproductible. Elle est aujourd'hui, la plus largement utilisée pour reproduire le syndrome akinétique de la maladie de Parkinson chez le rat.

1.2.2. Les lésions par le MPTP chez le rongeur et le primate

L'effet toxique du MPTP est dû à son produit de dégradation par la mono-amine-oxydase B (MAO B) : l'ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺). Celui-ci est spécifiquement capturé par les neurones dopaminergiques et a pour effet de les détruire en inhibant l'activité du complexe I de la mitochondrie (fig. 2). Son administration intra-veineuse chez le primate constitue un modèle très fréquemment utilisé dans les recherches pré-cliniques. Ce modèle se caractérise par une dégénérescence bilatérale, progressive et assez spécifique des voies dopaminergiques nigro-striées et mésolimbiques. Ces atteintes sont accompagnées de l'apparition progressive d'un syndrome moteur caractéristique de la maladie de Parkinson idiopathique (hypokinésie, bradykinésie, tremblement) [Hantraye et coll., 1993]. Contrairement au singe, le rat a la particularité de posséder une grande quantité de MAO B au niveau de ses vaisseaux périphériques, et le MPP⁺ formé est dégradé avant de traverser la barrière hémato-encéphalique. Ce modèle n'est donc réalisable chez le rat que suite à l'injection intra-parenchymateuse du composé par stéréotaxie.

1.2.3. L'analyse du comportement rotatoire

L'étude du comportement rotatoire est une technique d'analyse des modèles de maladie de Parkinson induite chez le rat. Elle permet d'évaluer l'intensité de la dégénérescence des neurones dopaminergiques due à une lésion unilatérale au niveau de l'un des deux faisceaux nigro-striés [Fornaguera et coll., 1993]. Dans un second temps, elle met en évidence la récupération dopaminergique après application de stratégies restauratrices basées sur diverses techniques permettent un apport dopaminergique.

Pour compenser la perte de dopamine générée par la lésion, les neurones du striatum ipsilatéral augmentent leur sensibilité à la dopamine. Cette hypersensibilité est due à une augmentation du nombre de récepteurs dopaminergiques et à une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase stimulée par la dopamine [Mishra et coll., 1974 ; Creese et coll., 1977].

Après administration systémique d'un agoniste des récepteurs dopaminergiques (apomorphine), les animaux lésés unilatéralement présentent une rotation controlatérale à la lésion et proportionnelle à la quantité de dopamine dans le striatum. Plus couramment utilisé, le traitement aigu par l'amphétamine, provoque un relargage de dopamine dans la fente synaptique et induit un comportement rotatoire marqué du côté ipsilatéral à la lésion. Le comportement rotatoire des animaux est suivi à l'aide d'un « rotomètre » [Ungerstedt et Arbuthnott, 1970]. Après avoir reçu une injection d'amphétamine (ou d'apomorphine) par voie intra-péritonéale, le rat est déposé dans une cage cylindrique. Un collier relié à un compte tours permet de comptabiliser le nombre de tours effectués dans chaque sens. Par l'intermédiaire d'un logiciel, les résultats recueillis sont exprimés en rotation par minute du côté ipsilatéral (ou controlatéral) à la lésion.

1.3. Les traitements actuels de la maladie de Parkinson

1.3.1. Les traitements médicamenteux

La perte des neurones dopaminergiques du *locus niger* entraîne une diminution du tonus inhibiteur exercé normalement par la dopamine sur les inter-neurones cholinergiques striataux. La majorité des traitements médicaux vise donc à rétablir l'équilibre dopamine-acétylcholine à restaurer la transmission dopaminergique devenue déficiente. Dans ce but, l'arsenal thérapeutique est constitué de plusieurs médicaments dont : les agonistes dopaminergiques, qui agissent directement sur les récepteurs de la dopamine ; les inhibiteurs de la mono-amine-oxydase B (IMAO B) ou de la catéchol-O-méthyl transférase (COMT), enzymes responsables du catabolisme de la dopamine ; et les anticholinergiques antiparkinsoniens qui agissent par antagonisme des effets muscariniques de l'acétylcholine au niveau central [pour revue : Lang et Lozano, 1998]. Cependant, lorsque la gêne fonctionnelle devient handicapante, la médication majeure est la L-DOPA, précurseur de la dopamine (fig. 3), qui à la différence de celle-ci, est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, et permet aux neurones dopaminergiques nigro-striés encore actifs de synthétiser de la dopamine. Ce traitement de référence est généralement très efficace et stable pendant plusieurs mois, voire années, mais au cours du temps surviennent des troubles secondaires et des complications motrices importantes (dyskinésies) [Obeso et coll., 1989]. C'est pourquoi les agonistes dopaminergiques sont préférentiellement introduits de plus en plus précocement afin de retarder au maximum le passage au traitement par la L-DOPA [Rascol, 1999 ; Rascol et coll., 2002]. A long terme, la dopathérapie présente des fluctuations d'efficacité qui correspondent à la réapparition temporaire de la symptomatologie parkinsonienne. Le patient présente alors des périodes dites « on-off » caractérisées par la survenue brutale d'une phase de déblocage succédant à une phase de blocage complet. Enfin, il est classique de constater après plusieurs années de traitement, une diminution de l'effet bénéfique de la dopathérapie qui conduit à augmenter les doses au prix des dyskinésies, avec un bénéfice mineur.

1.3.2. Le traitement chirurgical

Depuis quelques années, le traitement chirurgical par électro-stimulation est utilisé avec succès dans les cas de tremblement intense handicapant. Développée par l'équipe du Pr. Benabib à Grenoble, l'intervention consiste en l'application bilatérale d'une stimulation électrique de haute fréquence dans les noyaux subthalamiques du patient grâce à des électrodes implantées stéréotaxiquement [Limousin et coll., 1998]. La stimulation cérébrale profonde est très efficace car elle permet une réduction de la prise de L-DOPA de plus de 50%, voire son arrêt total, et améliore de façon significative les fluctuations motrices à l'origine des dyskinésies. Cependant, le nombre de candidats à la chirurgie demeure limité car ce traitement est réservé à des patients relativement jeunes et sensibles à la L-DOPA [pour revue :Krach, 2002].

1.4. Les nouvelles stratégies réparatrices

1.4.1. La neuroprotection

Une nouvelle approche thérapeutique est la protection des neurones dopaminergiques contre les processus dégénératifs. Cette stratégie est basée sur l'apport de facteurs de croissance neurotrophiques, protéines connues pour empêcher la mort des neurones durant le développement embryonnaire, mais aussi chez l'adulte en cas de lésion [Beck et coll., 1995 ; Yan et coll., 1995]. Les neurones dopaminergiques de la substance noire possèdent des récepteurs qui leur permettent de répondre à de nombreux facteurs neurotrophiques, comme le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), la neurotrophine 3, et surtout le GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) [Hyman et coll., 1994 ; Matsuo et coll., 2000]. Un apport en GDNF, notamment par injection intra-striatale, intra-nigrée ou intra-cérébroventriculaire, protège efficacement les corps cellulaires des neurones dopaminergiques contre diverses atteintes toxiques, notamment par la 6-OHDA ou le MPTP [Hoffer et coll., 1994 ; Tomac et coll., 1995 ; Gash et coll., 1996 ; Rosenblad et coll., 1999]. Mais seule l'injection intra-striatale de GDNF permet la protection des terminaisons axonales

dans le striatum (fig. 4) [pour revue :Björklund et coll., 2000 ; Kirik et coll., 2004]. L'apport de ce facteur aux patients parkinsoniens pourrait donc contribuer à ralentir, voire à arrêter, le processus dégénératif et favoriser la réafférentation des territoires dénervés.

Etant donné que ces facteurs neurotrophiques ne peuvent transiter au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et que leur action dans le SNC n'est pas restreinte aux neurones dopaminergiques seuls, une administration locale est indispensable. Expérimentalement, une libération locale du facteur neurotrophique peut être obtenue par instillation au moyen de mini-pompes osmotiques au travers de canules implantées par stéréotaxie au voisinage des neurones à traiter [Yurek, 1998], ou par implantation de microsphères biodégradables [Menei et coll., 2000 ; Gouhier et coll., 2002]. Il est également possible d'implanter des cellules génétiquement modifiées afin de produire le facteur d'intérêt. Celles-ci sont alors enrobées dans des capsules semi-perméables pour éviter leur rejet dans le cerveau du receveur [pour revue : Zurn et coll., 2001]. Une autre voie prometteuse consiste à construire et à injecter dans le cerveau des virus recombinants capables d'exprimer le gène codant pour le facteur neurotrophique.. De tels vecteurs sont actuellement dérivés de l'adénovirus, de lentivirus ou de virus associé à l'adénovirus (AAV) [pour revue :Björklund et coll., 2000]. Des virus codant pour le GDNF ont montré leur intérêt dans les modèles animaux de maladie de Parkinson [Bilang-Beuel et coll., 1997 ; Kordower et coll., 2000 ; McGrath et coll. 2002]. Une autre stratégie originale consiste à induire une expression ectopique de récepteur à un facteur neurotrophique afin que les facteurs endogènes et exogènes assurent la survie des neurones cibles. Un modèle de cette stratégie a été développé par l'équipe du Dr. Brachet. Ainsi l'expression de TrkA, le récepteur au NGF (nerve growth factor) a été induite dans les neurones de la substance noire afin de rendre les neurones dopaminergiques sensibles au NGF présent au niveau de leur terminaisons axonales dans le striatum. Ces neurones ainsi transfectés avec un AAV-TrKA sont protégés d'une lésion par la 6-OHDA [Melchior et coll., 2003].

1.4.2. La substitution neuronale

Le potentiel de régénération du SNC chez l'adulte étant limité en comparaison au système nerveux périphérique, une alternative intéressante est de remplacer les neurones morts. La transplantation cellulaire constitue alors une stratégie de substitution qui ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine du traitement des maladies neurodégénératives (fig. 5). Elle paraît particulièrement applicable lorsque la mort neuronale concerne des populations homogènes sur le plan neuroanatomique et neurochimique. La perte sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire a fait de la maladie de Parkinson un premier modèle de développement de cette technique compensatrice. En effet, les neurones atteints sont bien définis, et leur principale cible, le striatum, structure bien caractérisée même si sa structure anatomique est complexe, est facilement accessible.

a. La transplantation de cellules souches

Les cellules souches sont définies comme des cellules précurseurs ayant la capacité de se renouveler indéfiniment et d'engendrer un ou plusieurs types de cellules spécialisées. Chez les vertébrés, les cellules souches sont classées en deux groupes. Le premier est constitué uniquement des cellules souches embryonnaires (SE), capables de générer tous les types de cellules différenciées dont est constitué l'organisme. Ces cellules sont à l'origine des cellules souches du second groupe, dites cellules souches organe-spécifique ou tissu-spécifique, qui engendrent les lignées cellulaires dont est constitué un tissu particulier. Dans le SNC, ces cellules sont dites cellules souches neurales

Le cerveau adulte n'est pas entièrement dépourvu de potentiel régénérateur. En effet, un processus de neurogénèse constant a lieu dans certaines structures, en particulier au sein du système olfactif. Les cellules souches neurales adultes, capables de se différencier en neurones, astrocytes ou oligodendrocytes, sont constamment générées au niveau des zones sous-ventriculaires antérieures. Ces cellules migrent vers les bulbes olfactifs, où elles se différencient en neurones ou en cellules gliales. Ces progéniteurs pluripotents sont aisément isolables à partir du cerveau fœtal ou même adulte. En effet, alors que le cerveau

adulte présente des cellules souches neurales uniquement dans les zones sous-ventriculaires et du gyrus dentelé, le cerveau foetal en possède dans toutes ses structures en formation. Ces cellules peuvent proliférer *in vitro*, en présence d'agents mitogènes, puis se différencient. Les premières expériences de transplantation de cellules souches neurales ont montré qu'elles seraient capables de survivre *in situ*, de s'intégrer et de se différencier à la fois en cellules gliales et en neurones, dont le phénotype, pour certaines d'entre elles, correspondrait à celui des neurones naturellement présents dans la structure où l'implantation a lieu [Sinden et coll., 1997 ; Fricker et coll., 1999]. La perspective d'utiliser ces cellules souches neurales a été confortée par les résultats expérimentaux des groupes de Dunnett et McKay, qui montrent que des progéniteurs issus du mésencéphale ventral peuvent proliférer, puis se différencier en neurones dopaminergiques capables d'une restauration fonctionnelle après leur greffe dans le striatum de rat « parkinsonien » [Svendsen et coll., 1997 ; Studer et coll., 1998]. Cependant, l'opérateur ne peut contrôler que partiellement la fraction des cellules qui génère des neurones. C'est pourquoi, bien que ces cellules constituent un matériel prometteur en transplantation clinique, leur utilisation demeure encore au stade de l'expérimentation, afin de mieux caractériser les mécanismes environnementaux qui contrôlent leur différenciation et leur maturation (facteurs neurotrophiques, pression partielle d'oxygène, hormone, etc...).

Autre matériel étudié, les cellules SE sont dérivées de la masse interne du blastocyte. Il a été montré qu'elles peuvent se différencier en neurones fonctionnels de types variés, et en cellules gliales, *in vitro* [Bain et coll., 1995 ; Okabe et coll., 1996] et *in vivo* [Deacon et coll., 1998]. Le spectre de leurs possibilités de différenciation est considérable et le contrôle de leur prolifération et différenciation demeure encore à l'étude.

Enfin, un autre concept concerne les lignées générées par chaque feuillet embryonnaire. Il a été montré que des cellules d'origine mésenchymateuse, telles que les cellules stromales de la moelle osseuse, sont capables de se « transdifférencier » en neurones ou en astrocytes, tant *in vitro* [Woodbury et coll., 2000] qu'*in vivo* [Zhao et coll., 2002]. Leur implantation dans le cerveau semble conduire à une amélioration des déficits neurologiques chez les rats

modèles d'ischémie ou de maladie neurodégénérative comme la maladie de Huntington [Zhao et coll., 2002 ; Lescaudron et coll., 2003]. Comme dans le cas des cellules souches neurales, la connaissance des signaux moléculaires qui gouvernent cette différenciation neuronale ouvrirait des perspectives d'applications cliniques, dans un système permettant un prélèvement de cellules autologues, par exemple à partir de l'os iliaque.

b. La transplantation de neuroblastes embryonnaires

L'emploi des neuroblastes, neurones embryonnaires encore immatures, comme source cellulaire implantable dans le cas de la maladie de Parkinson est le plus étudié depuis 25 ans. Les cellules destinées à être greffées sont obtenues à partir du mésencéphale ventral fœtal, qui correspond à l'ébauche de la substance noire lors du développement fœtal. A ce stade du développement, les neurones dopaminergiques de la substance noire entreprennent leur différenciation terminale. Les cellules sont donc prélevées, puis greffées directement dans le striatum hôte afin que leurs axones recolonisent pour partie cette structure et rétablisse l'apport en dopamine permettant une restauration fonctionnelle chez de nombreux patients. Cette source cellulaire, à l'origine du concept de transplantation intra-cérébrale dans la maladie de Parkinson fera l'objet de ce manuscrit.

2. L'ALLOTRANSPLANTATION INTRA-CÉRÉBRALE

2.1. L'expérimentation animale

Le parenchyme cérébral adulte est un terrain très peu propice à la croissance axonale. C'est pourquoi la réinnervation du striatum à partir de neurones implantés dans la substance noire est extrêmement limitée [pour revue Isacson et Deacon, 1997]; cependant, une croissance axonale locale reste possible. Chez le rat adulte, l'allogreffe de cellules neuronales mésencéphaliques embryonnaires dans le cortex, a constitué un modèle de croissance de projections dopaminergiques néoformées. Elle a généré une nouvelle voie dopaminergique du cortex vers le striatum, précédemment dénervé par une lésion de la substance noire par la 6-OHDA [Björklund et Stenevi, 1979]. Ce type de greffe, effectué par la suite directement dans le striatum de rats lésés par la 6-OHDA, a également permis de constater la survie des cellules neuronales fœtales dans le cerveau du rat adulte, ainsi que leur aptitude à émettre des axones colonisant le striatum lésé [Perlow et coll., 1979]. De plus, les neurones dopaminergiques fœtaux greffés pourraient reconstituer une cytoarchitecture au sein du striatum [Schmidt et coll. 1982 ; Doucet et coll. 1989]. Cependant, l'extension des fibres neuronales est relativement restreinte et la ré-innervation est limitée au parenchyme striatal entourant le greffon [pour revue : Herman et Arous, 1994].

Ces expérimentations ont également montré que des neurones fœtaux allogéniques survivaient efficacement dans le striatum sans le besoin d'un traitement immunosuppresseur. Le greffon paraît ainsi immunologiquement inerte vis à vis du système immunitaire de l'hôte. Cependant, cet état apparent de tolérance peut être rompu par une réaction de rejet, induite dans un tissu périphérique. Duan et ses collaborateurs ont ainsi montré qu'une greffe de peau du donneur peut provoquer une réaction de rejet chez le receveur [Duan et coll. 1997a].

Dans ces modèles animaux de maladie de Parkinson, l'intérêt de la transplantation intra-striatale de cellules dopaminergiques, dérivées du mésencéphale ventral foetal, a été démontré par la mise en évidence d'une amélioration des déficits moteurs dus à la déplétion en dopamine dans le striatum. Cette amélioration s'est en particulier traduite par la disparition du comportement rotatoire dans le cas de lésions unilatérales. L'implantation de tissu dopaminergique foetal d'origine humaine dans le striatum de rat « parkinsonien » sous immunosuppression ayant induit des récupérations similaires [Brundin et coll., 1986], la recherche de nouvelles stratégies restauratrices médicales contre la maladie de Parkinson s'est orientée vers l'allotransplantation de tissu dopaminergique issu de mésencéphales ventraux, obtenus à partir de fœtus humains.

2.2. L'allotransplantation en clinique

2.2.1. Le suivi des greffes intra-striatales chez l'homme : l'imagerie par TEP

Les bénéfices apportés par les greffes de neurones dopaminergiques chez les patients parkinsoniens peuvent être évalués grâce à une technique d'imagerie médicale : la tomographie par émission de positons (dite TEP, ou PETscan). Relativement nouvelle dans son usage médical, cette technique permet d'obtenir, *in vivo* chez l'homme et de manière atraumatique, la cartographie tridimensionnelle au sein des organes, d'un paramètre physiologique, comme par exemple la densité de récepteurs pour un neurotransmetteur donné. Reconnu comme un outil important, performant et précis, l'imagerie par TEP permet d'explorer le fonctionnement cérébral, et plus précisément d'évaluer l'activité et les perturbations cérébrales dans de nombreuses maladies du système nerveux, comme la maladie de Parkinson, des accidents vasculaires cérébraux, des tumeurs cérébrales, ou encore des affections psychiatriques. Cette technologie associe trois éléments : une molécule marquée, isotope émetteur de positons facilement incorporable à des molécules biologiques et qui peut être injecté dans le corps du patient, un capteur qui détecte et enregistre les 2 photons émis simultanément lors de la rencontre du positon avec un

électron, et un système informatique de reconstitution d'image. Dans la maladie de Parkinson, la fluoro-DOPA ([¹⁸F]L-DOPA) est le traceur qui permet de confirmer la disparition des neurones dopaminergiques après un examen des signes cliniques moteurs, et d'évaluer le taux de progression de l'atteinte neuronale. En effet, la quantité de fluoro-DOPA capturée au niveau des transporteurs dopaminergiques est proportionnelle à la densité des fibres dopaminergiques, et donc au nombre de neurones survivants. Son augmentation, après la greffe intra-cérébrale de neurones dopaminergiques, associée à l'amélioration des signes cliniques, témoigne des bénéfices de la greffe (fig. 6) [Rémy et coll., 1995 ; Brooks, 2003].

2.2.2. Les essais cliniques

Les premiers essais cliniques chez l'homme ont débuté à la fin des années 80. Ils concernent des patients atteints de la maladie de Parkinson depuis plus de 10 ans, chez lesquels le traitement médical est devenu insuffisant (augmentation des périodes Off sous traitement par la L-DOPA). Le tissu, issu du mésencéphale ventral d'embryon humain de 6 à 9 semaines, est greffé par stéréotaxie dans le striatum (précisément dans le putamen) des patients soumis, dans la plupart des essais, à un traitement immunosuppresseur durant les six mois suivants la greffe.

Les premiers essais de transplantation ont montré que le tissu mésencéphalique peut être greffé dans le striatum de patients atteints de maladie de Parkinson sans provoquer de complication majeure [Lindvall et coll., 1988]. Après 2 ans de suivi, les deux premières patientes greffées ont présenté une réduction modeste des symptômes parkinsoniens qui s'accordait avec des changements mineurs de capture de fluoro-DOPA mesurée dans le striatum par la TEP. Par la suite, une amélioration de la procédure chirurgicale de transplantation a permis d'observer chez un troisième patient, 5 mois après la greffe, à la fois un effet fonctionnel marqué et une augmentation significative de la capture striatale de fluoro-DOPA sur la TEP [Lindvall et coll., 1990]. Ces premiers résultats furent très encourageants puisqu'ils montraient d'une part, que la greffe mésencéphalique pouvait

restaurer la synthèse de dopamine ainsi que son stockage dans le striatum humain dénervé, et d'autre part, que cette restauration menait à une amélioration significative de la fonction motrice chez le patient atteint de maladie de Parkinson idiopathique. L'intérêt de cette technique de transplantation chez le malade parkinsonien a été confirmé par les résultats encourageants obtenus après le suivi à long terme de ce patient et les améliorations observées chez un quatrième patient greffé dans les mêmes conditions. En effet, trois ans après leur greffe, ces deux patients ont présenté une réduction de la durée et du nombre quotidien de périodes off, permettant la diminution de prise unique de L-DOPA et la prolongation de son effet. L'augmentation de la capture de fluoro-DOPA dans le striatum greffé, observée par la TEP, a confirmé la survie et l'activité fonctionnelle de la greffe mésencéphalique [Lindvall et coll., 1992 et 1994]. De même, l'équipe française de P. Cesaro a observé une amélioration motrice chez deux patients transplantés unilatéralement, et a suggéré la nécessité d'une transplantation bilatérale pour obtenir des effets moteurs bilatéraux de même ampleur [Peschanski et coll., 1994]. Ces premiers essais cliniques ont conforté l'idée que la greffe neuronale pouvait être développée comme traitement des patients atteints de maladie de Parkinson.

Ainsi, durant les 15 dernières années, plusieurs études cliniques ont été menées chez plus de 350 personnes atteintes de maladie de Parkinson, afin de soutenir la faisabilité des transplantations intra-cérébrales allogéniques, mais aussi pour mesurer la récupération fonctionnelle consécutive à l'application de cette technique [Widner et coll., 1992 ; Freeman et coll., 1995 ; Kordower et coll., 1995 ; Wenning et coll., 1997]. L'étude d'un patient, 10 ans après transplantation dans le striatum, a prouvé que la libération de dopamine dans cette structure était un processus de restauration stable sur le long terme [Piccini et coll., 1999]. Différentes approches ont été réalisées afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique de cette méthode, notamment la greffe bilatérale [Hauser et coll., 1999] et les greffes consécutives [Hagell et coll., 1999].

Cette première phase d'essais cliniques, réalisés en « ouvert » sur de petites séries de patients, ayant démontré la faisabilité de la transplantation comme thérapie dans la maladie

de Parkinson, l'institut national de la santé américain a décidé de supporter une seconde phase d'essais cliniques. Un premier essai en « double aveugle » a ainsi débuté en 1999 chez 40 patients afin de comparer les effets de la transplantation versus une opération « placebo » chez des patients parkinsoniens et de déterminer l'efficacité et la sécurité d'une telle technique [Fahn et coll., 1999]. Cette étude révèle que seuls les patients greffés âgés de moins de 60 ans présentent une amélioration significative de leur état [Freed et coll., 2001]. Cependant plusieurs des patients ont aussi développé des dyskinésies sévères qui, selon l'équipe américaine, seraient liées à des problèmes techniques pouvant conduire à une réafférentation neuronale du striatum excessivement hétérogène ; des réactions de rejet immunologique ont également été évoquées. Le nombre limité d'embryons utilisés dans cette étude, les sites d'implantation restreints dans le cerveau, et le peu de recul suite à la greffe (1an) limitent encore l'intérêt de ces résultats et amènent à des remaniements des protocoles expérimentaux [Olanow et coll., 2001].

3. LA XÉNOTRANSPLANTATION INTRA-CÉRÉBRALE DE TISSU PORCIN

3.1. La xénotransplantation, alternative aux limites de l'allotransplantation

Outre les problèmes éthiques posés par la manipulation à grande échelle d'embryons humains, les allogreffes de tissu neuronal embryonnaire chez l'homme sont également limitées par des problèmes d'ordre logistique, qui réduisent considérablement les possibilités d'expansion hors des centres de recherche spécialisés. La recherche d'une nouvelle source cellulaire s'est imposée et a conduit à la transplantation de neurones de mammifères domestiques, la xénotransplantation. En effet, celle-ci permet en principe de résoudre l'ensemble des problèmes de l'allotransplantation grâce à la standardisation du prélèvement :

Alors que l'allotransplantation exige une coordination précise de l'activité obstétricale, de la dissection des tissus nerveux, et de la neurochirurgie stéréotaxique, la xénogreffe permet de découpler complètement le prélèvement fœtal et la préparation des tissus de l'acte chirurgical. Le neurochirurgien peut commander le tissu et le recevoir « prêt à l'emploi » sans requérir l'intervention de collègues obstétriciens et biologistes, et donc sans dépendre de leur disponibilité.

- Les examens nécessaires pour assurer la qualité des tissus fœtaux, en particulier virologiques, peuvent être réalisés avant le prélèvement chez la femelle porteuse, élevée dans des conditions de maîtrise sanitaire des porcs exempts d'organismes pathogènes (EOPS).
- Toutes les manipulations du tissu potentiellement utiles, comme par exemple les sélections cellulaires, peuvent être pratiquées dans les conditions de sécurité et de confinement requises.

- La reproduction du geste et la standardisation des procédures ont la possibilité d'être contrôlées.
- Enfin, la quantité de tissu greffé lors d'une allogreffe dépend exclusivement du nombre de fœtus humains disponibles le jour de l'intervention. Sachant que seuls 10% des neurones dopaminergiques greffés survivront à la greffe, une limite inférieure de 3 embryons humains par coté cérébral greffé a été définie ; il est donc extrêmement difficile d'obtenir le même jour un nombre suffisant de fœtus, si possible âgés de 4 semaines. La conservation du tissu dans des milieux dits d'hibernation est possible, mais pourrait être à l'origine de complications post-opératoires du fait d'une mort cellulaire accrue. Les difficultés de contrôle et de maîtrise des différents paramètres d'un tel protocole de greffe en limitent considérablement la réalisation et la standardisation. Au contraire, la xéno greffe permet de s'abstenir des questions techniques concernant la limitation en tissu et la sélection des cellules. Elle assure un approvisionnement suffisant en nombre et parfaitement contrôlé.

3.2. Le tissu fœtal porcin

Le porc est considéré comme le donneur le plus adapté en xénotransplantation humaine et ce pour plusieurs raisons. Génétiquement, il est assez proche de l'homme en présentant de très nombreux réarrangements génétiques communs avec ceux du génome humain [Johansson et coll., 1995 ; Rettenberger et coll., 1995]. Les organes du porc sont généralement de taille et de fonction physiologique comparables à celles des organes humains, même si certaines différences existent. En médecine, le recours au tissu porcin est courant : certaines héparines sont extraites de l'intestin de porc et certaines insulines du pancréas ; les porphyrines de porc sont employées en photochimiothérapie et les extraits de surfactant de poumon de porc sont utilisés en néonatalogie en cas de syndrome de détresse respiratoire (maladie des membranes hyalines). De même, les bioprothèses valvulaires sont des valves cardiaques artificielles fabriquées à partir de valves naturelles spécialement traitées, notamment prélevées à partir des cœurs de porc.

3.2.1. Intérêts logistiques

Dans le domaine des transplantations intra-cérébrales, le porc fœtal est une source particulièrement intéressante de neurones car chaque portée contient souvent plus de douze embryons. Il fournit ainsi un matériel abondant selon des temps réguliers et relativement courts, puisque le porc est sexuellement mature en 9 mois, et la truie donne des portées en 3 mois, 3 semaines et 3 jours. L'élevage porcin étant parfaitement maîtrisé, l'utilisation du tissu porcin contourne les problèmes d'approvisionnement en tissu nerveux fœtal rencontrés en allotransplantation, et permet de mettre en place des structures de production industrielle.

3.2.2. Biosécurité et risque infectieux

Afin de garantir et de maintenir des lignées d'animaux sains, c'est à dire exempts de tout agent pathogène, les procédures de biosécurité concernant la production et l'utilisation de tissu porcin incluent la génération des animaux par hystérotomie dérivée, un isolement complet des animaux donneurs des autres animaux (air filtré, nourriture irradiée, eau filtrée), et enfin des tests microbiologiques sur les tissus collectés [Barker et coll., 2000a]. Dans ces conditions, la transmission de pathogènes tels le prion, ou de virus spécifiques tels les paramyxovirus ou les parvovirus porcins, est faible. Toutefois, un problème potentiel est la transmission à l'homme de rétrovirus endogènes porcins pathogènes (PERV). Ces agents viraux ne peuvent être éliminés car ils sont intégrés au génome du fœtus. *In vitro*, les PERV, libérés par les cellules porcines, peuvent infecter les lignées de cellules humaines [Patience et coll., 1997 ; Martin et coll., 1998], mais aucune infection n'a été observée chez les patients greffés avec des tissus porcins [Heneine et coll., 1998]. La crainte de transmission de PERV à l'homme a été écartée par une étude menée par le CDC (Center for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Disease, Atlanta) portant sur 160

personnes ayant subi une greffe d'organe ou de tissu porcin. Après une période prolongée de 12 ans, aucune transmission infectieuse n'a pu être détectée chez ces patients dont 36 étaient sous immunosuppression [Paradis et coll., 1999]. Enfin, il pourrait être envisagé, par des techniques de croisement ou de transplantation nucléaire, de disposer de porcs dont le génome est dépourvu de PERV.

3.3. Les effets restaurateurs de la xénogreffe neuronale

3.3.1. Age optimal des embryons porcins

L'âge gestationnel de 25-28 jours (E25-E28) est considéré comme l'âge optimal d'utilisation des embryons de porc dans le cadre de la xénogreffe de neurones mésencéphaliques. Différentes études *in vitro* et *in vivo* ont comparé les neuroblastes du mésencéphale ventral, ébauche fœtale de la substance noire, afin d'évaluer leur état de différenciation et leur capacité de survie après greffe. Chez les embryons porcins de 28 jours, les cellules du mésencéphale ventral, sont différenciées en neurones contenant de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme qui témoigne de leur potentiel à produire de la dopamine, puisqu'elle est responsable de l'oxydation de la tyrosine en DOPA, précurseur de la dopamine [Molenaar et coll., 1997]. L'activité tyrosine hydroxylase est en fait observée dès l'âge fœtal de 21 jours, et bien que le pourcentage de neuroblastes TH-positifs en culture soit plus important à cet âge, les fœtus seront prélevés à 28 jours car le nombre total de cellules TH positives au sein du mésencéphale ventral est environ 6 fois plus important [HogenEsch et coll., 2000]. Bien que différenciées, ces cellules présentent encore des caractères morphologiques immatures tels que des corps cellulaires très arrondis et l'absence de développement de neurofilaments [Molenaar et coll., 1997]. Les suspensions cellulaires, obtenues à partir de foetus plus âgés (42 à 70 jours), sont plus différenciées, mais aussi plus vulnérables à la fois en culture et après implantation dans le striatum. Ainsi, seules les greffes de cellules TH positives issues d'embryons porcins de 28 jours présentent une survie optimale après implantation intra-striatale [HogenEsch et coll., 2000].

3.3.2. Intérêt fonctionnel dans le modèle de rat parkinsonien

Non seulement le porc fœtal fournit un matériel cellulaire abondant mais il possède également des caractéristiques très favorables pour la greffe de neurones dopaminergiques. En effet, les neurones fœtaux porcins présentent un temps de développement relativement long et sont capables d'émettre des axones de grande taille, caractéristiques qui ne se retrouvent pas chez toutes les espèces [Deacon et coll., 1994].

Des études réalisées dans le modèle de rat parkinsonien sous traitement immunosuppresseur, ont montré que des neurones mésencéphaliques fœtaux porcins, implantés dans le striatum, reconstituaient, après un délai de plusieurs mois, une innervation dopaminergique particulièrement importante dans la substance grise [Isacson et coll., 1995]. Plus généralement, des neurones isolés à partir de diverses aires du cerveau fœtal porcin et transplantés dans l'aire correspondante lésée du SNC de rat adulte, émettent des axones qui recolonisent les régions normalement afférentées par les neurones détruits, et reconstituent partiellement la cytoarchitecture (fig. 7) [Isacson et Deacon, 1996]. Chez le rat déplété en dopamine, les neuroblastes dopaminergiques porcins greffés dans le striatum, non seulement établissent un circuit synaptique, mais entraînent une libération régulée de dopamine. Une récupération fonctionnelle significative est alors observée avec notamment la réduction des mouvements de rotation après injection d'amphétamine chez le rat lésé à la 6-OHDA [Galpern et coll., 1996]. Ainsi, dans les modèles animaux de maladie de Parkinson, l'implantation de neurones issus du mésencéphale ventral fœtal porcin dans le striatum peut corriger des déficits associés à la perte complète des neurones dopaminergiques de la substance noire.

3.3.3. Les premiers essais cliniques de xénotransplantation chez l'homme

Devant les résultats prometteurs de la xénotransplantation dans le modèle de rat Parkinsonien, des études cliniques pilotes ont été menées afin d'étudier la faisabilité et l'efficacité d'une implantation unilatérale de cellules embryonnaires porcines dans le

striatum. Sous le contrôle de la U.S. Food and Drug Administration (FDA), l'équipe américaine d'Isacson a ainsi entrepris de greffer douze patients atteints de maladie de Parkinson de stade avancé, souffrant de périodes off ou de dyskinésies malgré un traitement thérapeutique. Une première moitié des patients greffés unilatéralement a été soumise à un traitement immunosuppresseur par la ciclosporine, et l'autre moitié a été transplantée avec des cellules fœtales porcines traitées préalablement avec un anticorps anti-CMH de classe I (complexe majeur d'histocompatibilité). Les implantations ont été bien tolérées et aucune transmission de PERV, ou d'autre pathogène porcin, n'a été détectée. L'analyse histologique post-mortem d'un patient décédé d'une embolie pulmonaire, sept mois après la greffe, a révélé la présence de neurones dopaminergiques porcins au sein du greffon mais en nombre restreint. Ceux-ci étaient toutefois capables d'émettre des axones localisés à l'intérieur du greffon, mais susceptibles de coloniser également le parenchyme striatal de l'hôte. Ces résultats ont montré qu'une fraction minime des neurones xénogéniques greffés pouvait survivre et se différencier dans le striatum de patient parkinsonien soumis à un traitement immunosuppresseur [Deacon et coll., 1997]. Un an après l'implantation, l'analyse des patients par TEP n'a pas montré de différence de recapture de la fluoro-DOPA entre les cotés ipsilatéraux et controlatéraux aux greffes. Cependant, un bénéfice clinique apparent a été observé chez trois des onze patients. Selon l'équipe américaine, le bénéfice clinique apporté par la xénotransplantation dans la maladie de Parkinson nécessitait alors d'être évalué dans une étude randomisée avec implantation bilatérale d'un nombre plus important de cellules porcines [Fink et coll., 2000 ; Schumacher et coll., 2000]. Une telle étude a été mise en place chez dix-huit patients. Dix d'entre eux ont été greffés et soumis à un traitement de 75 jours post-greffe par la ciclosporine et la prednisone, et les huit autres ont subi intervention placebo. Les cellules ont été implantées dans douze sites cérébraux (dix dans le putamen et deux dans le noyau caudé). Après 12 mois, les patients greffés ont présenté une diminution du pourcentage de temps d'éveil avec des dyskinésies. Cependant, après 18 mois, aucune différence, concernant les compétences motrices des patients et les évaluations cliniques, n'a été mise en évidence

entre les deux groupes. De plus des effets indésirables sérieux ont été observés chez quatre patients traités et cinq patients du groupe placebo. Néanmoins, il faut souligner qu'aucun sujet n'a développé de dyskinésie et les tests de détection de PERV ont toujours été négatifs [Fink et coll. 2002 ; Freeman et coll., 2002].

De tels résultats paraissent décevants, mais le concept de la xénotransplantation intra-cérébrale ne doit pas être remis en question. Les paramètres expérimentaux tels le nombre de patients ou la durée du suivi, ainsi que le protocole de greffe lui-même doivent faire l'objet de nouvelles études. De plus, la complexité du modèle n'exclue pas une composante immunologique et nécessite des études fondamentales sur animaux avant toute reprise d'essais cliniques.

4. LE REJET IMMUNITAIRE DES XÉNOGREFFES INTRA-CÉRÉBRALES

A l'exception de deux études [Björklund et coll., 1982 ; Daniloff et coll., 1985] montrant une survie prolongée des xénogreffes neuronales murines dans le SNC du rat sans administration de traitement immunosuppresseur, les autres études effectuées chez le rat, dont les nôtres, indiquent que les xénogreffes font l'objet d'une réaction immune de l'hôte menant à la destruction du greffon en quelques semaines [Takei et coll., 1990 ; Duan et coll., 1995 ; Larsson et coll., 2001a].

4.1. Les mécanismes généraux du rejet en xénotransplantation

4.1.1. Définition des combinaisons xénogéniques

L'obstacle majeur aux xénogreffes est l'apparition d'un rejet immunitaire dont la cinétique et les mécanismes effecteurs dépendent des combinaisons xénogéniques réalisées. Dans les greffes d'organe vascularisé, ces combinaisons se distinguent par la présence ou non d'anticorps naturels préformés anti-donneur. Chez l'homme et les singes de l'Ancien Monde (primate), il existe des anticorps dirigés contre le résidu α 1,3-galactosyl (épitope Gal α 1-3Gal, ou α Gal) présent sur les glycoprotéines et les glycolipides de tous les autres mammifères. En effet, l'absence de cet épitope chez l'homme et le primate, due à l'inactivation du gène de l' α 1,3-galactosyltransférase, enzyme permettant la fixation du résidu α Gal sur les extrémités des glycoprotéines et des glycolipides, est corrélée à l'apparition des anticorps anti- α Gal [Galili, 1993]. Selon la présence ou l'absence de xénoanticorps naturels (XAN), dirigés contre l'épitope α Gal ou contre d'autres antigènes, et en quantité suffisante pour entraîner un rejet, les combinaisons seront respectivement qualifiées de discordantes ou de concordantes.

4.1.2. Le rejet hyper-aigu d'organe vascularisé

Les combinaisons discordantes sont sujettes à un rejet humoral violent qui survient de quelques minutes à quelques heures après le rétablissement de la vascularisation. Du point de vue histologique, ce rejet est caractérisé par une thrombose et une hémorragie interstitielle. Dans les combinaisons porc→primate/homme, il est dû à la présence simultanée de xéno-anticorps naturels et du complément [Collins et coll., 1995]. La liaison des xéno-anticorps à l'épitope α Gal, présenté par les cellules endothéliales des vaisseaux du greffon porcin, entraîne l'activation de la cascade du complément, première étape conduisant au rejet hyper-aigu. Elle induit l'activation et la lyse des cellules endothéliales du greffon, qui activent la voie de la coagulation et provoquent ainsi œdème, hémorragie, agrégation plaquettaire, thrombose et ischémie.

4.1.3. Le rejet aigu retardé

Les combinaisons concordantes font l'objet d'un rejet aigu retardé (ou rejet vasculaire aigu), qui survient en quelques jours. Ce type de rejet peut également survenir dans les combinaisons discordantes lorsque le rejet hyper-aigu est bloqué par une inhibition du complément et/ou l'élimination des xéno-anticorps naturels [pour revue: Bach et coll., 1996]. Histologiquement, des lésions vasculaires, des microthromboses, des hémorragies et des zones de micronécrose sont observées. Ce rejet est associé à une activation des cellules endothéliales, à la présence de dépôts de fibrine et à une agrégation plaquettaire [Blakely et coll., 1994]. Il est provoqué par la fixation de xéno-anticorps induits, après la transplantation, sur les cellules endothéliales du donneur. Ceci entraîne leur activation et la destruction du greffon. Le rôle de ces anticorps a été mis en évidence par des expériences de transfert. Ainsi l'injection du sérum d'un receveur ayant rejeté sa greffe, à un animal dépleté en complément et en anticorps naturels, entraîne un rejet accéléré du greffon chez ce dernier [Fryer et coll., 1995]. Il existe à côté de la réponse humorale, une composante cellulaire du rejet retardé. En effet, l'analyse immunohistologique des greffons xénogéniques, présentant des signes de rejet vasculaire aigu, montre la présence d'un

infiltrat composé de macrophages et de cellules natural killer (NK), associé à une forte expression de cytokines pro-inflammatoires [Blakely et coll., 1994 ; Candinas et coll., 1996].

4.1.4. Le rejet cellulaire

Afin d'étudier le rejet xénogénique de type cellulaire, il faut avant tout prévenir les rejets hyper-aigu et retardé. L'immunoabsorption des xéno-anticorps, l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur puissant, capable de contrôler la production de ces anticorps, et/ou une inactivation du complément, permettent l'accès à l'étude *in vivo* des mécanismes cellulaires et humoraux du rejet tardif des xénogreffes, ainsi que l'analyse du rôle des lymphocytes T.

Le rejet cellulaire est basé sur la reconnaissance des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (cf II.2.1.). Il est caractéristique des allogreffes, mais Yamada et ses collaborateurs ont montré que la réponse cellulaire humaine contre le greffon porcin présentait des similarités, par son intensité et sa spécificité. La reconnaissance antigénique des molécules du CMH de classe II porcin implique de la même façon le répertoire du récepteur des lymphocytes T (TCR), les interactions entre les molécules accessoires et la production de cytokines [Yamada et coll., 1995 ; Sebille et coll., 2001]. Les expériences de xénogreffe de peau [Pierson et coll., 1989], ou des îlots pancréatiques [Weber et coll., 1990] ont montré que les lymphocytes T CD4+, avec les macrophages et les cellules NK, semblaient jouer un rôle important dans le rejet tardif des xénogreffes. Ce rôle des cellules T est directement supporté par l'utilisation de traitements immunosuppresseurs ou d'anticorps qui ciblent les lymphocytes T et permettent la survie à long terme des greffons xénogéniques [pour revue : Brouard, et coll.1999]. De plus, le transfert de cellules T CD4+ suffit à interrompre la survie à long terme de xénogreffes cardiaques chez des animaux irradiés, ce qui désigne la réponse cellulaire T comme un autre obstacle à la xénotransplantation [Sebille et coll., 2001]

4.2. **Caractérisation du rejet des xénogreffes intra-cérébrales**

4.2.1. **La composante humorale**

a. **Le rôle des immunoglobulines**

A la différence des greffes d'organes vascularisés, les greffes neuronales ne font pas l'objet d'un rejet hyper-aigu. Cependant, les xénoanticorps naturels humains sont cytotoxiques pour les cellules mésencéphaliques embryonnaires porcines en présence du complément [Sumitran et coll., 1999a]. Harrower et ses collaborateurs ont mis en évidence l'expression de l'épitope α Gal au sein du tissu neural mésencéphalique des embryons porcins de 28 jours [Harrower et coll., 2002]. Ce dernier serait exprimé par les neuroblastes, les cellules souches, les cellules endothéliales et la microglie, et pourrait donc intervenir dans le rejet de ce type de greffe, en faisant l'objet d'une opsonisation par les anticorps et éventuellement par les cellules NK (natural killer). L'élimination de ces anticorps anti- α Gal par immunoadsorption a révélé la présence, dans le sérum humain, d'anticorps préformés dirigés contre d'autres épitopes porcins [Sumitran et coll., 1999a]. Les immunoglobulines pourraient donc participer au rejet des xénogreffes de neurones, mais selon un mécanisme qu'il reste à mettre en évidence. Leur implication dans le rejet des xénogreffes intra-cérébrales est confortée par une étude montrant un retard du rejet des greffes intra-striatales de mésencéphale ventral embryonnaire porcin dans le striatum de la souris déficiente en immunoglobulines [Larsson et coll., 1999].

b. **Le rôle du complément**

L'activation du complément semble impliquée dans le processus de rejet des cellules neuronales porcines dans le cerveau de rat, puisque son inhibition retarde, mais n'empêche pas la réponse immune induite par le greffon et le rejet de celui-ci [Barker et coll., 2000b]. Les mécanismes selon lesquels le complément contribue à ce rejet restent inconnus. Il est possible que ces mécanismes soient générés localement car tous les composants nécessaires à la cascade d'activation du complément existent au sein du SNC et peuvent

être activés par de nombreux stimuli (table 1) [pour revue : Morgan et Gasque, 1996]. Le greffon induirait alors une activation locale de la cascade du complément, plutôt que d'origine systémique ; ce qui n'exclue pas l'intervention d'immunoglobulines d'origine périphérique. *In vitro*, le complément influence la présentation antigénique en se fixant sur l'antigène, et il stimule la réponse proliférative des cellules T à l'interleukine-2 (IL-2) [Erdei et coll., 1984 ; Arvieux et coll., 1988]. Il est donc envisageable qu'il intervienne dans le déroulement de l'infiltration lymphocytaire [Pratt et coll., 1996], voire qu'il amplifie l'immunogénicité du xéngreffon [Dempsey et coll., 1996]. Dans ce cas, le complément interviendrait plus comme un inducteur d'une réponse cellulaire que comme un effecteur dans une réponse humorale.

4.2.2. La composante cellulaire

a. Le rôle des cellules NK

Les cellules NK s'apparentent aux lymphocytes par leur activité cytolytique, la production d'interféron γ (INF γ) et le répertoire des antigènes de différenciation des leucocytes. Contrairement à eux, elles ne reconnaissent pas les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) *via* un mécanisme mobilisant le TCR, mais grâce à d'autres récepteurs tels le récepteur pour les fragments Fc des immunoglobulines G (IgG). Elles sont donc capables de tuer des cellules cibles sans restriction par le CMH. Leur action s'effectue par la sécrétion de perforine ou par la liaison Fas/FasL, mécanismes inducteurs d'apoptose cellulaire (cf II.1). Les cellules NK participent également à la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

Leur rôle dans le rejet des xénotransplantations intra-cérébrales est encore mal défini. *In vitro*, les cellules NK ne sont capables de lyser les cellules du mésencéphale ventral foetal porcin, qu'en présence d'IL-2 [Sumitran et coll., 1999b]. Bien que présentes dans la plupart des rejets de xéngreffes neuronales, le rôle des cellules NK ne semble pas essentiel

puisque leur déplétion n'affecte pas significativement la survie des greffons porcins [Larsson et coll., 2001b].

Toutefois, Sumitran et ses collaborateurs ayant montré une activité lytique des cellules NK vis à vis des neurones fœtaux porcins en présence d'anticorps naturels humains *in vitro* [Sumitran et coll., 1999b], il est envisageable que leur rôle soit essentiellement lié à un mécanisme d'ADCC et donc à la présence des immunoglobulines (cf I.4.2.1.a.).

b. Le rôle des lymphocytes T

Malgré une intervention limitée du complément et des anticorps, les xénogreffes de neurones sont généralement rejetées dans le cerveau, ce qui laisse présumer un rejet de type cellulaire. S'ajoutant aux études *in vitro* selon lesquelles les cellules porcines neuronales sont capables d'induire une prolifération des cellules T humaines [Brevig et coll., 1997], plusieurs observations indiquent un recrutement des cellules T lors du rejet des xénogreffes intra-cérébrales. Histologiquement, un infiltrat massif de cellules T est observé au niveau du site d'implantation des cellules fœtales neurales porcines chez le rat [Duan et coll., 1995 ; Larsson et coll., 2001a ; Rémy et coll., 2001]. De plus, le rejet peut être fortement retardé, voire prévenu, par le traitement des animaux receveurs avec des anticorps dirigés contre les cellules T, comme par exemple des anticorps anti-CD4 [Wood et coll., 1996], des anticorps dirigés contre le TCR $\alpha\beta$ associés aux anticorps anti-CD2 [Okura et coll., 1997], ou encore des anticorps anti-récepteur à l'IL-2 [Honey et coll., 1990]. Enfin, la survie des xénogreffes neuronales peut être également prolongée par l'administration au receveur de médicaments immunosuppresseurs actifs sur la réponse cellulaire T, tels que la ciclosporine et le FK506 (tacrolimus) [Brundin et coll., 1989 ; Wennberg et coll., 2001].

Ces observations ont mis en relief le rôle déterminant des cellules T dans le rejet des xénogreffes neuronales. Parmi les deux sous-types de lymphocytes T, il semble que les cellules CD4⁺ soient les plus impliquées dans le rejet des xénogreffes intra-cérébrales, puisque leur déplétion entraîne une survie importante du greffon, alors que la déplétion des

cellules CD8+ n'induit qu'un retard dans le rejet et ne représente donc qu'un mécanisme secondaire [Wood et coll., 1996].

Les cellules T auraient donc un rôle essentiel dans le rejet des xénogreffes intra-cérébrales. Afin de mieux le contrôler, il reste encore bien sûr à comprendre les phénomènes immuns dans le SNC, mais avant tout, à définir les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire T en transplantation générale.

II. LA RÉPONSE CELLULAIRE T EN TRANSPLANTATION, MÉCANISMES ET CONTRÔLE

L'aspect le plus important de la régulation immunitaire est son aptitude à distinguer le soi du non-soi. Cette propriété fondamentale se traduit par la reconnaissance et la destruction de l'élément étranger, ce qui dans le domaine des transplantations, mène au rejet du greffon. Cette réponse hautement sélective est gouvernée par un ensemble complexe de mécanismes cellulaires régulateurs, et requiert en premier lieu la reconnaissance de l'antigène et l'activation des cellules T. La reconnaissance des peptides antigéniques apprêtés par les CPA est permise grâce à un récepteur hautement polymorphe, le TCR. Le TCR est un complexe multiprotéique composé d'un hétérodimère clonotypique non covalent formé de deux chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. En raison du très faible nombre de lymphocytes $T\gamma\delta$, et de leur répartition très hétérogène (presque exclusivement épithéliale), nous nous intéresserons plus particulièrement aux lymphocytes $T\alpha\beta$ dans ce manuscrit.

5. LES LYMPHOCYTES T PÉRIPHÉRIQUES: POPULATIONS ET DIFFÉRENCIATION

5.1. Les populations de cellules T périphériques

Les lymphocytes T sont divisés en deux sous-populations majeures fonctionnellement différentes selon qu'elles expriment à leur surface et de façon mutuellement exclusive, les glycoprotéines CD4 ou CD8, appelées co-récepteurs.

Les lymphocytes $T\alpha\beta$ CD4⁺ reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH de classe II exprimées à la surface des CPA. Ces cellules CD4⁺ ont une fonction auxiliaire dans la réponse immunitaire, d'où leur nom " lymphocyte T helper (Th)". En

effet, elles sont responsables de la production de la plupart des cytokines stimulant la réponse immunitaire. Ces cytokines ont une action autocrine sur les cellules CD4+, ou paracrine sur les autres cellules telles que les cellules CD8+, les macrophages, et les cellules B. En ayant la capacité de recruter et d'activer de nombreuses cellules effectrices, les cellules CD4+ ont un rôle primordial lors du rejet de greffe.

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8+ reconnaissent les peptides présentés par les molécules du CMH de classe I. Bien que ces cellules soient également capables de produire de grandes quantités de cytokines, elles agissent par la lyse directe des cellules cibles, d'où leur nom "lymphocytes T cytotoxiques (Tc)". Leur fonction cytotoxique est principalement caractérisée par la synthèse, calcium-dépendante, de granules de perforine et de granzymes (A et B) qui induisent la mort de la cellule cible par apoptose (fig. 8) [Shresta et coll., 1998].

L'importance de ces deux populations de cellules T dans le rejet de greffe a été démontrée dans différents modèles expérimentaux. Dans le rejet d'allogreffe cardiaque, Krieger et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence, chez les souris déficientes en molécules CD4 ou CD8, le rôle essentiel des lymphocytes T CD4+, mais pas des lymphocytes T CD8+ [Krieger et coll., 1996]. Le traitement des animaux receveurs avec des anticorps anti-CD4+ ou anti-CD8+ a également montré le rôle primordial des cellules T CD4+ mais non des cellules T CD8+ dans le rejet d'allogreffe cardiaque [Roza et coll., 1989]. Bolton et ses collaborateurs ont quant à eux démontré que le transfert de cellules CD4+ issues d'un rat naïf, à un rat dépourvu de lymphocytes T (mutation « nude ») suffisait à entraîner le rejet d'une allogreffe rénale, tandis que le transfert de cellules CD8+ seules ne le permet pas [Bolton et coll., 1989]. Ces travaux montrent que les cellules T CD4+ sont nécessaires et suffisantes pour induire le rejet cellulaire d'organes vascularisés. Cependant, dans d'autres modèles d'allogreffe, notamment les greffes de peau, les cellules T CD8+ sont suffisantes pour induire le rejet [Rosenberg et Singer, 1992].

5.2. Les cellules T CD4+

5.2.1. La polarisation des cellules T CD4+

Lorsqu'elles sont activées, les cellules T CD4+ se divisent en deux sous-populations distinctes, appelées Th1 et Th2, chacune caractérisée par un profil particulier de production de cytokines [Mosmann et coll., 1986].

Activées lors de la reconnaissance de l'antigène, les cellules Th "naïves ou précurseurs" prolifèrent, sécrètent l'IL-2, et expriment le récepteur de l'IL-12 (IL-12R) ; elles deviennent ainsi des cellules Th0. La polarisation de la cellule Th0 en Th1 ou Th2 est elle-même déterminée par les cytokines : L'IL-12 secrétée par les macrophages et les cellules dendritiques CD8 α + permet une sur-régulation de IL-12R. La liaison de IL-12 à son récepteur conduit alors à l'activation de STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) qui initie le programme de différenciation Th1. La différenciation Th2 est due quant à elle à l'IL-4, produite par la cellule Th naïve elle-même et par les cellules dendritiques CD8 α -. D'une part, l'IL-4 sous-régule l'expression de IL-12R; d'autre part, la liaison à son récepteur exprimé à la surface des cellules Th0 permet l'activation de STAT6, initiant le programme de différenciation Th2. (fig. 9) [Maldonado-lopez et coll., 1999 ; pour revue Rengarajan et coll., 2000].

5.2.2. Le rôle des cellules CD4+ Th1/ Th2

Les fonctions des cellules Th1 et Th2 sont directement liées aux cytokines qu'elles produisent. Les cellules Th1 sécrètent les cytokines dites pro-inflammatoires telles que l'INF γ , l'IL-2, et le tumor necrosis factor β (TNF β) [Mosmann et coll. 1986]. Leur activation stimule une réponse immune de type cellulaire, avec notamment l'activation des monocytes/macrophages et des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les cellules Th1 sont ainsi impliquées dans les réactions inflammatoires de type hypersensibilité retardée médiées par les macrophages, avec libération par ces derniers d'agents cytotoxiques tels que le

monoxyde d'azote (NO), le $\text{TNF}\alpha$, ou des radicaux libres oxygénés [Tsicoploulos et coll., 1992]. Chez les rongeurs, les cytokines produites par les cellules Th1 stimulent également la synthèse, par les lymphocytes B, des immunoglobulines IgG2a de fixation au complément [Stevens et coll., 1988]. Les cellules Th1 peuvent aussi devenir elles-mêmes cytotoxiques en exprimant à leur surface la molécule Fas-Ligand (FasL). La liaison de FasL avec la molécule Fas, exprimée par la cellule cible, déclenche l'activation de la cascade des caspases qui conduit à la mort de la cellule cible par apoptose [Kagi et coll., 1996, pour revue Le Moine et coll., 2002].

La sous-population Th2 présente un profil anti-inflammatoire puisque les cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, et IL-13) sont de puissants inhibiteurs de la réponse Th1. Ces cytokines sont associées à une réponse de type humoral. Elles participent à l'activation des lymphocytes B et favorisent la production d'anticorps, particulièrement les IgG1 et les IgE [Mosmann et coll. 1986]. Elles interviennent dans la réponse allergique en favorisant la prolifération et l'activation des éosinophiles ainsi que la dégranulation des mastocytes [pour revue Mosmann et Coffman, 1989]. A la différence des cellules Th1, elles n'expriment pas FasL et ne sont donc pas impliquées dans des phénomènes de cytotoxicité directe.

Les cytokines produites par les deux sous-populations présentent des effets mutuellement inhibiteurs sur la prolifération et les fonctions de leur phénotype réciproque. Ainsi, l' $\text{INF}\gamma$ inhibe la prolifération des cellules Th2 [Gajewski et Fitch, 1988], alors que l'IL-10 inhibe la synthèse des cytokines de la sous-population Th1 [Conti et coll., 2003].

5.2.3. Les cellules T CD4+ régulatrices

A côté des sous-populations Th1 et Th2, différentes populations de cellules T CD4+ ont été décrites *in vivo* dans des modèles pro-inflammatoires. Ces cellules ayant un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules Th1 et Th2, elles sont qualifiées de régulatrices (Tr) et possèdent un rôle clé dans la régulation immune. Parmi ces cellules, deux groupes coexistent : les cellules cytokines-dépendantes, Th3 et Tr1, et les cellules CD4+CD25+ « naturelles » cytokines-indépendantes. La capacité anti-inflammatoire des cellules Th3 et

Tr1 repose sur un contrôle local de l'inflammation par leurs sécrétions respectives de tumor growth factor β (TGF β) et d'IL-10. Les cellules régulatrices CD4+CD25+, quant à elles, régulent la prolifération lymphocytaire par contact direct cellule-cellule [Foussat et coll., 2003 ; pour revue : Cottrez et Groux, 2004].

5.3. Les cellules CD8+

Comme les cellules Th, les lymphocytes CD8+ peuvent être divisés en deux sous-populations, Tc1 et Tc2, selon le microenvironnement cytokinique (fig. 10) La différenciation de la cellule CD8+ précurseur est induite selon le même modèle puisque l'IL12 et l'INF γ favorisent la différenciation en cellule Tc1, et l'IL-4, la différenciation en cellule Tc2. De même, chacune d'elles présente un profil de cytokines de type Th1/Th2: les cellules Tc1 sécrètent l'IL-2 et l'INF γ , alors que les cellules Tc2 produisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10. Seule l'IL-4, sécrétée par les cellules Tc2, présente une action inhibitrice sur les cellules Tc1. L'activité cytotoxique des deux sous-populations induit la mort par apoptose des cellules cibles, principalement par le mécanisme perforine/granzyme et plus faiblement par l'intermédiaire de la molécule Fas. [Carter et Dutton, 1995 ; pour revue : Mosmann et Sad. 1996].

6. L'ACTIVATION DES CELLULES T

6.1. La reconnaissance de l'antigène

6.1.1. Les deux types d'antigènes

Les tissus transplantés peuvent exprimer deux types d'antigènes : les antigènes mineurs et majeurs.

Les antigènes majeurs regroupent les molécules du CMH de classe I et II. Le large polymorphisme de ces molécules est responsable de la haute probabilité de disparités entre les molécules du CMH de deux individus étrangers. Les cellules T présentant un large répertoire leur permettant de reconnaître chacune de ces disparités, les antigènes du CMH représentent l'obstacle majeur à l'acceptation du greffon [Dausset, 1981 ; Sherman et Chattopadhyay, 1993 ; Erlich et coll.,2001].

Les antigènes mineurs, quant à eux, sont constitués de peptides présentés par les molécules du CMH de classe I ou II à la fois du donneur et du receveur. Ces peptides dérivent de protéines présentes, soit uniquement chez le donneur (par exemple les gènes dont l'expression est liée au sexe comme le gène masculin Y), soit à la fois chez le donneur et le receveur mais avec une différence constitutive de quelques acides aminés [Simpson, 1998].

6.1.2. L'engagement du TCR

Première étape de la réponse immune cellulaire T, l'activation des cellules T naïves, ou « priming », exige avant tout la reconnaissance spécifique de l'antigène par leur récepteur TCR. Elle a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, les ganglions lymphatiques et la rate, où les peptides antigéniques (Ag) sont présentés aux cellules T par les molécules du CMH exprimées à la surface des CPA [Lakkis et coll., 2000]. Le complexe

CMH-Ag est reconnu par les chaînes α et β du TCR. Celui-ci est dépourvu de fraction intracellulaire, mais il est associé de façon non-covalente à de nombreuses chaînes polypeptidiques qui forment un complexe protéinique transmembranaire, le CD3. Le CD3 suite à l'engagement du TCR, initie les signaux de transduction nécessaires à l'activation de la cellule T [Quian et Weiss, 1997].

6.1.3. Les voies de reconnaissance de l'antigène en transplantation

Les organes ou tissus transplantés expriment les molécules du CMH du donneur, ce qui conduit à deux voies possibles de reconnaissance de l'antigène: la voie directe et la voie indirecte. Dans la voie directe, les CPA du donneur sont activées par le phénomène d'ischémie-reperfusion suite à la transplantation du greffon. Elles peuvent migrer dans les organes lymphoïdes du receveur où les molécules du CMH de classe I et II qu'elles expriment seront reconnues respectivement par les cellules T CD8+ et CD4+ [Larsen et coll., 1990 ; pour revue : Lechler et coll., 2001]. Tandis que dans la voie indirecte, les CPA du receveur migrent vers le greffon, attirées par les chimiokines libérées par les cellules endothéliales de ce dernier, puis, elles digèrent *in situ* les antigènes du CMH du donneur en fragments peptidiques. Après migration de ces CPA vers les sites lymphoïdes, les fragments peptidiques sont alors présentés par les molécules de classe II aux cellules T CD4+ (fig. 11) [pour revue :Gould et Auchincloss, 1999 ; Le Moine et coll., 2002].

Ce premier signal délivré par le TCR est responsable de la spécificité de la réponse immune. Cependant il n'est pas suffisant pour induire l'ensemble des gènes spécifiques nécessaires à l'activation et la prolifération des cellules T. En effet, un second signal non spécifique de l'antigène est indispensable. Ce signal dit « de co-stimulation » résulte d'interactions entre les molécules de surface des cellules T et celles des CPA.

6.2. La co-stimulation

6.2.1. La voie CD28:B7

Le signal de co-stimulation est fourni par l'interaction entre deux glycoprotéines transmembranaires de la famille des immunoglobulines : la molécule CD28 exprimée à la surface des cellules T et les molécules B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86), localisées sur la membrane des CPA telles que les macrophages, les cellules dendritiques, des cellules B et des cellules T activées [Hathcock et coll., 1994 ; June et coll., 1994 ; Sharpe et Freeman, 2002]. Chez l'Homme, la molécule CD28 est exprimée de façon constitutive par les cellules T circulantes : par la majorité des cellules T CD4+ (95%), et seulement par 50% des cellules T CD8+. Chez la souris, tous les lymphocytes T (ganglionnaires, spléniques et circulants) expriment la molécule CD28, mais avec une expression moindre par les cellules CD8+ par rapport aux cellules CD4+ [Gross et coll., 1992]. Cette différence de distribution entre les cellules T CD4+ et CD8+ explique pourquoi certaines cellules T CD8+ agissent indépendamment de la co-stimulation, ou bien utilisent d'autres paires ligand-récepteur [Alegre et coll., 2001]. A l'inverse des molécules CD28, l'expression des molécules B7 à la surface des CPA est sur-régulée par l'activation cellulaire. Alors que B7-2, faiblement exprimée de façon constitutive, est rapidement sur-exprimée lors de l'activation, l'expression de B7-1, seulement inductible, est plus tardive [Hathcock et coll., 1994].

Cette interaction CD28/B7 est indispensable à l'activation cellulaire T. En absence de signaux de co-stimulation (par blocage de l'interaction CD28-B7 ou par absence d'expression de CD28), l'activation de la cellule T suite à la reconnaissance de l'antigène par le TCR avorte ; la cellule T entre, soit dans un état de non-réponse à la stimulation, appelé anergie [Gimmi et coll., 1993 ; Tan et coll., 1993], soit entre en apoptose [Noël et coll., 1996]. La co-stimulation *via* CD28 présente un rôle critique dans la réponse cellulaire T car elle favorise la prolifération lymphocytaire en augmentant la transcription et la stabilité de

l'ARNm de l'IL-2, facteur de croissance essentiel des cellules T [Jenkins et coll., 1991 ; Norton et coll., 1992]. Elle permet également d'augmenter la survie de la cellule T activée en induisant chez celle-ci une sur-expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L [Noël et coll., 1996 ; Boise et coll., 1995]. Cependant cette dernière fonction est controversée puisque Vella et ses collaborateurs ont montré que CD28 seul ne confère pas une survie prolongée aux cellules T activées chez la souris [Vella et coll., 1997]. Enfin, CD28 diminue le seuil d'activation des cellules T et rend ainsi ces dernières plus sensibles à la stimulation antigénique [Viola et Lanzavecchia, 1996].

Outre l'activation cellulaire T, l'interaction CD28-B7 exerce d'autres effets. Elle régule notamment la balance Th1/Th2. Certaines études ont montré que la différenciation des cellules CD4⁺ naïves vers le phénotype Th2 est strictement dépendante de la co-stimulation CD28/B7. *In vitro*, les expériences montrent qu'en absence de co-stimulation CD28, les cytokines Th2, IL-4, IL-5 et IL-10, ne sont pas produites alors que la production d'INF γ est induite [Rulifson et coll., 1997]. A l'inverse, d'autres expérimentations, menées dans des modèles de tolérance aux allogreffes, ont montré que le blocage de la voie CD28/B7 inhiberait la réponse Th1 et faciliterait l'émergence d'une réponse Th2 [Sayegh et coll., 1995]. Les différentes études menées dans des contextes de maladies autoimmunes concluent que le blocage de voie la CD28/B7 peut affecter la balance des cytokines Th1/Th2, soit pour protéger de la maladie, soit pour l'exacerber [pour revue : Salomon et Bluestone, 2001].

La voie de co-stimulation CD28/B7 est également impliquée dans la migration cellulaire et l'inflammation puisque l'engagement de CD28 peut sur- ou sous-réguler l'expression de certaines chimiokines comme par exemple MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α), qui contrôle la migration des macrophages en cas d'inflammation [Herold et coll., 1997].

Enfin, la co-stimulation CD28/B7 s'est révélée essentielle dans le développement et l'homéostasie des cellules immunorégulatrices CD4⁺CD25⁺ qui contrôlent les maladies autoimmunes [Salomon et coll., 2000].

6.2.2. La voie CTLA-4:B7

CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CD52) est une molécule dont la structure est homologue à celle de CD28 [Brunet et coll., 1988]. Comme CD28, CTLA-4 se lie aux récepteurs B7-1 et B7-2 mais avec une affinité beaucoup plus forte [Linsley et coll. 1991]. En revanche à la différence de CD28, son expression n'est pas détectée de manière constitutive à la surface des cellules T naïves. Elle est cependant rapidement sur-régulée lors de l'activation de ces cellules [Brunet et coll., 1987 ; Harper et coll., 1991 ; Krummel et Allison., 1995].

CTLA-4 est un récepteur dit inhibiteur puisque son interaction avec B7 fournit un signal négatif, inhibant la transduction des signaux activateurs induits par le TCR et CD28 (fig. 12), d'où l'inhibition de la synthèse d'IL-2 et de la progression du cycle cellulaire T [Krummel et Allison., 1995 ; Walunas et coll., 1996]. Cet effet inhibiteur de CTLA-4 sur la réponse cellulaire T est mis en évidence par la lympho-prolifération spontanée, massive et fatale observée chez la souris déficiente en CTLA-4 [Tivol et coll., 1995 ; Waterhouse et coll., 1995]. De plus, le blocage de CTLA-4 *in vivo* accroît l'immunité anti-tumorale et exacerbe les réactions auto-immunes [Leach et coll., 1996 ; Karandikar et coll., 1996 ; Perrin et coll., 1996]. CTLA-4 constitue ainsi un élément critique dans la régulation de l'activation lymphocytaire, impliquant notamment la régulation des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , IL-2 et TNF α), et donc l'homéostasie immunologique.

CTLA-4 intervient également dans le maintien de la tolérance du soi impliquant les cellules T régulatrices CD4+CD25+. En effet, CTLA-4 est exprimé de façon constitutive exclusivement par ces dernières, et joue un rôle essentiel dans leurs fonctions régulatrices, mis en évidence notamment dans le contrôle de l'inflammation intestinale ou de la gastrite auto-immune chez la souris [Read et coll., 2000 ; Takahashi et coll., 2000]. De plus, Chen et ses collaborateurs ont montré que l'engagement de CTLA-4 induit la sécrétion de la cytokine immunorégulatrice TGF β , impliquée dans les fonctions régulatrices des cellules CD4+CD25+ murines [Chen et coll., 1998].

CTLA-4 semble également intervenir dans la polarisation des cellules T CD4+ naïves [Masteller et coll., 2000]. Alors que la voie CD28/B7 favorise la différenciation Th2, l'engagement de CTLA-4 l'atténue en inhibant la production d'IL-4 par les cellules T naïves ; à l'inverse, il favorise la différenciation Th1, non pas en agissant sur la sécrétion de l'IL-12, mais en augmentant la production de TGF β 1 [Kato et Nariuchi, 2000]. D'après les travaux de Bour-Jordan et ses collaborateurs, CTLA-4 exercerait un rôle critique dans la différenciation des cellules T, non pas par la voie Th2 dépendante des cytokines, mais en contrôlant l'intensité du signal d'activation au niveau des facteurs de transcription NFAT [Bour-Jordan et coll., 2003].

6.2.3. Les autres voies de co-stimulation

Les voies CD28/B7 et CTLA-4/B7 sont les voies de co-stimulation des cellules T les mieux caractérisées, cependant, il existe deux autres récepteurs de la superfamille CD28 exprimés par la cellules T, les récepteurs ICOS 5 (inducible costimulatory molecule) et PD-1 (Programmed death-1), dont les fonctions dans la réponse immune font actuellement l'objet de nombreuses recherches. Par ailleurs, une nouvelle famille de molécules de co-stimulation a été découverte. Elles font partie de la superfamille du TNF et de ses récepteurs, et ses principaux membres sont les molécules CD40 et CD40L (CD40 ligand, CD154). (fig. 13)

a. La voie ICOS :ICOSL

Homologue de CD28, ICOS est une molécule de co-stimulation des cellules T, identifiée en premier lieu sur les cellules T humaines activées. En effet, l'expression de ICOS par les cellules T CD4+ et CD8+ n'est pas constitutive, mais seulement induite par l'activation du TCR, et sur-réglée par la co-stimulation *via* CD28 [Hutloff et coll., 1999 ; McAdam et coll.,2000]. ICOS est peut être exprimée par les cellules Th1 et Th2 durant la phase de différenciation et par les cellules B du rat mais non des autres espèces. Son récepteur, ICOSL (ICOS ligand, ou B7h), est quant à lui faiblement exprimé par les cellules hématopoïétiques mais son expression à la surface des macrophages, des cellules

dendritiques et de certaines cellules B, est sur-régulée sous l'influence de stimuli inflammatoires, tels que l'INF γ ou le TNF α [Swallow et coll., 1999 ; Aicher et coll., 2000]. Comparés aux effets de l'engagement de CD28, ceux de ICOS sur la prolifération des cellules T et la production d'IL-2 sont modestes. La co-stimulation *via* ICOS peut entraîner la production de faibles taux d'IL-2 qui restent insuffisants pour induire à eux seuls une réponse proliférative soutenue [Riley et coll., 2001]. En revanche, ICOS intervient dans les réponses effectrices Th1 et Th2 puisqu'il augmente la production de cytokines Th1 (INF γ) et Th2 (IL-4, IL-5), et induit plus particulièrement la production d'IL-10 [Hutloff et coll., 1999]. Ainsi, les deux voies de co-stimulation *via* CD28 et *via* ICOS sont synergiques puisque l'engagement d'ICOS augmente la prolifération lymphocytaire T, soutient la polarisation Th1/Th2, et peut ainsi réguler les réponses T CD4+, dépendantes ou non de CD28 [Kopf et coll., 2000]. Enfin, comme la co-stimulation *via* CD28, celle *via* ICOS est inhibée par l'engagement de CTLA-4 [Riley et coll., 2001].

b. La voie PD-1 :PDL

A la différence de CD28 et CTLA-4 dont l'expression est restreinte aux cellules T, PD-1 est une molécule de la superfamille CD28 exprimée par les cellules T CD4+ et CD8+ , par les cellules B et les cellules myéloïdes activées [Agata et coll., 1996]. Elle a deux ligands homologues à B7, PD-L1 et PD-L2 qui lui sont spécifiques et qui ne peuvent lier d'autres molécules de la superfamille CD28. L'engagement de PD-1 à PD-L1 ou PD-L2 inhibe la prolifération médiée par le TCR et la production de cytokine par les cellules T activées. Face à de faibles taux d'antigène, cette inhibition est très marquée même en présence d'une forte co-stimulation CD28/B7. En revanche, face à une haute concentration antigénique, PD-L1 et PD-L2 n'inhibent pas la prolifération T mais réduisent seulement la production des cytokines [Freeman et coll., 2000 ; pour revue Sharpe et Freeman, 2002].

c. La voie CD40 :CD40L

Exprimée de façon constitutive par les CPA telles que les macrophages, les cellules B, les cellules dendritiques et l'épithélium thymique, la molécule CD40 peut également être induite à la surface des cellules endothéliales et des fibroblastes. Son récepteur, CD40L (CD154), est seulement exprimé après activation sur les cellules T CD4+, quelques cellules T CD8+, les cellules NK et les éosinophiles. L'interaction CD40/CD40L présente un rôle majeur dans l'activation et la maturation des cellules B et des cellules dendritiques. Elle fournit des signaux de co-stimulation plus aux CPA qu'aux cellules T [pour revue : Larsen et Pearson, 1997]. Une telle co-stimulation augmentent la capacité des CPA à présenter l'antigène, et favorise considérablement l'activation cellulaire T. L'engagement de CD40 induit la sur-régulation de l'expression des molécules B7-1 et B7-2 à la surface des CPA ainsi que des molécules d'adhésion comme CD44 et ICAM-1 (intercellular adhesion molécule-1) [Kiener et coll., 1995]. Sur la cellule dendritique, l'interaction CD40/CD40L augmente la production d'IL-12, puissant inducteur de la différenciation Th1 [Cella et coll., 1996]. Avec les macrophages, elle augmente la production d'INOS (NO-synthétase inductible) et des cytokines pro-inflammatoires [Kiener et coll., 1995]. Une telle maturation des CPA accroît leur participation dans la réponse cellulaire T plus que la présentation antigénique et la co-stimulation. Enfin, l'engagement de CD40 génère des CPA qui sont capables d'activer les cellules CD8+ sans le recours des cellules T helper CD4+ [Ridge et coll., 1998]. (fig. 14)

7. LE BLOCAGE DE LA RÉPONSE CELLULAIRE PAR CTLA4-Ig

7.1. Les concepts d'immunosuppression conventionnels

Les deux dernières décennies témoignent d'un nombre considérable de découvertes et d'essais cliniques dans le domaine de l'immunosuppression en transplantation. Les drogues immunosuppressives les plus connues agissent généralement sur les phases précoces de l'activation cellulaire T. Parmi elles la ciclosporine A et le tacrolimus (FK506) empêchent chacun les cellules T de produire les cytokines indispensables à leur prolifération, dont la principale, l'IL-2 [Thervet et Legendre, 1998]. Le sirolimus (Rapamycine), quant à lui, bloque le signal de transduction induit par l'IL-2 et stoppe ainsi le cycle cellulaire T [Saunders et coll., 2001]. L'azathioprine et le mycophénolate de mofétil, tout deux inhibiteurs de la synthèse des purines, inhibent également la prolifération des cellules T [Thervet et Legendre, 1998]. Thérapies en expansion, les anticorps monoclonaux dirigés contre la cellule T, tels que l'anticorps anti-CD3, OKT3 (muromonab-CD3), agissent par déplétion des cellules T et blocage du TCR [Norman, 1995].

Bien que ces traitements soient responsables d'une amélioration considérable des taux de survie des greffons, ils se heurtent à deux problèmes majeurs. D'une part, l'immunosuppression apportée n'est pas spécifique des antigènes du donneur. Traités à long terme, les patients présentent un risque important de développer des infections opportunistes et/ou des tumeurs cancéreuses. Les effets secondaires indésirables non associés à l'action immunosuppressive sont également considérables. C'est le cas des effets néphrotoxiques de la ciclosporine et du sirolimus, ou les effets diabétogènes du tacrolimus. D'autre part, ces traitements qui suppriment la réponse immune, participent très peu à l'induction d'un état de tolérance (voir paragraphe suivant) vis à vis du greffon. L'incapacité des drogues actuelles à établir un tel état implique leur administration à vie. L'état de tolérance est souvent associé, et peut être maintenu, par des mécanismes régulateurs qui éliminent les dommages d'origine immune subis par les cellules du donneur.

Dans cette approche, l'immunosuppression globale obtenue avec les traitements actuels, inhibe également ces mécanismes régulateurs en même temps qu'elle prévient le rejet. Un tel échec dans l'induction d'une tolérance vis à vis du greffon se traduit alors par le rejet chronique et la perte de ce dernier [pour revue : Sayegh et Turka, 1998].

7.2. La tolérance : généralités

La tolérance en transplantation se définit par une acceptation à long terme, voire définitive, du greffon sans signe de rejet chronique et en l'absence de tout traitement immunosuppresseur. Elle est spécifique du donneur, c'est à dire le système immunitaire du receveur ne répond pas aux antigènes d'un donneur particulier, mais conserve ses capacités de réponse contre d'autres antigènes étrangers.

La tolérance centrale intervient au niveau du thymus, organe lymphoïde primaire, lors de la création d'un chimérisme. Le chimérisme thymique se définit par la présence de CPA du donneur dans le thymus, qui induisent, par sélection négative, l'élimination des clones T spécifiques des molécules du CMH du donneur.

La tolérance périphérique, ou extra-thymique, peut être induite selon plusieurs mécanismes qui ne sont pas exclusifs et sont difficiles à différencier en raison de caractéristiques communes : la délétion clonale, qui vise à induire la mort des cellules T matures par apoptose ; l'ignorance, définie par des cellules T potentiellement réactives mais qui ne répondent pas et restent inactives ; l'activité veto, caractérisée par la suppression spécifique des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ dirigés contre des antigènes donnés ; la déviation immune, consistant à dériver la réponse Th1 vers une réponse Th2 ; la suppression ou régulation, due à la présence de cellules régulatrices dont la caractérisation phénotypique et fonctionnelle fait l'objet de recherches intenses; et l'anergie clonale, définie par l'incapacité d'une cellule T à répondre à une stimulation antigénique.

7.3. L'anergie induite par CTLA4-Ig

L'anergie est caractérisée par l'incapacité de la cellule T à proliférer et à sécréter de l'IL-2, étapes cruciales pour induire une réponse effectrice suite à la reconnaissance de l'antigène par le TCR. Elle peut donc résulter de l'absence de signaux de co-stimulation indispensables à l'activation cellulaire T. Différents protocoles expérimentaux développés dans des modèles animaux ont permis d'étudier plusieurs mécanismes de blocage des voies de co-stimulation cellulaire T. Parmi ces mécanismes, le plus fondamental est le blocage de la voie de co-stimulation B7/CD28.

7.3.1. La protéine recombinante CTLA4-Ig

Linsley et ses collaborateurs ont construit une protéine chimérique soluble, appelée CTLA4-Ig, constituée du domaine extracellulaire de CTLA-4 fusionné à la partie Fc de l'IgG [Linsley et coll., 1991]. Cette molécule est un inhibiteur compétitif de CD28. Elle se lie aux molécules B7 avec une affinité 20 fois supérieure à CD28. Elle bloque ainsi le signal de co-stimulation CD28/B7, et par conséquent inhibe l'activation cellulaire T et la réponse immune. Au cours de l'évolution, les molécules B7 se sont assez bien conservées et bien que CTLA4-Ig soit construite avec la partie codante du CTLA-4 humain, cette protéine chimérique peut également se lier aux molécules B7 de rat et de souris, mais avec une affinité moindre [Wallace et coll., 1994, 1995]. Ainsi les effets inhibiteurs de CTLA4-Ig sur la réponse immune ont pu être testés *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux.

7.3.2. Les effets de CTLA4-Ig en allo et xéno-transplantation

Les études *in vitro* ont montré que CTLA4-Ig était capable d'inhiber la prolifération cellulaire T à plus de 95% lors de réactions lymphocytaires mixtes (MLR) [Liu et coll., 1992]. Ces résultats suggéraient que la réponse aux alloantigènes, au moins *in vitro*, nécessitait des signaux de co-stimulation *via* la voie CD28/B7. Il a ainsi été possible de déterminer si le blocage de la co-stimulation médiée par CD28 pouvait prévenir le rejet. La fraction Fc de l'IgG, conférant à la molécule CTLA4-Ig une longue demi-vie *in vivo*, il a été possible

d'atteindre des concentrations saturantes de la protéine chimérique dans le sérum des animaux pendant des périodes de longue durée. Ainsi, des injections quotidiennes de CTLA4-Ig pendant 7 jours suivant la transplantation ont permis d'observer le blocage du phénomène de rejet d'allogreffe cardiaque chez le rat [Turka et coll., 1992]. L'inhibition de la voie de co-stimulation CD28/B7 permettait alors de prolonger de façon significative la survie des allogreffes cardiaques. Le rejet ultime du greffon, chez tous les animaux, dont certains avaient été thymectomisés avant les transplantations, suggérait tout de même que les cellules T, présentes lors de l'administration du traitement, recouvraient plus tard leurs fonctions immunes. Parallèlement à ce travail, Lenschow et ses collaborateurs ont montré que CTLA4-Ig pouvait induire un état de tolérance vis à vis de xéno-greffes d'îlots pancréatiques chez la souris [Lenschow et coll. 1992]. Ces résultats opposés refléteraient les différences d'immunogénicité entre les allo et xéno-greffes, ainsi qu'entre les greffes d'organes vascularisés et non-vascularisés. Des stratégies utilisant CTLA4-Ig ont alors été mises en place afin d'induire la tolérance dans les modèles d'allogreffes d'organes. Les résultats ont indiqué qu'un retard d'administration de CTLA4-Ig de deux jours après la greffe était nécessaire, et qu'une administration unique de CTLA4-Ig couplée à une transfusion de splénocytes du donneur (« donor specific transfusion », DST) le jour de la greffe permettait d'obtenir une survie indéfinie du greffon chez tous les animaux [Lin et coll., 1993 ; Sayegh et coll., 1997]. Dès lors de nombreux protocoles d'injection de CTLA4-Ig dans les modèles d'allogreffe cardiaque, rénale, pulmonaire, hépatique, intestinale ou encore de greffe de peau ou d'îlots pancréatiques, menées chez le rat, la souris, ou le primate, ont décrit les effets bénéfiques du blocage de la voie CD28/B7 sur la survie du transplant [Levisetti et coll., 1997 ; Kurlberg et coll., 2000]. Cependant, CTLA4-Ig diffère dans son efficacité à prévenir le rejet ou à induire un état de tolérance des organes vascularisés transplantés chez le rat puisque, comme nous venons de le décrire, il empêche le rejet aigu des greffons cardiaques mais n'induit pas leur tolérance sans traitement adjuvant (DST). Pourtant, dans d'autres modèles de greffes vascularisées, une acceptation permanente du greffon est obtenue avec une seule injection de CTLA4-Ig. Ainsi, l'induction d'un état de tolérance par

l'administration retardée d'une dose unique de CTLA4-Ig a été rapportée dans les allogreffes rénales chez le rat, sans nécessité de DST [Sayegh et coll., 1995].

Une autre stratégie d'utilisation de CTLA4-Ig est de créer un micro-environnement local capable de moduler l'état d'activation des cellules immunes responsables du rejet de greffe. C'est pourquoi s'est développé le transfert de gènes de séquences codant pour des molécules immunosuppressives dans les organes transplantés. Comparée à l'administration systémique, la production locale et continue de composés biologiquement actifs pourrait augmenter leur biodisponibilité et permettre un traitement plus efficace. Les transfections d'organes vascularisés avec un adénovirus codant pour un CTLA4-Ig murin (AdCTLA4-Ig ; CTLA-4 murin et IgG humaine) se sont alors développées, et ont induit une prolongation indéfinie de la survie des allogreffes hépatiques et cardiaques [Olthoff et coll., 1998 ; Guillot et coll., 2000]. L'utilisation de l'AdCTLA4-Ig s'est étendue aux xéno-greffes puisque Feng et ses collaborateurs ont obtenu une prolongation de survie dose dépendante après l'infection d'îlots pancréatiques de rat greffés chez la souris diabétique [Feng et coll. 1999]. De même, le rejet de cardiomyocytes xénogéniques transfectés avec l'AdCTLA4-Ig est retardé [Li et coll., 2001]. (table 2)

7.3.3. Un autre mécanisme d'action de CTLA4-Ig : le blocage de la voie B7- tryptophane

L'indolamine 2,3 dioxygénase (IDO) est une enzyme intra-cellulaire qui catalyse la dégradation du tryptophane, acide aminé essentiel, dans la voie de la kynurénine [Taylor et Feng, 1991]. Elle est fortement exprimée de manière constitutive et ubiquitaire au niveau des poumons, du cerveau, de l'estomac de l'intestin et de l'épendyme, et plus faiblement dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires (rate, thymus, ganglions lymphatiques [Yoshida et coll., 1980]. Sous l'influence de certains médiateurs inflammatoires, tels que l'INF γ , son expression est sur-réglée dans les macrophages et les cellules dendritiques au niveau des sites inflammatoires [pour revue Mellor et Munn, 1999].

L'activité de l'IDO présente un rôle important dans la tolérance foëto-maternelle, puisque durant la grossesse son expression à l'interface foëto-maternelle par les cellules du syncytiotrophoblaste augmente, s'accompagne d'une diminution de la concentration systémique du tryptophane et empêche le rejet du foëtus. L'inhibition de l'IDO s'accompagnant d'une activation immune et de la perte du foëtus, Munn et ses collaborateurs ont mis en évidence le rapport étroit entre le catabolisme du tryptophane par les cellules exprimant IDO et l'induction d'une tolérance maternelle vis à vis du foëtus [Munn et coll., 1998]. Ce rôle immunosuppressif naturel de IDO a été étendu à un rôle biologique potentiel des CPA (macrophages et cellules dendritiques) dans la régulation de la réponse T *via* l'enzyme activée. Le catabolisme du tryptophane s'est alors révélé être un mécanisme de régulation de l'activité cellulaire T [Frumento et coll., 2002 ; Terness et coll., 2002].

Grohmann et ses collaborateurs ont récemment montré que l'interaction CTLA-4/B7, non seulement intervenait dans la régulation de la co-stimulation cellulaire T, mais permettait aussi de transduire des signaux intra-cellulaires chez la CPA [Grohmann et coll., 2002]. Ces signaux entraînent la synthèse et la sécrétion par la CPA d'INF γ qui active l'IDO par action autocrine. Cette activation permet de diminuer le taux de tryptophane nécessaire à la prolifération cellulaire T, tout en augmentant le taux de kynurénine qui induit la mort des cellules T par apoptose (Fig.15). L'inhibition clonale des cellules T ainsi obtenue mène à un état de tolérance fonctionnelle [Finger et Bluestone, 2002]. Le rôle de ligand de CTLA-4 pour B7 explique que la protéine CTLA4-Ig puisse également se comporter comme un ligand pour B7 et réguler le catabolisme du tryptophane, donc la prolifération cellulaire T [Grohmann et coll., 2002 ; Finger et Bluestone, 2002].

III. LE STATUT IMMUNITAIRE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Traditionnellement, le système nerveux central était présenté comme un site immunologiquement privilégié, mais depuis plusieurs années il est plutôt considéré comme un site immunologique spécialisé. Des réactions immunes ont lieu dans le SNC, mais elles présentent des caractères qui leur sont propres, dictés par une anatomie locale. En effet, le SNC présente des propriétés anatomiques spécifiques : premièrement, un isolement relatif dans l'organisme dû à la présence d'une véritable barrière structurale: la barrière hémato-encéphalique (BHE) ; deuxièmement, l'absence de véritable tissu lymphoïde organisé, ce qui génère un drainage lymphatique du parenchyme cérébral très particulier ; enfin, la présence restreinte des cellules présentatrices d'antigène dans des conditions physiologiques normales.

8. LA STRUCTURE ANATOMIQUE UNIQUE DU SNC

8.1. L'architecture du SNC

Le SNC, qui comprend le cerveau et la moelle épinière, est constitué de cellules neuronales et d'éléments non-neuronaux dont les cellules gliales représentées par la macroglie (astrocytes et oligodendrocytes), la microglie, la matrice et les vaisseaux sanguins. Protégés par les parois osseuses de la boîte crânienne et de la colonne vertébrale, le SNC est entouré de trois enveloppes conjonctives, la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère, qui constituent les méninges [pour revue : Ransohoff et coll., 2003].

Trois compartiments liquidiens, séparés par des structures cellulaires dénommées «barrières», se distinguent au sein du SNC : le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le liquide interstitiel qui baigne le parenchyme neuronal et glial. Le sang est séparé des deux autres compartiments majeurs du SNC, le parenchyme cérébral et le LCR, par la barrière hémato-encéphalique. Celle-ci est composée de trois entités. La barrière hémato-

liquidienne, entre le sang et le LCR, est située au niveau des plexus choroïdes et de l'arachnoïde. La barrière liquido-tissulaire, entre le LCR et le parenchyme nerveux, est constituée par l'épendyme et la pie-mère, et représente une interface très perméable. Enfin, la barrière hémato-tissulaire, entre le sang et le parenchyme cérébral, est constituée par les capillaires cérébraux. Le terme de BHE est plus couramment appliqué à cette dernière entité anatomique [pour revue : Jolliet, 2000].

Le LCR, appelé également fluide cérébro-spinal, est activement sécrété par l'épithélium des plexus choroïdes localisés dans les ventricules cérébraux. Il circule des ventricules vers l'espace subarachnoïdien situé entre la pie-mère et l'arachnoïde, puis est résorbé dans la circulation systémique au travers des villosités arachnoïdiennes qui se trouvent dans les sinus veineux des hémisphères cérébraux.

Dérivant des branches de l'artère carotide interne, le réseau artériel du parenchyme cérébral s'étend sur toute la surface cérébrale dans l'espace subarachnoïdien. Lorsqu'ils pénètrent le parenchyme cérébral, les vaisseaux sont initialement entourés par l'espace périvasculaire, également nommé espace de Virchow-Robin, connecté à l'espace subarachnoïdien. Le réseau artériel provient également d'une infiltration profonde des branches de l'artère carotide interne. [pour revue : Ransohoff et coll., 2003]. (fig. 16)

8.2. La structure et les fonctions de la BHE

Interface entre la circulation sanguine et le parenchyme cérébral, la BHE n'est pas une barrière simple, inerte et rigide. Au contraire, elle constitue un système biologique complexe et dynamique destiné au maintien strict de l'homéostasie du micro-environnement dans le parenchyme cérébral, essentiel pour une activité cérébrale normale. Ainsi la BHE protège le cerveau des composés neurotoxiques, des variations de la composition sanguine, et de la rupture du gradient de concentration entre le sang et le cerveau. Les fonctions de

cette microvasculature cérébrale proviennent de ses propriétés structurales et cytologiques particulières, distinctes de celles des microvaisseaux des tissus périphériques.

La BHE est constituée d'un endothélium microvasculaire et d'un environnement cellulaire spécifique du système nerveux central. Une monocouche de cellules endothéliales repose sur une lame basale continue limitée par la membrane basale. Le tout est enveloppé d'un manchon ininterrompu formé de prolongements astrocytaires jointifs. (fig. 17)

Les cellules endothéliales, type cellulaire majeur des microvaisseaux, présentent des caractères spécialisés à l'intérieur du SNC, qui leur confèrent un rôle important dans les fonctions biologiques essentielles du SNC, comme le transport des micro et macronutriments, le trafic leucocytaire et l'osmorégulation. Les capillaires cérébraux se distinguent des autres capillaires de l'organisme par l'absence de fenestration, et par la présence de jonctions intercellulaires serrées, hautement résistantes, de type *zonula occludens*. Ces jonctions cellulaires sont constituées de multiples composants assemblés en structures complexes entre deux cellules homologues. Les constituants majeurs de ces complexes sont deux polypeptides: l'occludine-1 et la claudine-1. Les autres protéines solubles concentrées aux jonctions serrées, les ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (Zonula Occludens proteins) et la cinguline, sont fortement associées au domaine carboxyl de l'occludine et relient celle-ci au cytosquelette d'actine des cellules endothéliales [Drewes, 1990 ; Huber et coll., 2001]. Constituant une véritable barrière anatomique, ces jonctions serrées limitent les flux paracellulaires de substances solubles entre les cellules endothéliales et contribuent ainsi à la régulation des échanges entre le SNC et la circulation. Des protéines membranaires permettent le transport sélectif de certaines substances et les échanges se font essentiellement par voie transcellulaire, en fonction de l'hydro ou de la liposolubilité de la substance. Ainsi les composés hydrosolubles et les ions sont largement exclus de la BHE et leur transit nécessite un transport actif. Les substances liposolubles passent plus aisément la barrière de façon passive, mais des mécanismes de transport actif existent également. Le premier transporteur le plus étudié est le transporteur de glucose GLUT-1 [Pardridge et coll., 1990], mais il existe d'autres transporteurs qui permettent les échanges

vitaminiques, hormonaux et protéiques entre le cerveau et le sang. La P-gp MDR (multidrug-resistance P-glycoprotein) est particulièrement importante dans l'endothélium du SNC et contribue à une détoxification permanente de SNC, notamment en modulant le transport de certaines molécules thérapeutiques comme la ciclosporine, la vincristine ou encore la doxorubicine [Tsuji et coll., 1993 ; Ohnishi et coll., 1995]. Selon un mécanisme encore mal connu, les astrocytes, principales cellules macrogliales du SNC, soutiennent un tel transport unique et restrictif au sein du SNC. Les pieds astrocytaires sont en contact avec la surface des vaisseaux sanguins mais restent séparés des cellules endothéliales par la membrane basale. Ils jouent néanmoins un rôle déterminant dans le maintien des propriétés de la BHE, qui perd son caractère étanche en leur absence.

Autre entité de la BHE, les plexus choroïdes représentent l'interface entre le sang et le LCR. Leur surface est constituée d'une couche monocellulaire de cellules épithéliales cuboïdes, dont la base repose sur le stroma choroïdien et dont les microvillosités apicales flottent dans le LCR. C'est au niveau de pôle apical que se situe la régulation des mouvements de l'eau, du sodium et du potassium. Les capillaires choroïdiens situés dans le stroma ne possèdent pas de jonctions serrées, mais sont fenêtrés comme ceux du reste de l'organisme. C'est pourquoi les cellules épithéliales sont unies, comme les cellules endothéliales des capillaires du parenchyme cérébral, par des jonctions serrées, empêchant les échanges passifs entre le LCR et le sang. Autre constituant isolant le sang du LCR, la membrane arachnoïde est quant à elle constituée de plusieurs couches cellulaires. Il existe également des jonctions serrées unissant en particulier les cellules de la couche la plus externe. Au niveau de ces deux sites de la BHE, le passage transcellulaire suit les mêmes règles que dans le parenchyme cérébral [pour revue : Grégoire, 1990].

9. LA CIRCULATION LEUCOCYTAIRE DANS LE SNC

L'immunosurveillance du SNC répond à deux sortes de signaux : des signaux afférents, du parenchyme cérébral vers les tissus lymphoïdes du système immunitaire périphérique, qui constituent un drainage lymphatique particulier propre au SNC, et, des signaux efférents caractérisés par le passage leucocytaire à travers la BHE vers le SNC.

9.1. Le drainage lymphatique du SNC cérébral

A l'inverse des organes périphériques drainés par la lymphe vers les ganglions lymphatiques, il n'existe pas, anatomiquement, de canaux lymphatiques définis dans le cerveau humain ou de rat. Pourtant, à l'origine de signaux antigéniques, des connections afférentes du système immunitaire périphérique avec le SNC existent par l'intermédiaire du LCR et du liquide interstitiel. Les protéines antigéniques solubles, présentes dans le liquide interstitiel baignant le parenchyme cérébral, sont drainées dans le LCR, à partir de la substance blanche à travers les cellules épendymaires ou à partir de la substance grise le long des canaux périvasculaires. Le LCR s'évacue ainsi dans les ventricules cérébraux et l'espace subarachnoïdien. A partir de l'espace subarachnoïdien, soit les antigènes pénètrent dans le sinus veineux via les villosités arachnoïdiennes et gagnent la circulation sanguine puis la rate, soit ils sont évacués dans l'espace tissulaire extracrânien par les prolongations de l'espace subarachnoïdien le long des nerfs craniaux (olfactif, optique, trigéminal et acoustique) afin d'atteindre les ganglions lymphatiques cervicaux profonds (fig. 18) [Kida et coll., 1995 ; pour revue: Cserr et Knopf, 1992 ; Ransohoff et coll., 2003]. A partir des ventricules cérébraux, les antigènes gagnent la circulation sanguine qui les conduit jusqu'à la rate. Ainsi, il semble que les protéines antigéniques présentes dans le SNC puissent rapidement accéder aux tissus lymphoïdes et stimuler alors une réponse cellulaire T spécifique de l'antigène [Widner et coll., 1988 ; de Vos et coll., 2002]. (fig. 18)

9.2. La migration leucocytaire dans le SNC cérébral

9.2.1. Le trafic leucocytaire à travers la BHE

La restriction du passage transendothélial (cf III.1.2.) est également étendue au passage des leucocytes et autres éléments cellulaires dans le SNC. Cependant, durant le développement normal du cerveau et lors d'états infectieux ou inflammatoires, certains leucocytes ont la possibilité d'envahir le parenchyme cérébral sans rupture apparente de la BHE [Perry et coll., 1997]. L'extravasation des leucocytes dans le SNC est régie par une séquence complexe d'évènements migratoires et adhésifs. Ce transit endothélial est orchestré, en grande partie, par des cytokines et chimiokines, qui régulent la perméabilité de l'endothélium [Marcus et coll., 1996], et qui renforcent les interactions spécifiques entre les molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales et leurs récepteurs présents à la surface des leucocytes [Mantovani et coll., 1997].

a. Les chimiokines

Dans le cerveau, les chimiokines sont sécrétées localement et majoritairement par les astrocytes, la microglie activée et les macrophages infiltrants [Dong et Benveniste, 2001 ; Hanisch, 2002]. Ce sont de petites protéines de 7 à 10 kD, caractérisées par des résidus cystéines très conservés reliés par des ponts disulfures intra-moléculaires. Elles sont classiquement réparties en trois groupes : les chimiokines C-C (chimiokines β), telles MIP-1 α , RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted) et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), qui ont deux résidus cystéines adjacents ; les chimiokines C-X-C (chimiokines α), comprenant entre autres, l'IL-8, GRO (growth related oncogen), IP-10 (INF γ inductible protein 10), MIP-2, et dont les deux cystéines sont séparées par un amino-acide [pour revue : Baggiolini et coll., 1994] ; et la famille des chimiokines C (chimiokines γ), représentée uniquement par la lymphotactine qui n'a qu'une cystéine NH₂-terminale. En général, les membres de la famille des chimiokines C-X-C sont chimioattractants et activateurs des polynucléaires neutrophiles, et ceux de la famille C-C

attirent et activent les monocytes, les lymphocytes, les éosinophiles et les basophiles [Howard et coll., 1996]. Quant à la lymphotactine, elle attire plus spécifiquement les lymphocytes [Kelner et coll., 1994 ; Kennedy et coll., 1995]. Une chimiokine découverte plus récemment, la neurotactine, ou fractalkine (chimiokine δ), a un profil unique de type C-X-X-X-C (trois amino-acides séparent les deux cystéines) [Pan et coll., 1997]. Cette dernière attire les neutrophiles. Son ARN messager est en majeure partie exprimé dans le cerveau, de façon constitutive par les neurones et après induction par les astrocytes. Outre son activité de chimiokine, elle est également impliquée dans la migration et l'activation des cellules microgliales, ce qui lui confère un rôle pro-inflammatoire [Maciejewski-Lenoir et coll., 1999].

Ainsi, en cas de foyer inflammatoire au sein du SNC, le développement du processus inflammatoire est relayé par une production de chimiokines. Leur expression par les cellules endothéliales peut alors aboutir à une rupture de la BHE et au recrutement de nombreux leucocytes circulants.

b. Les étapes du passage transendothélial

Première étape du transit endothélial, le roulement correspond au ralentissement des leucocytes circulants le long de la paroi endothéliale. Afin de ralentir les leucocytes poussés par le flux sanguin, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion, les sélectines, qui interagissent avec certaines structures glycosylées, comme la sialyl Lewis X (sLe^x), présentes à la surface des leucocytes. Les principales sélectines impliquées sont la E-sélectine (ELAM-1, endothelial cell leucocyte adhesion molecule), et la P-sélectine (CD62) [pour revue : Bevilacqua et Nelson, 1993 ; Springer, 1994]. Leur expression est rapidement induite, de quelques minutes pour la P-sélectine à quelques heures pour la E-sélectine, après une exposition à des cytokines telles le TNF α ou l'IL-1 [Kubes et Granger, 1994 ; Kerfoot et Kubes, 2002 ; Piccio et coll., 2002]. Ralentis le long de la paroi endothéliale, les leucocytes entrent en contact avec les chimiokines produites par les cellules endothéliales ou par le foyer inflammatoire sous-

jacent. Ces chimiokines déclenchent une augmentation rapide de l'affinité des molécules d'adhésion leucocytaires pour celles des cellules endothéliales, ce qui conduit à l'adhérence irréversible des leucocytes à l'endothélium [Lloyd et coll., 1996]. Ce contact induit une sur-expression des molécules d'adhésion (les CAMs) ainsi que la sécrétion de cytokines par l'endothélium [Lou et coll., 1996]. L'expression des CAMs, très faible de manière constitutive, est également fortement augmentée sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires, telles l'IFN γ ou le TNF α , sécrétées par les leucocytes activés [Fabry et coll., 1992 ; McCarron et coll., 1993 ; Marcus et coll., 1996].

Ce phénomène d'adhérence entre les leucocytes circulants et l'endothélium résulte de l'association étroite des molécules VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), exprimées à la surface des cellules endothéliales, avec leur récepteurs respectifs, les intégrines VLA-4 (very late antigen-4, integrin α 4) et LFA-1 (leucocyte function-associated molecule-1) présents sur les leucocytes [Marlin et Springer, 1987 ; Baron et coll., 1993 ; Tanaka et coll., 1993]. Etant reliées au cytosquelette de chacune des cellules et émettant des signaux intra-cellulaires, les intégrines et les CAMs permettent ensuite aux leucocytes de se tracter au travers des jonctions serrées de l'endothélium en dégradant localement la membrane basale [Adamson et coll., 1999]. Une fois parvenus dans l'espace sous-endothélial, les leucocytes poursuivent leur migration à travers le tissu (parenchyme cérébral, stroma choroïdien), guidés par l'existence d'un gradient interstitiel de chimiokines, jusqu'au site inflammatoire [pour revue : Lee et coll., 1999]. (fig. 19)

9.2.2. Les différentes voies de migration dans le SNC

a. Du sang au LCR par les plexus choroïdes

Cette première voie de migration des leucocytes dans le SNC suit la voie de formation du LCR qui contient environ 3000 leucocytes par ml. Comme nous l'avons décrit précédemment, les leucocytes peuvent traverser par diapédèse l'endothélium de la BHE. Ils

entrent ainsi dans le stroma des plexus choroïdes, traversent l'épithélium et pénètrent dans le LCR au niveau de son site de formation. Cette voie correspondrait à l'entrée des leucocytes dans le LCR dans des conditions physiologiques normales. Ce concept est soutenu par l'étude de Carrithers et ses collaborateurs, qui détectent, dans le stroma des plexus choroïdes et dans les méninges d'une souris saine, les lymphocytes marqués par un fluorochrome injectés 2 heures auparavant par voie intra-veineuse [Carrithers et coll., 2002]. Les leucocytes sont rarement détectés dans le LCR d'individus sains mais ils sont constitués très majoritairement de cellules T (environ 80%) [Svenningsson et coll., 1995]. Il est ainsi assuré qu'une réponse cellulaire T peut apparaître rapidement dans l'espace subarachnoïdien.

b. Du sang vers l'espace subarachnoïdien

Une seconde voie de drainage leucocytaire correspond au passage des leucocytes venant de l'artère carotide interne à travers les vaisseaux capillaires de la surface de la pie-mère, permettant leur entrée dans les espaces subarachnoïdien et périvasculaire de Virchow-Robin. Etant peuplée de cellules de la lignée des monocytes/macrophages, cette région périvasculaire est considérée comme l'un des sites probables d'interaction lymphocyte-CPA et donc d'immunosurveillance immune du SNC. Les études récentes analysant le roulement des leucocytes sur les capillaires à la surface de la pie-mère, montrent l'absence de cette première étape de la diapédèse chez la souris saine. En revanche le roulement et l'adhésion des leucocytes sont stimulés par l'induction d'une encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), modèle d'inflammation du SNC [Kerfoot et Kubes, 2002].

c. Du sang vers le parenchyme cérébral

Dans ce dernier cas, il est généralement admis que seuls les lymphocytes T préalablement activés peuvent traverser la BHE et la membrane basale et pénétrer ainsi dans le parenchyme cérébral à partir du flux sanguin, à l'inverse des cellules T naïves ou au

repos [Wekerle et coll., 1986 ; Hickey, 1999]. Cette extravasation de cellules T activées est assez lente et indépendante de la spécificité antigénique puisque Hickey et ses collaborateurs ont montré que les lymphocytes T activés *in vitro* de façon non spécifique peuvent pénétrer efficacement dans le SNC [Hickey et coll., 1991]. Non seulement ce passage est réservé à des cellules T activées mais il est également restreint à des situations pro-inflammatoires. En effet, des expériences récentes ont montré l'absence d'interaction entre les leucocytes et l'endothélium chez une souris saine. Des lymphocytes activés, spécifiques d'un neuroantigène, ne peuvent interagir avec l'endothélium vasculaire, à moins que les vaisseaux ne soient préalablement activés par injection de lipopolysaccharide (LPS) ou administration de $TNF\alpha$, agents hautement pro-inflammatoires [Piccio et coll., 2002]. Ces expériences supportent le concept selon lequel le transit des lymphocytes activés à travers l'endothélium cérébro-vasculaire « au repos » est très faible. Comme nous l'avons décrit précédemment (cf III.2.2.1.), ce trafic leucocytaire est régi par des cytokines et chimiokines produites par les cellules endothéliales et les cellules du parenchyme cérébral, qui guident la migration lymphocytaire vers le site inflammatoire dans le parenchyme cérébral.

10. LES CELLULES IMMUNOCOMPÉTENTES DU SNC

10.1. Les cellules microgliales

Représentant environ 10% de la population non neuronale du parenchyme cérébral, la microglie constitue une large population de cellules à potentiel de phagocytose d'origine mésenchymateuse [Lawson et coll., 1990]. Issues de la lignée mononucléaire des phagocytes, ces cellules entrent dans le SNC durant l'embryogenèse et sont impliquées dans l'élimination des cellules entrant en apoptose lors du développement du cerveau. A la différence des autres macrophages de l'organismes, elles expriment faiblement certaines molécules cytoplasmiques et membranaires, comme le CD14, le CD45 (« leucocyte common antigen »), le récepteur 3 du complément (C3R ou CD11b) et le récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines [Frei et coll., 1987 ; Ford et coll., 1995]. Durant la maturation cérébrale, elles adoptent à l'intérieur du parenchyme une morphologie et un phénotype particuliers [Perry et coll., 1985]. Dans des conditions « normales », les cellules microgliales sont très ramifiées, à l'exception de celles du corps calleux qui présentent une morphologie en « bâtonnets ». Elles n'expriment pas les molécules du CMH de classe I et l'expression des molécules du CMH de classe II est restreinte à quelques cellules microgliales, particulièrement au sein de la substance blanche humaine.

Malgré leur faible nombre et leur aspect de cellules quiescentes, les cellules microgliales sont très sensibles aux variations de leur microenvironnement et très réactives, notamment lors de lésions ou de réaction inflammatoire au sein du SNC. Elles sont considérées comme de véritables sentinelles du tissu cérébral. Elles peuvent être activées par un grand nombre de stimuli immunologiques ou non, qui induisent différents états d'activation, ce qui les transforment en phagocytes et en cellules pleinement actives. Leur activation en réponse à une lésion du SNC, consiste en un changement phénotypique vers le type amiboïde avec

hypertrophie cellulaire, la migration vers le site de lésion et l'acquisition de fonctions immunes [Kreutzberg, 1996 ; pour revue : Streit et coll., 1999].

10.1.1. La cytotoxicité et les effets protecteurs des cellules microgliales

Comme des phagocytes professionnels, les cellules microgliales sont capables de détruire les micro-organismes, de supprimer les débris potentiellement délétères, de promouvoir la réparation tissulaire puis de faciliter le retour à l'homéostasie. Deux principales voies permettent à la microglie activée d'être cytotoxique : par phagocytose impliquant un contact direct de cellule à cellule, ou par la libération de substances cytotoxiques. Activée, la microglie sur-exprime les récepteurs à la fraction Fc des immunoglobulines et au complément. Elle peut ainsi lyser les complexes immuns formés entre les anticorps et l'antigène, et opsonisés par le complément. Stimulée par des facteurs pro-inflammatoires, elle sécrète des substances cytotoxiques telles le NO, des radicaux libres oxygénés, des protéases, des dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandine) et des acides aminés excitateurs [Colton et Gilbert, 1987 ; pour revue : Banati et coll., 1993 ; Ajmone-Cat et coll., 2003]. Ces facteurs favorisent le rôle pro-inflammatoire des cellules microgliales en inhibant leur production de TGF β 1 et d'IL-10 et en favorisant leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-1, le TNF α , l'INF γ et l'IL-6 [Xiao et coll., 1996]. Elles apparaissent ainsi comme la source principale de cytokines dans le SNC [pour revue : Hanisch, 2002]. Elles interviennent ainsi dans l'initiation et l'entretien des réactions inflammatoires en stimulant notamment l'expression des molécules d'adhésion cellulaire à la surface des cellules endothéliales et des CPA [Cannella et Raine, 1995] mais également en sécrétant des chimiokines telles MIP-1 α et MCP-1 qui attirent les leucocytes circulant dans le SNC [Calvo et coll., 1996 ; pour revue : Hanisch, 2002].

Outre ses fonctions cytotoxiques, la microglie, très sensible aux variations d'homéostasie du tissu nerveux, peut également exercer un rôle protecteur et/ou réparateur. En cas de lésion neuronale, elle sécrète notamment des cytokines anti-inflammatoires (TGF β et IL-10), du plasmonigène, de la thrombospondine, et des facteurs neurotrophiques favorisant la réparation tissulaire du SNC comme le NGF ou le bFGF (basic fibroblast growth factor)

[Mallat et coll., 1989 ; Shimojo et coll., 1991 ; Nakajima et coll., 1992 ; Chamak et coll., 1994 ; Williams et coll., 1996].

10.1.2. Les fonctions immunes des cellules microgliales

Activée, la microglie présente une sur-régulation rapide des molécules du CMH, décrite dans de nombreux modèles. *In vitro*, l'expression des molécules du CMH II peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires telles l'INF γ [Frei et coll., 1987]. Elle est également détectée *in vivo* dans des modèles de neuropathologies inflammatoires ou infectieuses comme par exemple, la sclérose en plaque [Bo et coll., 1994] ou l'infection virale herpétique [Weinstein et coll., 1990], ainsi que suite à l'injection intrathécale d'INF γ [Vass et Lassmann, 1990]. La sur-expression, des molécules du CMH de classe II, mais également des molécules d'adhésion, telles LFA-1, ICAM-1, est ainsi le signe précoce de l'activation microgliale en réponse à une lésion du SNC. Dans les modèles inflammatoires d'EAE et de sclérose en plaques, la microglie exprime également les molécules nécessaires à la co-stimulation cellulaire T (cf II.2.2.), telles les molécules CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) et CD40 [Sato et coll., 1995 ; De Simone et coll., 1995 ; Gerriste et coll., 1996 ; Issazadeh et coll., 1998].

Sa capacité à phagocyter des particules antigéniques, à exprimer les molécules du CMH de classe II et les molécules de co-activation cellulaire T, confère à la microglie un statut de CPA et un potentiel immunologique extrêmement proche des CPA des tissus périphériques. De nombreuses études ont cherché à déterminer si la microglie peut se comporter comme une CPA. Il a été observé *in vitro* que la microglie activée par l'INF γ était capable de stimuler une prolifération cellulaire T (priming) et plus précisément une réponse T CD4⁺ puisque l'ajout d'anticorps anti-CMH de classe II inhibait la stimulation [Williams et coll., 1993 et 1994 ; Cash et Rott, 1994 ; Ford et coll., 1996]. La microglie activée serait probablement impliquée dans la réponse cellulaire T de type Th1. Tout d'abord, elle serait capable de sécréter la chimiokine MIP-1 α , puissant chimioattracteur et stimulateur des cellules Th1 [Karpus et Kennedy, 1997]. De plus, elle pourrait restimuler et réguler les réponses Th1 et Th2 [Aloisi et coll., 1998]. Sa capacité à sécréter l'IL-12, suite à une infection ou à une

première interaction avec des cellules TH1, pourrait favoriser la polarisation du phénotype Th1 des cellules T CD4+, préalablement activées dans les tissus lymphoïdes et ayant traversé la BHE pour migrer dans le parenchyme cérébral. Cela aurait pour effet une exacerbation de la réponse inflammatoire dans le SNC [Aloisi et coll., 1997 ; et pour revue : Aloisi et coll., 2000].

La capacité de la microglie à agir de même *in vivo* reste controversée. Après avoir observé que le SNC restait complètement « naïf » suite à l'injection de l'antigène BCG (bacille de Calmette et Guérin) directement dans le parenchyme cérébral, Perry et ses collaborateurs ont conclu que les cellules microgliales étaient incapables d'initier une réponse cellulaire T dans le parenchyme [pour revue : Perry, 1998]. Néanmoins, un rappel du BCG en périphérie déclenche une réaction inflammatoire dans le SNC [Perry, 2000]. Ces résultats n'excluent donc pas une stimulation secondaire des lymphocytes T activés ayant pénétré dans le SNC, et l'exacerbation de la réponse inflammatoire par les cellules microgliales du parenchyme cérébral.

10.2. Les astrocytes

Espèce majoritaire de la population gliale au sein du SNC, les astrocytes présentent des propriétés physiologiques importantes visant à maintenir l'homéostasie du SNC. Leurs caractéristiques anatomiques (prolongements multiples occupant la majeure partie des espaces séparant les neurones, et expansions sur la membrane des capillaires sanguins appelés pieds astrocytaires) leur confèrent un rôle d'intermédiaire dans les échanges métaboliques entre les neurones et le sang.

Le réseau astrocytaire réalise un système de transmission organisé qui se superpose au système neuronal et qui joue un rôle majeur dans la modulation de l'activité neuronale. Possédant une activité métabolique très élevée, les astrocytes exercent des fonctions neuroprotectrices grâce à la capture et au métabolisme du glutamate par la glutamine synthétase et protège les neurones de l'anoxie par la fixation du CO₂ par l'anhydrase

carbonique [Magistretti et coll., 1999]. Ils interviennent dans les fonctions neuronales notamment en libérant des facteurs neurotrophiques, en guidant la migration des neuroblastes, en contribuant au recyclage et au métabolisme de neurotransmetteurs [pour revue : Dong et Benveniste, 2001].

Les astrocytes contribuent également à l'intégrité structurale et fonctionnelle de la BHE (cf III.1.2.). Observant les effets d'une lésion du parenchyme cérébral chez des souris déplétées en astrocytes, Bush et ses collaborateurs ont démontré que ces cellules sont impliquées dans la régulation de trafic leucocytaire à travers la BHE, dans la réparation de celle-ci, dans la protection des neurones ainsi que dans la restriction de la croissance neuritique au niveau des zones de lésion du SNC. En effet, le tissu cérébral lésé déplété en astrocytes présente une infiltration des leucocytes circulants fortement augmentée, une absence de réparation de la BHE avec formation d'œdème, une dégénérescence neuronale et une croissance locale des neurites [Bush et coll., 1999].

Par leur position stratégique à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral et par leurs contacts étroits avec les neurones, les astrocytes répondent rapidement aux variations de l'environnement du SNC. Activés par l'administration de divers agents pro-inflammatoires comme des endotoxines bactériennes (LPS) ou des cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-1 β et le TNF α [Montero-Menei et coll., 1994], la principale réponse des astrocytes se traduit par une gliose réactionnelle. Elle est caractérisée par une hypertrophie des cellules et la sur-expression de macromolécules cytoplasmiques telles la GFAP (glial fibrillary acidic protein), ou la vimentine [Montero-Menei et coll., 1994]. Cet état, nommé astrogliose, est l'un des caractères communs aux atteintes du SNC, qu'elles soient traumatiques ou neurodégénératives [Hatten et coll., 1991].

Le rôle des astrocytes dans la présentation antigénique et l'activation d'une réponse cellulaire T est encore très discuté. Stimulés *in vitro* par les cytokines pro-inflammatoires, INF γ ou TNF α , ils expriment les molécules du CMH de classe II [Vidovic et coll., 1990 ; Panek et coll., 1994], ainsi que les molécules d'adhésion ICAM-1 et LFA-3 [Frohman et coll. ; 1989; Satoh et coll. 1991 ; Williams et coll., 1993 ; Shrikant et coll., 1994]. Cependant,

lors de l'administration intra-cérébrale de LPS chez le rat, les molécules du CMH de classe II ne sont pas détectées à la surface des astrocytes participant à la gliose réactionnelle [Montero-Menei et coll., 1994]. Dans le contexte inflammatoire de sclérose en plaques chez l'homme, Bo et coll. ont également observé l'absence d'expression des molécules du CMH II sur les astrocytes, alors que Traugott et Lebon avaient auparavant détecté leur présence [Bo et coll., 1994 ; Traugott et Lebon, 1988]. De même, l'expression des molécules de co-stimulation B7 à la surface des astrocytes est très discutée. *In vitro*, Satoh et ses collaborateurs n'ont pas détecté l'expression des molécules B7 sur les astrocytes humains même après activation par l'INF γ [Satoh et coll., 1995]. Chez le rongeur, Nikceвич et ses collaborateurs ont montré que les molécules B7-2 semblent être exprimées de façon constitutive par les astrocytes murins et que cette expression est sur-réglée sous stimulation par l'INF γ , qui induit en même temps l'expression de B7-1 [Nikceвич et coll., 1997]. L'équipe de Soos a montré que l'expression de B7-1 sous stimulation par l'INF γ est détectée très tardivement par rapport à l'expression précoce de B7-2 ; pourtant dans le même contexte, Aloisi et ses collaborateurs n'ont décelé ni B7-1 ni B7-2 [Aloisi et coll., 1998 ; Soos et coll., 1999]. *In vivo*, les informations rapportées sont également contradictoires. Dans le modèle d'EAE chez le rongeur, Cross et Ku n'ont pas observé d'expression de B7-1/2, à l'inverse d'Issazadeh et ses collaborateurs qui ont montré une expression de B7-2 pendant la phase aiguë, et de B7-1 durant la période de rémission [Issazadeh et coll., 1998 ; Cross et Ku, 2000].

Selon Matsumoto et ses collaborateurs, les astrocytes, en exprimant seulement les molécules du CMH II sans délivrer les signaux de co-stimulation, ne seraient pas capables d'induire une prolifération lymphocytaire T et devraient au contraire favoriser l'anergie des cellules T CD4+, voire leur apoptose [Matsumoto et coll., 1992 ; Cash et Rott, 1994]. Cependant, selon Aloisi et ses collaborateurs, les astrocytes sont de très faibles activateurs de la réponse Th1 mais seraient, autant que la microglie, capables de stimuler une réponse Th2 associée à la sécrétion d'IL-4, et inhiberaient alors la réponse inflammatoire [Aloisi et coll., 1998]. Dans des conditions inflammatoires, les astrocytes pourraient produire certains

facteurs inhibant la réponse lymphocytaire : c'est notamment le cas du TGF β , les interleukines IL-6 et IL-10 [Van Wagoner et Benveniste, 1999]. Ils seraient ainsi capables d'inhiber la sécrétion d'IL-12 par les cellules microgliales et donc d'inhiber la réponse Th1 en faveur d'une polarisation Th2 [Aloisi et coll., 1997]. Toutefois, il a également été montré que les astrocytes pourraient sécréter des lymphokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF α ainsi que des chimiokines telles la MCP-1 [pour revue : Xiao et Link, 1998 ; Dong et Benveniste, 2001]. Leur rôle précis est donc difficile à établir d'autant que les astrocytes situés dans des aires cérébrales distinctes semblent avoir des propriétés différentes. Enfin, même s'ils sont incapables d'initier une réponse proliférative T primaire, les astrocytes pourraient jouer un rôle dans les réponses secondaires, notamment par la sécrétion de cytokines et de chimiokines dans les états inflammatoires.

10.3. Les cellules endothéliales microvasculaires

Les cellules endothéliales occupent une position anatomique stratégique dans la réponse immunitaire du SNC, puisqu'elles sont localisées à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral. Elles sont ainsi les premières cellules en contact avec les cellules T activées circulantes.

D'une façon générale, les cellules endothéliales de la BHE expriment de façon constitutive les molécules du CMH de classe I [Hoftberger et coll., 2004]. Stimulées *in vitro* par des cytokines pro-inflammatoires comme l'INF γ , elles sont capables d'exprimer les molécules du CMH de classe II ainsi que les molécules de co-stimulation B7 [Jemison et coll., 1993 ; Prat et coll., 2000]. Placées dans un environnement inflammatoire, elles pourraient alors présenter l'antigène aux cellules T. Cependant, Prat et ses collaborateurs ont montré que, lorsqu'elles sont stimulées par l'INF γ *in vitro*, les cellules endothéliales de la BHE ne sont pas capables d'induire une prolifération cellulaire T [Risau et coll. 1990 ; Prat et coll., 2000]. *In vivo*, certaines études, menées dans des contextes inflammatoires du SNC chez l'homme et chez le rongeur, ont montré une expression très faible des molécules du CMH de classe

II, ce qui tempère le rôle potentiel de CPA des cellules endothéliales de la BHE [Bo et coll., 1994 ; Hart et Fabry, 1995].

Outre leur participation au trafic leucocytaire à travers la BHE (cf : III.2.2.b.), les cellules endothéliales peuvent intervenir dans les réactions immunes et inflammatoires en produisant elles mêmes des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, comme l'IL-1 et l'IL-8 [Fabry et coll., 1993 ; Bourdoulous et coll., 1995 ; Mantovani et coll., 1997]. Etienne et ses collaborateurs ont montré que l'engagement des molécules du CMH de classe II des cellules endothéliales est directement couplé à leur production d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire [Etienne et coll., 1999]. A l'inverse, elles seraient également capables de réduire la réactivité cellulaire T par la production de facteurs solubles (TGF β) et l'expression des récepteurs impliqués dans l'apoptose cellulaire (Fas, TRAIL) [pour revue : Prat et coll., 2001]. Néanmoins, la participation des cellules endothéliales à la réponse immune reste principalement caractérisée par leur rôle dans la perméabilité de la BHE et dans le passage des lymphocytes dans le parenchyme cérébral.

10.4. Les macrophages périvasculaires

Les macrophages périvasculaires, qui se distinguent de la microglie par leur position et leur morphologie, résident à l'intérieur de la membrane basale limitant l'endothélium [Graeber et coll., 1992]. Comme les cellules microgliales, ils participent au trafic leucocytaire à travers la BHE en libérant des cytokines vasoactives (IL-1 β et TNF α) et des protéases dégradant la matrice [Williams et coll., 1997].

Rapidement renouvelés par les monocytes circulants issus de la moelle osseuse, les macrophages périvasculaires sont des CPA potentielles. Leur localisation stratégique entre l'endothélium et le parenchyme cérébral favoriserait la présentation antigénique aux cellules T lors de leur pénétration dans le parenchyme cérébral [pour revue : Becher et coll., 2000]. Ils sont principalement connus pour être doués de phagocytose, condition préalable pour la capture de l'antigène [Mato et coll., 1996]. En outre, les macrophages périvasculaires

expriment de manière constitutive les molécules du CMH I et II [Graeber et coll. 1992 ; Hoftberger et coll., 2004] et la molécule de co-stimulation B7-2 [Walker et coll., 1999]. L'expression de B7-1 nécessite quant à elle des conditions inflammatoires [Walther et coll., 2001]. Dans le modèle d'EAE chez le rat, Ford et ses collaborateurs ont montré, qu'à la différence des cellules microgliales, ils pouvaient supporter significativement la prolifération des cellules T CD4+ réactives à la MBP (myelin basic protein, antigène inducteur de l'EAE) [Ford et coll. 1995]. De plus, Tran et ses collaborateurs ont montré dans ce modèle que la déplétion en macrophages périvasculaires s'accompagne d'une accumulation des lymphocytes T dans l'espace périvasculaire sans infiltration dans le parenchyme, et de l'inhibition des premières étapes l'EAE [Tran et coll.,1998]. Les macrophages périvasculaires peuvent donc présenter un rôle de CPA compétentes dans l'environnement de la BHE et constituer, lors de l'infiltration leucocytaire dans le parenchyme, un élément déterminant dans le déroulement de la réponse immune.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

OJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

La généralisation des techniques de transplantation intra-cérébrale en clinique nécessitera des quantités croissantes de cellules fœtales humaines. Dans ce contexte, nous avons entrepris d'étudier une source potentielle de neurones fœtaux : le porc. Cette source présente différents avantages. Chaque portée fournit un nombre important de fœtus. Leurs neurones présentent un développement assez lent comme chez l'homme, et sont capables d'émettre des axones de grande taille susceptibles de reconstituer une cytoarchitecture normale dans le cerveau du rat [Isacson et Deacon, 1996]. De plus il a été montré que l'implantation dans le striatum de cellules embryonnaires issues du mésencéphale ventral porcin conduisait à une restauration de l'apport en dopamine dans cette structure et à une récupération fonctionnelle dans le modèle animal rat de la maladie de Parkinson [Galpern et coll., 1996]. L'utilisation de neurones embryonnaires porcins semble donc possible. Cependant, une difficulté majeure est le rejet immunologique du xénogreffe. Le SNC possède un statut immunitaire particulier, résultant de l'étanchéité relative de la barrière hémato-encéphalique, de l'absence de drainage lymphatique conventionnel et de cellules présentatrices d'antigènes "professionnelles" (APC), ou encore de l'expression limitée des antigènes du CMH de classe I ou II. Néanmoins, en dépit de ces propriétés, les xénogreffes de neurones sont généralement rejetées.

La réaction de rejet des cellules embryonnaires porcines greffées dans le striatum de rat s'accompagne d'un recrutement des cellules T, mais les voies de reconnaissance et d'activation de la réponse cellulaire T lors de greffes intra-cérébrales sont encore mal connues et nous amènent à de nombreuses questions. Quelles sont les cellules, du donneur et /ou du receveur, capables d'initier une réponse immune primaire par la présentation antigénique aux cellules T naïves ? Une présentation antigénique dans les

ganglions lymphatiques périphériques peut être envisagée, mais selon l'origine des CPA, est-elle directe ou indirecte ? L'expression des molécules du CMH par les cellules neuronales xénogéniques après implantation est en principe temporaire. C'est pourquoi la reconnaissance primaire des neurones ne semble pas suffisante pour entraîner leur rejet observé plusieurs semaines après l'implantation. Existe-t-il alors une réponse secondaire impliquant la présentation d'autres antigènes aux cellules T qui auraient été activées lors de la reconnaissance primaire ?

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié et comparé la réaction immunitaire dans deux situations de greffes intra-cérébrales dans le striatum du rat : la transplantation de neurones porcins issus du tissu embryonnaire et donc encore immature, et la greffe de cellules endothéliales aortiques porcines purifiées et qui sont parfaitement différenciées. Etant donné l'implication majeure des cellules endothéliales dans les rejets hyper-aigu et retardé des xéngreffes d'organes vascularisés, nous avons également analysé l'immunogénicité de la suspension neuronale embryonnaire afin de tenter d'expliquer le rejet tardif des neurones et comprendre le mécanisme de reconnaissance antigénique à l'origine de ce rejet.

Le rejet des neurones étant associé à une infiltration lymphocytaire T CD4+ massive, nous avons envisagé une stratégie immunosuppressive dirigée contre la réponse cellulaire T. Une des voies de blocage spécifique de l'activation des cellules T cible les molécules de costimulation. L'interaction CD28/B7 est particulièrement intéressante car elle constitue la voie de costimulation majeure de l'activation des cellules T CD4+, et son inhibition provoque leur anergie locale. Un tel blocage peut être effectué grâce à la molécule chimérique soluble CTLA4-Ig.

Afin d'évaluer l'intérêt d'une production locale de CTLA4-Ig sur le rejet des neurones fœtaux, nous avons entrepris au laboratoire de produire une lignée transgénique porcine exprimant la molécule immunosuppressive sous le contrôle d'un promoteur neuronal. Un transgène

d'origine humaine a été choisi en vue d'une application clinique ultérieure en cas d'immunosuppression significative.

A partir des lignées porcines obtenues par transgénèse, nous avons étudié la capacité des neurones transgéniques porcins à produire CTLA4-Ig tant *in vitro* qu'*in vivo*. Nous avons ainsi analysé l'expression neuronale de CTLA4-Ig au sein du cerveau porcin, puis la capacité des neurones embryonnaires porcins à exprimer CTLA4-Ig après implantation dans le striatum de rat.

TRAVAIL DE THESE

Première Partie

Facteurs immunogènes majeurs, les antigènes du CMH sont peu abondants dans le SNC adulte et embryonnaire. Cependant, lors des transplantations intra-cérébrales, ils sont momentanément exprimés non seulement par les cellules du SNC du receveur, mais également par les cellules du donneur, y compris les neurones. En effet, il existe une expression temporaire des molécules du CMH de classe I sur les neurones après leur implantation [Neumann et coll., 1995, 1997], dont le masquage par des anticorps appropriés paraît prolonger la survie d'une xéngreffe [Paksaban et coll., 1995]. Cette expression des molécules du CMH peut être influencée par les cytokines inflammatoires, comme l'INF γ et le TNF α , suite au traumatisme lié au geste chirurgical. Ce phénomène se produit aussi bien lors de greffes syngéniques non rejetantes que lors de greffes allo ou xénogéniques [Duan et coll., 1995]. Par ailleurs, le tissu embryonnaire isolé de structure comme le mésencéphale ventral contient certes des neuroblastes plus ou moins différenciés, mais également des astrocytes, des cellules microgliales et endothéliales, ainsi que leurs précurseurs respectifs. D'une part, ces types cellulaires expriment diverses protéines et glycolipides qui peuvent être dégradés en antigènes et présentés par les CPA du receveur. D'autres part, elles peuvent exprimer les antigènes du CMH sous l'effet du traitement par la trypsine et les chocs thermiques durant la préparation des cellules neurales embryonnaires porcines. Ainsi, après dissociation du tissu et mise en culture primaire, une sur-expression des molécules du CMH de classe I est observée sur les cellules gliales (astrocytes et microglie) ainsi qu'une sur-expression des molécules de classe II sur certaines cellules microgliales [Brevig et coll., 1999]. Ainsi, une fois dissocié et greffé, le tissu neural embryonnaire peut présenter une certaine immunogénicité. Il a ainsi été montré que les cellules microgliales pouvaient induire une prolifération lymphocytaire T *in vitro* (paragraphe III.3.1.2.). Un autre type cellulaire susceptible d'induire une réaction de rejet et dont l'immunogénicité a été moins étudiée est la cellule endothéliale embryonnaire. Son implication dans la réponse immune est fort possible puisque, *in vitro*, les cellules endothéliales aortiques porcines (PAEC) expriment de

manière constitutive les molécules du CMH de classe I et le récepteur B7-2 indispensable à l'activation cellulaire T. Elles peuvent aussi être directement reconnues par les cellules T humaines et induire en conséquence la prolifération des lymphocytes T CD8+ [Murray et coll., 1994]. De plus, elles répondent à la présence de cytokines pro-inflammatoires par l'expression des molécules du CMH de classe II et peuvent ainsi induire alors une prolifération cellulaire T CD4+ [Batten et coll., 1996].

Il semble ainsi que l'expression des molécules du CMH sur les cellules greffées pourrait définir pour une large part, le degré d'immunogénicité du xénotransplant et influencer par conséquent sur la cinétique et le déroulement de la réaction de rejet.

Nos travaux de recherche ont alors été orientés sur la participation des cellules endothéliales microvasculaires dans le rejet des xénotransplants. Afin de comprendre le rôle potentiel de ces dernières dans le rejet des neurones fœtaux, nous avons cherché à comparer la cinétique de rejet des PAEC, fortement immunogènes, à celle des suspensions neurales issues de tissu mésencéphalique fœtal porcin, ainsi que la réponse immune du receveur dans les deux cas.

Afin d'évaluer la participation des cellules endothéliales microvasculaires embryonnaires dans le rejet des neurones embryonnaires, nous avons étudié la réponse immune et la cinétique de rejet des PAEC, fortement immunogènes, greffées dans le striatum de rat Lewis 1A. Puis nous les avons comparées à celles du rejet des suspensions neurales issues de tissu mésencéphaliques embryonnaire porcin.

- PREMIERE PUBLICATION -

Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain.

Rémy S., Canova C., Daguin-Nerrière V., **Martin C.**, Melchior B., Neveu I., Charreau B., Soullillou J-P., and Brachet P.

Xénotransplantation 2001; 8 : 1-14

Les réponses cellulaires induites dans le cerveau du rat après transplantation des PAEC et des PNEU (porcine neuron) diffèrent à la fois dans leur cinétique et dans la nature des cellules impliquées. Alors que les neurones porcins sont rejetés en 3 à 4 semaines post-greffe, le processus de rejet des cellules endothéliales est beaucoup plus rapide. Il débute dès le 3^{ème} jour et s'achève aux alentours du 14^{ème}. Dès le premier jour suivant la greffe, les PNEU font l'objet d'une infiltration macrophagique qui décroît rapidement. Ce n'est qu'à partir de 3 semaines que le rejet apparaît, caractérisé par l'infiltration massive du greffon par des lymphocytes T et des macrophages. Ce profil de rejet des neurones porcins confirme de précédentes observations [Duan et coll., 1995]. Les PAEC sont, quant à elles, rapidement infiltrées par les macrophages, mais à l'inverse des greffes de PNEU, ceux-ci demeurent présents jusqu'au rejet total des PAEC dans lequel les lymphocytes T ne semblent pas intervenir. Ces résultats suggèrent la participation majeure des macrophages, comme observé par Czech et ses collaborateurs. En effet, ceux-ci n'avaient pas pu prévenir le rejet de cellules endothéliales bovines greffées dans le cerveau alors que les rats receveurs étaient soumis à un traitement immunosuppresseur dirigé contre la réponse T (ciclosporine A, CsA) [Czech et coll., 1997]. Une participation similaire des macrophages a été rapportée par Wennberg et ses collaborateurs après une xéno greffe d'îlots pancréatiques sous la capsule rénale. Ils avaient observé que le rejet se faisait en présence d'une majorité de macrophages ED1 et ED2 positifs, alors que l'infiltration des allogreffes mobilisait des cellules T. Dans cette étude, la CsA n'avait pas prévenu le rejet de la xéno greffe, tandis qu'elle avait exercé un effet protecteur dans le cas des allogreffes [Wennberg et coll., 1997].

Deux semaines après l'implantation, alors que les PAEC ont disparu du striatum hôte, les neurones foétaux ne montrent aucun signe de rejet. Une première explication face à une telle différence est que l'endothélium, contrairement aux neurones, est caractérisé par une

expression constitutive des antigènes de surface tels que les molécules du CMH de classe I (cf III.3.3.). La forte immunogénicité de l'endothélium est d'autant plus importante que les tissus transplantés sont d'origine centrale et embryonnaire, alors que les PAEC, d'origine périphérique, sont dérivées d'animaux post-natals et ont été amplifiées *in vitro*. De plus, après activation par de nombreux stimuli pro-inflammatoires, les PAEC ont la possibilité de sécréter plusieurs types de chimiokines impliquées dans le recrutement des macrophages comme la MCP-1 [Sica et coll., 1990]. Les macrophages eux-mêmes peuvent ensuite amplifier leur propre recrutement par sécrétion de chimiokine telle MIP-1 [Gourmala et coll., 1999]. Il semble donc qu'un dialogue entre les PAEC et les macrophages contribue à maintenir un contexte pro-inflammatoire marqué. Cet état peut être initié par le traumatisme consécutif à l'acte chirurgical, mais il peut aussi résulter d'une situation non-physiologique. En effet, au sein de notre équipe de recherche, Benoît Melchior a mis en évidence une production importante et rapide d'IL-8 par les PAEC dès la première heure suivant leur implantation et durant les 24 heures suivantes. Cette expression n'a pas été retrouvée, ni dans les xénogreffes de neurones, ni chez les animaux ayant seulement subi l'opération chirurgicale sans implantation de cellules (rat « sham »). Une investigation plus poussée a permis par la suite de montrer que les étapes de trypsination lors de la mise en suspension des PAEC et leur attente durant deux heures dans la glace avant la greffe induisent l'expression d'IL-8. Une expression comparable a été observée chez des PAEC en culture après un traitement de 4 à 24 heures avec une dose de TNF α humain de 100 unités/ml. Cependant un tel stress avant la greffe n'est sans doute pas suffisant pour induire la mort massive des PAEC observée juste après leur implantation, car l'allotransplantation de cellules endothéliales cardiaques de rat n'est pas suivie d'une telle mort (résultats non publiés), et ce, en accord avec Quinonero et ses collaborateurs, qui ont décrit une survie à long terme des greffes intra-striatales d'une lignée endothéliale d'origine centrale [Quinonero et coll., 1997].

Le rejet des greffes de PNEU est beaucoup plus tardif que celui des PAEC, et ce rejet peut être accéléré par l'addition de cellules immunogènes [Duan et coll., 1997b]. A l'inverse, la déplétion des cellules microgliales avant la greffe permet d'obtenir une suspension de cellules qui ne provoque plus la prolifération cellulaire des lymphocytes T CD4+ *in vitro*. Après son implantation dans le cerveau, cette suspension cellulaire est rejetée beaucoup plus lentement, prolongeant ainsi le bénéfice fonctionnel de la greffe chez le rat hémiparkinsonien immunocompétent. La technique de déplétion consistait à traiter le tissu mésencéphalique après sa dissociation avec du complément et des anticorps dirigés contre l'épitope α Gal [Brevig et coll., 2001]. Ce pré-traitement n'est cependant pas exclusivement dirigé contre les cellules microgliales, et il est probable qu'il puisse réduire l'immunogénicité du tissu neural également en neutralisant les éventuelles cellules endothéliales embryonnaires, puisqu'en présence de complément, l'anticorps anti-Gal α 1,3Gal est cytotoxique pour les cellules endothéliales [Sumitran et coll., 1999a]. Afin d'évaluer l'implication des cellules endothéliales embryonnaires dans le rejet des cellules mésencéphaliques porcines, nous avons recherché et suivi leur présence avant et après la greffe dans le cerveau du rat, en utilisant notamment un anticorps dirigé spécifiquement contre l'intégrine β 1 porcine.

- DEUXIEME PUBLICATION -

Beta-1 integrin as a xenoantigen in fetal porcine mesencephalic cells transplanted into the rat brain.

Martin C., Melchior B., Nerrière-Daguin V., Naveilhan P., Souillou J-P., and Brachet P.

Article soumis en 2004



Les cellules microvasculaires sont détectées au sein du tissu embryonnaire mésencéphalique par le marquage de l'intégrine porcine $\beta 1$, essentiellement exprimée par les cellules endothéliales, associé au marquage du CD31, qui est une molécule d'adhésion spécifiquement exprimée par l'endothélium. La morphologie tubulaire des structures ainsi marquées par immunohistochimie est caractéristique de microvaisseaux et leur caractère endothélial est soutenu par la détection de l'épitope αGal principalement présent sur la microglie et les cellules endothéliales du mésencéphale ventral foetal [Sumitran et coll., 1999a]. Lors de la préparation de la suspension cellulaire à partir du tissu mésencéphalique foetal, le réseau vasculaire foetal est dissocié. L'équipe de M. Peschanski a montré que les cellules endothéliales du donneur n'étaient pas détectées sein de greffon après transplantation [Dusart et coll., 1989 ; Geny et coll., 1994]. C'est pourquoi la mise en évidence de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par FACS au sein de la suspension cellulaire pourrait être rapportée aux neurones porcins embryonnaires. Cette hypothèse est soutenue par le marquage intense de l'ensemble du greffon aussitôt après son implantation et par les études de Emsley et Hagg qui ont mis en évidence l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ par des neuroblastes de souris [Emsley et Hagg, 2003].

Après implantation du greffon dans le striatum, une minorité de neurones mésencéphaliques survivent [Zawada et coll., 1998 ; Emgard et coll., 1999]. De même, puisque des cellules apoptotiques ont été observées lors des greffes de PAEC, il est envisageable qu'une partie des cellules endothéliales embryonnaires ne survivent pas non plus à la greffe. Ces phénomènes de mort cellulaire temporaires et consécutifs à l'implantation du greffon pourraient accroître la libération de xénoantigènes dont l'intégrine $\beta 1$. Ceux-ci pourraient alors être drainés vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds et présentés par les CPA de l'hôte afin d'initier une réponse cellulaire T. Les lymphocytes T ainsi activés peuvent

alors traverser la barrière hémato-encéphalique et expliquer l'infiltrat cellulaire T caractéristique du rejet des xéno greffes neuronales.

Environ une à deux semaines après l'implantation des PNEU, des structures tubulaires exprimant l'intégrine $\beta 1$ et l'épitope αGal commencent à apparaître au sein du greffon. Ces structures présentent une morphologie similaire à celle de microvaisseaux, mais ces néovaisseaux d'origine porcine semblent encore immatures puisque la molécule d'adhésion porcine CD31 n'y est pas encore exprimée. Ces microvaisseaux néoformés ne semblent donc pas fonctionnels pour établir un réseau sanguin avec celui de l'hôte, mais ils peuvent néanmoins représenter une source de xénoantigènes, qui seraient, comme précédemment décrit, présentés aux cellules T de façon indirecte par les CPA au niveau des ganglions lymphatiques. Par ailleurs, les cellules endothéliales de ces microvaisseaux pourraient être directement impliquées dans la réaction de rejet. En effet, une étude issue de la collaboration des équipes de Brevig, Widner et Holgersson a montré très récemment que les cellules endothéliales embryonnaires porcines activées pouvaient induire la prolifération cellulaire des lymphocytes T humains *in vitro* [Sumitran-Holgersson et coll., 2003]. Ces travaux mettent en évidence l'expression par les cellules endothéliales embryonnaires activées à la fois des molécules du CMH de classe I et II, et des molécules de co-stimulation B7-2 et suggèrent ainsi qu'elles pourraient agir comme des CPA au sein du cerveau. Ces observations nous permettent d'élaborer l'hypothèse que les cellules endothéliales porcines mises en évidence au sein du greffon avant son rejet pourraient être impliquées dans la reconnaissance directe du greffon porcine par les cellules de l'hôte. Activées par les cytokines pro-inflammatoires libérées par les cellules gliales [Melchior et coll., 200], elles pourraient alors exercer un rôle dans la restimulation des lymphocytes T infiltrant le SNC après une première activation périphérique.

TRAVAIL DE THESE

Seconde Partie

Nous avons précédemment décrit la cinétique d'infiltration par les cellules T lors des greffes de neurones embryonnaires porcins dans le striatum de rat. D'autres travaux effectués au sein de notre équipe ont défini cette infiltration. Ainsi, l'analyse par RT-PCR en temps réel de certains transcrits codant pour la portion constante de la chaîne β du TCR et pour plusieurs cytokines et chimiokines a montré que l'infiltration lymphocytaire T était un phénomène actif et soudain. Ce recrutement des cellules T était étroitement corrélé avec une forte augmentation des transcrits de MCP-1 et RANTES, chimiokines actives sur les cellules T CD4+. Simultanément, est apparue une accumulation brutale des transcrits des lymphokines pro-inflammatoires IL-1 α , TNF α , IL-6, ainsi que des ARNm de l'INF γ et de l'IL-2. Ces résultats suggèrent que la greffe était infiltrée par des cellules T CD4+ appartenant au sous type Th1. A l'inverse, les cytokines propres aux cellules Th2, telles l'IL-4, l'IL-10, et l'IL-13 n'étaient pas exprimées [Melchior et coll., 2002]. Les stimuli tels que l'INF γ sont en faveur d'une restimulation des cellules T déjà « primées » par les CPA résidentes et/ou infiltrantes, alors que la prolifération cellulaire T est soutenue par la production locale d'IL-2. Ces données montrent qu'il est possible que les cellules T infiltrantes dans le SNC puissent être restimulées au niveau du greffon dans un fort contexte inflammatoire et contribuent à amplifier la réaction de rejet. Comme nous l'avons décrit précédemment, cette activation requiert une présentation des antigènes par les molécules du CMH des CPA et des signaux de co-stimulation médiés par les molécules B7-1 et B7-2, exprimées par les CPA., et le récepteur lymphocytaire CD28. Etudiée dans divers modèles de transplantation, la molécule CTLA4-Ig, présentée dans l'introduction, représente un réactif stable capable d'un effet immunosuppresseur, voire tolérigène, en bloquant le signal de co-stimulation CD28/B7 et inhibant par conséquent l'activation et la prolifération des cellules T. Etudiée au sein de l'unité U643 par I. Anegon, la transduction d'un greffon cardiaque allogénique, avec un adénovirus recombinant codant pour CTLA4-Ig (AdCTLA4-Ig), a permis d'obtenir une

acceptation à long terme du greffon. Ces résultats ont montré l'intérêt d'une production locale de CTLA4-Ig par le greffon lui-même [Guillot et coll., 2000]. Dans le cas des xénogreffes de neurones, plusieurs arguments suggèrent que le rejet pourrait être contrôlé par une immunosuppression locale en inhibant la voie de co-stimulation CD28/B7. Premièrement, dans le modèle d'inflammation du SNC, l'EAE, une action curative de l'AdCTLA4-Ig a été rapportée, avec une efficacité fortement accrue lorsque le virus était injecté directement dans le SNC [Croxford et coll., 1998]. Deuxièmement, la suppression de l'interaction CD28/B7 protégerait les neurones xénogéniques du rejet chez la souris [Larsson et coll., 2002]. Enfin, une administration locale de l'AdCTLA4-Ig dans le cerveau supprimerait à la fois les réponses immunes cellulaires et humorales dirigées contre ce vecteur viral [Ideguchi et coll., 2000 ; Uchida et coll., 2001]. Ces résultats suggèrent qu'une production locale de CTLA4-Ig par les neurones porcins devrait favoriser leur maintien dans un cerveau humain, ou, tout au moins, contribuer à simplifier l'emploi d'autres agents immunosuppresseurs. A cette fin, nous avons dans un premier temps tenté d'infecter les neurones mésencéphaliques porcins avec un AdCTLA4-Ig (CTLA-4 murin et IgG humaine). Les neurones supportant très mal l'infection adénovirale, aboutissant à une perte considérable des cellules destinées à être greffées, nous avons opté pour une autre alternative. Nous avons ainsi entrepris de générer des porcs transgéniques dont les neurones exprimeraient, sous contrôle du promoteur de l'énolase neurone spécifique (NSE), la protéine CTLA4-Ig. Avec la collaboration de l'INRA, sous la direction du Pr M. Terqui, nous avons généré ces animaux et étudié l'expression du transgène au sein du tissu porcine. Puis nous avons étudié la capacité des neurones transgéniques à produire la molécule CTLA4-Ig après leur implantation dans le cerveau de rat et l'effet de cette production locale sur le rejet des neurones greffés.

- TROISIEME PUBLICATION -

Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation

Martin C., Plat M., Nerrière-Daguin V., Coulon F., Tesson L., Anegon I., Melchior B., Uzbekova S., Venturi E., Condé F., Hermel J-M., Hantraye P., Le Mauff B., Boeffard F., Sergent-Tanguy S., Neveu I., Naveilhan P., Soullillou J-P., Terqui M., Brachet P., and Vanhove B.

Article soumis en 2004



Après avoir construit le plasmide exprimant le gène recombinant CTLA4-Ig humain sous le contrôle du promoteur l'énolase de rat dite neurone-spécifique, la campagne de micro-injection de cette construction, en collaboration avec l'INRA unité « Physiologie de la reproduction », a généré huit animaux fondateurs porteurs du transgène.

L'analyse de leurs descendances a permis de montrer l'expression de CTLA4-Ig par les neurones transgéniques porcins et de sélectionner deux lignées, 18060 et 18108, chez lesquelles la protéine recombinante CTLA4-Ig était exprimée dans plusieurs zones du cerveau adulte, notamment dans le cortex, l'hippocampe, et la substance noire, ceci en plus grande quantité dans la lignée 18108. La mise en culture des neurones embryonnaires transgéniques a confirmé la capacité de ces neurones de la lignée 18108 à sécréter davantage la protéine que ceux de la lignée 18060.

La protéine CTLA4-Ig ainsi produite est fonctionnelle quant à sa capacité à se fixer au récepteur B7. De plus, elle peut exercer l'effet immunosuppresseur attendu *in vitro* puisque, les neurones embryonnaires de la lignée 18108 sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire des lymphocytes humains d'environ 50%.

Greffés dans le striatum de rat soumis à un traitement immunosuppresseur pendant 4 semaines, les analyses immunohistochimiques ont montré que seuls les neurones embryonnaires transgéniques de la lignées 18108 sont capables d'exprimer le transgène *in vivo*. Aucune trace de la protéine n'a été détectée dans le sérum des animaux greffés, ce qui confirme le caractère local, limité au parenchyme cérébral, de la production de CTLA4-Ig. Cependant, la protéine CTLA4-Ig produite n'a exercé aucun effet marqué sur la cinétique de rejet des neurones greffés puisque les greffons transgéniques et non-transgéniques ne sont plus détectables 5 semaines après l'arrêt du traitement immunosuppresseur.

Ces résultats ont montré que la protéine CTLA4-Ig ainsi sécrétée ne retardait pas le rejet du greffon, ce qui amène à plusieurs hypothèses. Il est fortement probable que les neurones mésencéphaliques ne produisent pas une quantité suffisante de CTLA4-Ig pour bloquer la co-stimulation cellulaire T. De plus, cette protéine n'apparaît dans le greffon que plusieurs jours après transplantation et sa production risque donc d'être également trop tardive. Le mésencéphale ventral n'étant probablement pas la meilleure source de neurones transgéniques, des expérimentations futures seront réalisées à partir du cortex embryonnaire. En effet, les cellules corticales embryonnaires sont en général prélevées plus tard (à 38 jours de gestation porcine au lieu de 28 pour le mésencéphale), et le cortex est la structure qui paraît la plus riche en neurones exprimant le transgène, du moins chez les porcs nouveau-nés. Enfin, ce problème quantitatif pourrait être probablement résolu puisque nous avons très récemment sélectionné des animaux homozygotes, donc qui possèdent deux copies du transgène et dont les neurones seraient susceptibles de sécréter une quantité plus importante de protéine CTLA4-Ig.

Il est également fort probable que la protéine CTLA4-Ig humaine n'ait qu'une affinité réduite pour les molécules B7 de rat, alors qu'elle est efficace sur les cellules humaines [Wallace et coll., 1994 et 1995]. Les dernières expériences d'inhibition de prolifération lymphocytaire avec des cellules mononuclées (lymphocytes et APC) humaines et de rat confirmeraient cette hypothèse. Cette dernière hypothèse impliquerait la nécessité d'un changement de modèle, de façon à étudier les xénogreffes intra-striatales des neurones transgéniques chez le primate.

La stratégie consistant à retarder le rejet en bloquant uniquement la voie de co-stimulation B7:CD28 peut également expliquer l'inefficacité du transgène CTLA4-Ig. Larsson et ses collaborateurs ont récemment montré chez la souris que le rejet pouvait être prévenu par des injections périphériques de CTLA4-Ig associé à des anticorps anti-LFA-1 qui bloquent la voie de co-stimulation indépendante de CD28 [Larsson et coll., 2003]. Le rejet médié par les cellules T pourrait donc être également initié par un processus indépendant de la voie de co-stimulation B7:CD28.

De plus, l'importance d'un traitement systémique immunosuppresseur reste à élucider. La CsA, que nous avons donnée durant les 4 semaines suivant la greffe était destinée à permettre aux neurones transplantés de se développer au point de produire la protéine transgénique. Or, il existe des arguments suggérant que ce traitement pourrait masquer ou réduire l'action de CTLA4-Ig, éventuellement par une activité anti-apoptotique [Li et coll., 1999; Wells et coll., 1999]. Nous envisageons donc d'étudier le rôle de traitements systémiques temporaires par des molécules favorisant l'établissement d'un état de tolérance, comme la rapamycine [Li et coll., 1999] ou le LF 15 0195 [Chiffolleau et coll., 2002], qui est étudié par d'autres membres de l'U643. Nous savons déjà par des études préliminaires que comparativement à la CsA, aucun de ces deux composés n'a d'effet significatif à lui seul sur la survie du greffon. Cependant, une action additive ou synergique avec la production intra-cérébrale de CTLA4-Ig reste à explorer.

Enfin, nous disposons d'adénovirus ou d'AAV recombinants exprimant CTLA4-Ig, qui permettront d'étudier l'intérêt d'un apport complémentaire systémique de cette molécule, selon des protocoles également étudiés au laboratoire, notamment dans le cas d'allogreffes cardiaques et d'îlots pancréatiques [Guillot et coll., 2000 ; Laumonier et coll., 2003].

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

Travaux de recherche sur l'immunogénicité des cellules transplantées et les mécanismes de rejet lors des xéngreffes intra-cérébrales

L'étude que nous avons menée sur les xéngreffes de neurones embryonnaires et de cellules endothéliales porcines a révélé deux types de rejet dans le SNC selon la nature des cellules

Les cellules endothéliales porcines font l'objet d'un rejet très précoce après leur implantation intra-cérébrale associé à un contexte inflammatoire macrophagique très marqué. Ce mécanisme de rejet n'est pas encore élucidé et la participation des autres facteurs de l'immunité, tels le complément, les immunoglobulines ou les cellules NK, n'est pas exclue. Comme dans le cas des rejets de greffes d'organes vascularisés, les cellules endothéliales porcines sont probablement au sein du SNC à l'origine d'une réaction immune comparable au rejet de type hyper-aigu ou aigu retardé.

Les neurones embryonnaires porcins sont quant à eux rejetés plus tardivement. Leur rejet est associé à une infiltration lymphocytaire massive et un mécanisme de reconnaissance antigénique indirecte peut être envisagé. Le marqueur macrophagique OX42, utilisé dans nos études immunohistochimiques, est dirigé contre les épitopes CD11b et CD11c de rat. Le CD11c est également un marqueur des cellules dendritiques qui sont par excellence les cellules présentatrices d'antigène du système immunitaire. La forte infiltration de cellules OX42 positives les premiers jours suivant la greffe évoque donc la possibilité de la présence de cellules dendritiques de rat au sein du site de greffe. Dès lors, il est envisageable que les CPA du rat phagocytent les débris des nombreux neurones qui meurent dès les premières heures suivant la greffe et appréhendent les peptides antigéniques porcins à leur surface, avant de migrer vers les ganglions cervicaux profonds afin de les présenter aux lymphocytes T naïfs du rat.

Notre recherche des cellules endothéliales porcines au sein de la suspension cellulaire mésencéphalique a montré l'absence de cellules endothéliales matures. Cependant elle n'exclue pas la présence de cellules endothéliales immatures qui n'expriment pas encore certains marqueurs endothéliaux comme par exemple le CD31. La présence de précurseurs de cellules endothéliales pourrait expliquer l'apparition tardive des structures d'origine porcine, semblables à des microvaisseaux, observées au sein du greffon. En outre, l'anticorps dirigé contre l'intégrine $\beta 1$ porcine, initialement utilisé pour détecter la présence de cellules endothéliales porcines, a révélé une expression massive de cette protéine au sein du greffon les premiers jours suivant la greffe. L'étude par cytofluorimétrie de la suspension neuronale a montré une forte expression de l'intégrine $\beta 1$ par les neurones après leur perméabilisation alors que son expression à leur surface est très faible. Il est donc possible que la mise en évidence de l'intégrine $\beta 1$ au sein du greffon soit consécutive à la mort d'une quantité importante de neurones. La mort des neurones par apoptose se produit juste après leur implantation puis disparaît très rapidement. Cette observation pourrait expliquer la disparition progressive du marquage anti-intégrine $\beta 1$ consécutive à la phagocytose des débris neuronaux par les CPA du parenchyme cérébral (microglie activée, cellules dendritiques potentielles). Il est également possible que la préparation de la suspension cellulaire à partir du tissu mésencéphalique entraîne une activation des neurones et le démasquage de l'intégrine $\beta 1$. Dans les deux cas de figure, l'intégrine $\beta 1$ constituerait l'un des xénoantigènes neuronaux présentés aux lymphocytes T naïfs au sein des ganglions périphériques. Les lymphocytes ainsi activés, dits « primés », pourraient alors migrer vers le cerveau et traverser la BHE jusqu'au parenchyme cérébral. Cependant, aucune infiltration lymphocytaire n'est observée dans le parenchyme après le premier épisode inflammatoire. La forte diminution de la réaction inflammatoire à la fin de la première semaine post-greffe et donc l'absence de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires au niveau de la BHE pourrait expliquer l'absence d'attraction des lymphocytes activés en périphérie. Il reste donc à expliquer quels sont les phénomènes susceptibles d'intervenir lors du rejet à 28 jours. Une des hypothèses pourrait être liée

l'apparition des structures tubulaires identiques à des néo-vaisseaux porcins. En effet, le développement de ces néo-microvaisseaux pourrait générer une rupture de la BHE, due notamment à la mise en place d'éventuelles connections avec le système microvasculaire du rat. Le système immunitaire de l'hôte pourrait alors reconnaître les antigènes endothéliaux porcins, dont l'intégrine $\beta 1$, et induire un nouvel état inflammatoire. La production de cytokines inflammatoires et de chimiokines serait alors responsable du recrutement soit des lymphocytes T préalablement activés dans les ganglions périphériques, soit de lymphocytes T « mémoires » dérivés de ces mêmes lymphocytes. Infiltrés au niveau du site de greffe, ces cellules T pourraient alors reconnaître les marqueurs neuronaux porcins précédemment présentés dans les ganglions périphériques lors de la première réaction inflammatoire, et entraîner le rejet des neurones porcins.

Ces hypothèses serviront de base à de prochains travaux. Ainsi, une étude immunohistochimique ciblant les cellules dendritiques en utilisant l'anticorps OX62, serait un argument en faveur de notre hypothèse de reconnaissance indirecte au sein des ganglions périphériques cervicaux profonds. Par ailleurs, l'étude de marqueurs précoces des cellules endothéliales, comme par exemple Tie-2, récepteur spécifique de la tyrosine kinase des cellules endothéliales, permettrait la mise en place d'un tri cellulaire avant la greffe. Si notre hypothèse est viable, l'élimination des précurseurs endothéliaux à l'origine des néo-vaisseaux observés au sein du greffon pourra prévenir la réactivation du système immunitaire de l'hôte. Enfin, un suivi immunohistochimique spécifique des cellules T mémoires confirmerait l'a hypothèse de l'intervention de ces cellules dans la réaction de rejet des neurones embryonnaires.

Travaux de recherche sur l'utilisation de la transgénèse porcine comme stratégie d'immunosuppression

Le programme de transgénèse porcine a été mis en place afin d'obtenir des neurones embryonnaires porcins exprimant une molécule immunosuppressive dirigée contre la réponse T, CTLA4-Ig. Les analyses effectuées ont montré que la protéine de fusion est exprimée au sein du cerveau des porcelets nouveaux nés, ainsi que par les neurones en culture et les neurones mésencéphaliques greffés dans le striatum de rat. L'activité de la molécule a été étudiée *in vitro*. La réaction lymphocytaire mixte réalisée avec des cellules humaines est inhibée par les neurones porcins transgéniques. En revanche, ces derniers se sont révélés inefficaces sur la réaction lymphocytaire mixte effectuée avec des cellules de rat. En effet, chez le rongeur, il est reconnu que la molécule CTLA4-Ig d'origine humaine présente une affinité moindre pour son ligand, la molécule B7, que la molécule d'origine murine [Wallace et coll., 1994, 1995]. Il est possible que la quantité de CTLA4-Ig sécrétée par les neurones porcins soit dans ce cas insuffisante pour une immunosuppression efficace chez le rongeur.

Les travaux seront poursuivis de 2 façons. L'effet du CTLA4-Ig murin sur la réaction immune chez rat sera étudié en utilisant des neuroblastes porcins transfectés, ou plus favorablement infectés avec un virus de type AAV ou lentivirus exprimant le CTLA4-Ig murin. Les neurones transgéniques CTLA4-Ig porcins seront quant à eux greffés dans un modèle de maladie de Parkinson chez le primate (modèle MPTP), animal plus adapté à l'action du CTLA4-Ig d'origine humaine. Ce modèle permettra l'étude de la stratégie immunosuppressive d'un point de vue à la fois immunitaire et fonctionnel de la greffe.

PERSPECTIVES

Dans le contexte très restrictif de l'allogreffe en clinique neurologique, les neurones embryonnaires porcins représentent une nouvelle source cellulaire dans le traitement des maladies neurodégénératives. Dans la maladie de Parkinson, la transplantation des neuroblastes mésencéphaliques est très prometteuse. Cependant cette approche est elle aussi restreinte par le rejet systématique des cellules implantées. A partir des expériences réalisées chez l'animal, nous avons étudié l'influence des cellules porcines greffées, ainsi que le rôle des cellules immunes du receveur, dans la réaction de rejet de l'hôte contre le greffon. La survie et la prévention du rejet des xéngreffes impliquent la maîtrise ces deux éléments. Différents projets pourront être proposés :

Protéger le greffon

L'une des difficultés de la transplantation intra-cérébrale, est le faible taux de survie des neurones avant la réaction de rejet. En effet, parmi le petit nombre (de l'ordre de 10%) de cellules exprimant la tyrosine hydroxylase au sein du mésencéphale ventral embryonnaire, seules 5 à 10% des cellules greffées survivent aux opérations de prélèvement, de dissociation puis de transplantation. Les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles au stress oxydatif. Les étapes de préparation et de transplantation, en induisant la production de radicaux libres oxygénés qui provoquent la peroxydation de la membrane lipidique, réduisent considérablement la survie des neurones. Une grande partie de ces derniers entrent en apoptose suite à l'implantation dans le cerveau hôte. C'est pourquoi les thérapies anti-apoptotiques comme les inhibiteurs de caspases, ou les inhibiteurs de radicaux libres, tels les lazaroïdes, constitueraient des pré-traitements de la suspension neurale particulièrement utiles à la survie des neurones dopaminergiques [Nakao et coll., 1994 ; Hansson et coll., 2000]. Leur action protectrice serait d'autant plus efficace s'ils étaient associés à un apport de facteurs neurotrophiques, tels le BDNF ou le GDNF [Höglinger et coll., 2001 ; Helt et coll, 2001].

Prolonger la survie des cellules greffées

Le rejet des xénogreffes est caractérisé par une réponse immune cellulaire. L'implication majeure des lymphocytes T CD4⁺ a été démontrée dans de nombreuses études et les traitements immunosuppresseurs utilisés pour prévenir le rejet sont essentiellement dirigés contre ces cellules T CD4⁺. Cependant, d'autres cellules participent de façon plus restreinte au processus du rejet et ne doivent pas être négligées. C'est pourquoi il serait intéressant d'associer aux stratégies immunosuppressives, comme la greffe des neurones transgéniques exprimant CTLA4-Ig, des traitements dirigés contre la réponse T CD8⁺ et contre la réaction des cellules macrophagiques (microglie résidente et macrophages infiltrants). Il a déjà été montré qu'un traitement anti-LFA-1, bloquant la costimulation des cellules T CD8⁺, augmenterait l'efficacité des thérapies basées sur l'utilisation du CTLA4-Ig et de l'anti-CD40L [Larsson et coll., 2003]. Un traitement additif pourrait cibler les cellules macrophagiques. Par exemple, la minocycline, antibiotique de la famille des tétracyclines semble présenter un potentiel anti-inflammatoire en bloquant l'activation microgliale et avoir une action neuroprotectrice de la voie dopaminergique nigro-striée [Zhang et coll., 2003 ; Thomas et Le, 2004]. Un tel traitement pourrait donc favoriser la survie des neurones dopaminergiques implantés en maîtrisant l'un des facteurs du rejet et en protégeant les cellules greffées.

Diminuer l'immunogénicité des cellules du donneur

Comme nous l'avons décrit précédemment, la suspension cellulaire greffée constitue une source d'antigènes porcins qui peuvent être reconnus par les cellules immunes du rat. Lors de la préparation et de l'implantation de la suspension cellulaire, non seulement les molécules du CMH sont sur-exprimées par les neurones et les cellules gliales, mais d'autres antigènes porcins, tels l'intégrine $\beta 1$, pourraient se trouver démasqués et constituer des éléments très immunogènes pour le système immunitaire du receveur. Afin de diminuer l'immunogénicité du greffon, il pourrait être nécessaire de neutraliser les xénoantigènes connus avant l'implantation des cellules dans le cerveau du receveur. Ainsi,

de précédentes études ont montré que la neutralisation de l'épitope α Gal réduisait l'immunogénicité des cellules porcines greffées chez l'homme [Brevig et coll., 2001]. A la fin de l'année 2003, l'équipe américaine de D. Sachs a communiqué lors du congrès de xénotransplantation à Glasgow, ses travaux sur l'obtention de mini-porcs n'exprimant pas l'épitope α Gal (porcs dits Gal-KO). Suites à des manipulations génétiques, ces porcs n'expriment pas la α 1,3-galactosyltransférase, enzyme responsable de la synthèse de l'épitope α Gal. Même si le rejet des greffes intra-cérébrales n'est pas dû majoritairement à une réponse humorale contre cet épitope, l'utilisation de ces porcs comme source cellulaire, en association avec les traitements immunosuppresseurs dirigés contre la réponse T, serait un facteur complémentaire favorisant la suppression du rejet.

Une autre voie très prometteuse est l'utilisation des cellules souches neurales. Leur isolement à partir du tissu cérébral fœtal ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement des maladies neurodégénératives puisqu'elles peuvent être multipliées *in vitro* et sont capables de générer les trois types cellulaires majeurs du SNC, les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. De plus, ces cellules semblent présenter une immunogénicité moindre. En effet, greffées chez le rat, aucune expression des molécules du CMH de classe I et II n'a été détectée à leur surface [Armstrong et coll., 2001]. De plus, la forte réponse humorale, induite par l'injection intra-péritonéale de tissu fœtal fraîchement prélevé, n'est pas détectée lors de l'injection de cellules souches neurales préalablement isolées et mises à proliférer en présence d'agents mitogènes [Armstrong et coll., 2001]. Leur utilisation en transplantation est encore au stade de l'expérimentation car il reste à maîtriser les mécanismes et les facteurs environnementaux qui contrôlent leur différenciation et leur maturation. Toutefois, l'utilisation de cette nouvelle source cellulaire moins immunogène, soutenue par un effort de recherche intense, ouvre une nouvelle voie en xénotransplantation.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol.* 1999;162:2964-73.
2. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996;8:765-72.
3. Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, Magaletti D, Buckwalter S, Ledbetter JA, Clark EA. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol.* 2000;164:4689-96.
4. Ajmone-Cat MA, Nicolini A, Minghetti L. Prolonged exposure of microglia to lipopolysaccharide modifies the intracellular signaling pathways and selectively promotes prostaglandin E2 synthesis. *J Neurochem.* 2003;87:1193-203.
5. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:220-8.
6. Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menendez Iglesias B, Adorini L. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol.* 1997;159:1604-12.
7. Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol.* 1998;160:4671-80.
8. Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today.* 2000;21:141-7.
9. Andjelkovic AV, Pachter JS. Central nervous system endothelium in neuroinflammatory, neuroinfectious, and neurodegenerative disease. *J Neurosci Res.* 1998;51:423-30.
10. Armstrong RJ, Harrower TP, Hurelbrink CB, McLaughlin M, Ratcliffe EL, Tyers P, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA. Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience.* 2001;106:201-16.
11. Arvieux J, Yssel H, Colomb MG. Antigen-bound C3b and C4b enhance antigen-presenting cell function in activation of human T-cell clones. *Immunology.* 1988;65:229-35.

12. Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today*. 1996;17:379-84.
13. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 1994;55:97-179.
14. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol*. 1995;168:342-57.
15. Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia*. 1993;7:111-8.
16. Barker RA, Kendall AL, Widner H. Neural tissue xenotransplantation: what is needed prior to clinical trials in Parkinson's disease? Neural Tissue Xenografting Project. *Cell Transplant*. 2000a;9:235-46.
17. Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB. A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2000b;20:3415-24.
18. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA, Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med*. 1993;177:57-68.
19. Batten P, Yacoub MH, Rose ML. Effect of human cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1 beta, IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. *Immunology*. 1996;87:127-33.
20. Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*. 2000;29:293-304.
21. Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*. 1995;373:339-41.
22. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest*. 1993;91:379-87.
23. Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert JJ, Mallet J, Horellou P. Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:8818-23.

24. Bjorklund A, Stenevi U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 1979;177:555-60.
25. Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH. Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Nature.* 1982;298:652-4.
26. Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 2000;886:82-98.
27. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci.* 2000;3:537-44.
28. 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;58:1059-66.
29. Bo L, Mork S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD. Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol.* 1994;51:135-46.
30. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* 1995;3:87-98.
31. Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD, Kampinga J, Bradley JA. Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med.* 1989;169:1931-46.
32. Bour-Jordan H, Grogan JL, Tang Q, Auger JA, Locksley RM, Bluestone JA. CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nat Immunol.* 2003;4:182-8.
33. Bourdoulous S, Bensaid A, Martinez D, Sheikboudou C, Trap I, Strosberg AD, Couraud PO. Infection of bovine brain microvessel endothelial cells with *Cowdria ruminantium* elicits IL-1 beta, -6, and -8 mRNA production and expression of an unusual MHC class II DQ alpha transcript. *J Immunol.* 1995;154:4032-8.
34. Brevig T, Pedersen EB, Kristensen T, Zimmer J. Proliferative response of human T lymphocytes to porcine fetal brain cells. *Cell Transplant.* 1997;6:571-7.

35. Brevig T, Kristensen T, Zimmer J. Expression of major histocompatibility complex antigens and induction of human T-lymphocyte proliferation by astrocytes and macrophages from porcine fetal brain. *Exp Neurol*. 1999;159:474-83.
36. Brevig T, Meyer M, Kristensen T, Zimmer J, Holgersson J. Xenotransplantation for brain repair: reduction of porcine donor tissue immunogenicity by treatment with anti-Gal antibodies and complement. *Transplantation*. 2001;72:190-6.
37. Brooks DJ. PET studies on the function of dopamine in health and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;991:22-35.
38. Brouard S, Gagne K, Blancho G, Souillou JP. T cell response in xenorecognition and xenografts: a review. *Hum Immunol*. 1999;60:455-68.
39. Brundin P, Nilsson OG, Strecker RE, Lindvall O, Astedt B, Bjorklund A. Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res*. 1986;65:235-40.
40. Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Bjorklund A. Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res*. 1989;75:195-207.
41. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*. 1987;328:267-70.
42. Brunet JF, Denizot F, Golstein P. A differential molecular biology search for genes preferentially expressed in functional T lymphocytes: the CTLA genes. *Immunol Rev*. 1988;103:21-36.
43. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999;23:297-308.
44. Calvo CF, Yoshimura T, Gelman M, Mallat M. Production of monocyte chemotactic protein-1 by rat brain macrophages. *Eur J Neurosci*. 1996;8:1725-34.
45. Candinas D, Belliveau S, Koyamada N, Miyatake T, Hechenleitner P, Mark W, Bach FH, Hancock WW. T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation*. 1996;62:1920-7.

46. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1995;37:424-35.
47. Carrithers MD, Visintin I, Viret C, Janeway CS, Jr. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 2002;129:51-7.
48. Carter LL, Dutton RW. Relative perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations. *J Immunol.* 1995;155:1028-31.
49. Cash E, Rott O. Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the central nervous system. *Clin Exp Immunol.* 1994;98:313-8.
50. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 1996;184:747-52.
51. Chamak B, Morandi V, Mallat M. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res.* 1994;38:221-33.
52. Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4 (+) T cells. *J Exp Med.* 1998;188:1849-57.
53. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant.* 2002;2:745-57.
54. Collins BH, Cotterell AH, McCurry KR, Alvarado CG, Magee JC, Parker W, Platt JL. Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the alpha-galactosyl determinant in hyperacute rejection. *J Immunol.* 1995;154:5500-10.
55. Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 1987;223:284-8.
56. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett.* 2003;86:123-9.
57. Cottrez F, Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation.* 2004;77:S12-5.

58. Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*. 1977;197:596-8.
59. Cross AH, Ku G. Astrocytes and central nervous system endothelial cells do not express B7-1 (CD80) or B7-2 (CD86) immunoreactivity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2000;110:76-82.
60. Croxford JL, O'Neill JK, Ali RR, Browne K, Byrnes AP, Dallman MJ, Wood MJ, Fedlmann M, Baker D. Local gene therapy with CTLA4-immunoglobulin fusion protein in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1998;28:3904-16.
61. Cserr HF, Knopf PM. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today*. 1992;13:507-12.
62. Czech KA, Ryan JW, Sagen J, Pappas GD. The influence of xenotransplant immunogenicity and immunosuppression on host MHC expression in the rat CNS. *Exp Neurol*. 1997;147:66-83.
63. Damier P. [Parkinson's disease]. *Rev Prat*. 2002;52:1255-60.
64. Daniloff JK, Low WC, Bodony RP, Wells J. Cross-species neural transplants of embryonic septal nuclei to the hippocampal formation of adult rats. *Exp Brain Res*. 1985;59:73-82.
65. Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science*. 1981;213:1469-74.
66. Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*. 1979;1:249-54.
67. De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C, Aloisi F. The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54:175-87.
68. de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, t Hart BA, Laman JD. Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol*. 2002;169:5415-23.
69. Deacon TW, Pakzaban P, Burns LH, Dinsmore J, Isacson O. Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats. *Exp Neurol*. 1994;130:151-67.

70. Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P, Isacson O. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med.* 1997;3:350-3.
71. Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J, Isacson O. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol.* 1998;149:28-41.
72. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science.* 1996;271:348-50.
73. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia.* 2001;36:180-90.
74. Doucet G, Murata Y, Brundin P, Bosler O, Mons N, Geffard M, Ouimet CC, Bjorklund A. Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol.* 1989;106:1-19.
75. Drewes L. What is the blood brain barrier? A molecular perspective. *Hypoxia: into the next millenium.* Roach R.C & al. Kluwer academic:plenum, New York (eds). 1990;10:110-122.
76. Duan WM, Widner H, Brundin P. Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngeneic, allogeneic or xenogeneic embryonic neuronal tissue in rats. *Exp Brain Res.* 1995;104:227-42.
77. Duan WM, Cameron RM, Brundin P, Widner H. Rat intrastriatal neural allografts challenged with skin allografts at different time points. *Exp Neurol.* 1997a;148:334-47.
78. Duan WM, Brundin P, Widner H. Addition of allogeneic spleen cells causes rejection of intrastriatal embryonic mesencephalic allografts in the rat. *Neuroscience.* 1997b;77:599-609.
79. Dusart I, Nothias F, Roudier F, Besson JM, Peschanski M. Vascularization of fetal cell suspension grafts in the excitotoxically lesioned adult rat thalamus. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989;48:215-28.
80. Emgard M, Karlsson J, Hansson O, Brundin P. Patterns of cell death and dopaminergic neuron survival in intrastriatal nigral grafts. *Exp Neurol.* 1999;160:279-88.
81. Emsley JG, Hagg T. alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol.* 2003;183:273-85.

82. Erdei A, Spaeth E, Alsenz J, Rude E, Schulz T, Gergely J, Dierich MP. Role of C3b receptors in the enhancement of interleukin-2-dependent T-cell proliferation. *Mol Immunol*. 1984;21:1215-21.
83. Erlich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity*. 2001;14:347-56.
84. Etienne S, Bourdoulous S, Strosberg AD, Couraud PO. MHC class II engagement in brain endothelial cells induces protein kinase A-dependent IL-6 secretion and phosphorylation of cAMP response element-binding protein. *J Immunol*. 1999;163:3636-41.
85. Fabry Z, Waldschmidt MM, Hendrickson D, Keiner J, Love-Homan L, Takei F, Hart MN. Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55. *J Neuroimmunol*. 1992;36:1-11.
86. Fabry Z, Fitzsimmons KM, Herlein JA, Moninger TO, Dobbs MB, Hart MN. Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol*. 1993;47:23-34.
87. Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol*. 1992;32:804-12.
88. Fahn S, Green P, Tsai WY, Eidelberg D, Winfield H, Dillon S, Kao R, Winfield L, Breeze R, Freed C. Double-blind controlled trial of human embryonic dopaminergic tissue transplants in advanced Parkinson's disease: clinical outcomes. *Neurology*. 1999;52:A405.
89. Feng S, Quicquel RR, Hollister-Lock J, McLeod M, Bonner-Weir S, Mulligan RC, Weir GC. Prolonged xenograft survival of islets infected with small doses of adenovirus expressing CTLA4Ig. *Transplantation*. 1999;67:1607-13.
90. Finger EB, Bluestone JA. When ligand becomes receptor--tolerance via B7 signaling on DCs. *Nat Immunol*. 2002;3:1056-7.
91. Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant*. 2000;9:273-8.
92. Fink JS, Watts RL, Hauser RA, Bakay RA, Ellias SA, Stoessl AJ, Eidelberg D, Dinsmore J, Watts M, Stewart GR, Freeman TB. A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter clinical trial of the safety and efficacy of intrastriatal implantation of fetal porcine ventral mesencephalon (neurocell-PD) in patients with advanced Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2002;175:425.

93. Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol.* 1995;154:4309-21.
94. Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, Sedgwick JD. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med.* 1996;184:1737-45.
95. Fornaguera J, Schwarting RK, Boix F, Huston JP. Behavioral indices of moderate nigro-striatal 6-hydroxydopamine lesion: a preclinical Parkinson's model. *Synapse.* 1993;13:179-85.
96. Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breitmayer JP, Groux H. A comparative study between T regulatory Type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol.* 2003;171:5018-26.
97. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2001;344:710-9.
98. Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJ, et al. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1995;38:379-88.
99. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192:1027-34.
100. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192:1027-34.
101. Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol.* 1987;17:1271-8.
102. Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates MA, Bjorklund A. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci.* 1999;19:5990-6005.

103. Frohman EM, Frohman TC, Dustin ML, Vayuvegula B, Choi B, Gupta A, van den Noort S, Gupta S. The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J Neuroimmunol.* 1989;23:117-24.
104. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med.* 2002;196:459-68.
105. Fryer JP, Leventhal JR, Dalmaso AP, Chen S, Simone PA, Goswitz JJ, Reinsmoen NL, Matas AJ. Beyond hyperacute rejection. Accelerated rejection in a discordant xenograft model by adoptive transfer of specific cell subsets. *Transplantation.* 1995;59:171-6.
106. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol.* 1988;140:4245-52.
107. Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today.* 1993;14:480-2.
108. Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, Isacson O. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp Neurol.* 1996;140:1-13.
109. Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature.* 1996;380:252-5.
110. Geny C, Naimi-Sadaoui S, Jeny R, Belkadi AM, Juliano SL, Peschanski M. Long-term delayed vascularization of human neural transplants to the rat brain. *J Neurosci.* 1994;14:7553-62.
111. Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2499-504.
112. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:6586-90.

113. Gouhier C, Chalon S, Aubert-Pouessel A, Venier-Julienne MC, Jollivet C, Benoit JP, Guilloteau D. Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivered by microspheres in a rodent model of Parkinson's disease. *Synapse*. 2002;44:124-31.
114. Gould DS, Auchincloss H, Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today*. 1999;20:77-82.
115. Gourmala NG, Limonta S, Bochelen D, Sauter A, Boddeke HW. Localization of macrophage inflammatory protein: macrophage inflammatory protein-1 expression in rat brain after peripheral administration of lipopolysaccharide and focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 1999;88:1255-66.
116. Graeber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW. Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992;51:303-11.
117. Gregoire N. [The blood-brain barrier]. *J Radiol*. 1990;71:481-7.
118. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*. 2002;3:1097-101.
119. Gross JA, Callas E, Allison JP. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol*. 1992;149:380-8.
120. Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, Le Mauff B, Castro MG, Tesson L, Usal C, Laumonier T, Brouard S, Soullillou JP, Lowenstein PR, Cuturi MC, Anegon I. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol*. 2000;164:5258-68.
121. Hagell P, Schrag A, Piccini P, Jahanshahi M, Brown R, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Odin P, Wenning GK, Morrish P, Gustavii B, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain*. 1999;122 (Pt 6):1121-32.
122. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002;40:140-55.
123. Hansson O, Castilho RF, Kaminski Schierle GS, Karlsson J, Nicotera P, Leist M, Brundin P. Additive effects of caspase inhibitor and lazardoid on the survival of transplanted rat and human embryonic dopamine neurons. *Exp Neurol*. 2000;164:102-11.

124. Hantraye P, Varastet M, Peschanski M, Riche D, Cesaro P, Willer JC, Maziere M. Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience*. 1993;53:169-78.
125. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol*. 1991;147:1037-44.
126. Harrower TP, Richards A, Cruz G, Copeman L, Dunnett SB, Barker RA. Alpha Gal is widely expressed in embryonic porcine stem cells and neural tissue. *Neuroreport*. 2002;13:481-5.
127. Hart MN, Fabry Z. CNS antigen presentation. *Trends Neurosci*. 1995;18:475-81.
128. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med*. 1994;180:631-40.
129. Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA. Astroglia in CNS injury. *Glia*. 1991;4:233-43.
130. Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH, Olanow CW. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 1999;56:179-87.
131. Helt CE, Hoernig GR, Albeck DS, Gerhardt GA, Ickes B, Reyland ME, Quissell DO, Stromberg I, Granholm AC. Neuroprotection of grafted neurons with a GDNF/caspase inhibitor cocktail. *Exp Neurol*. 2001;170:258-69.
132. Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A, Korsgren O, Chapman LE, Folks TM, Groth CG. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet*. 1998;352:695-9.
133. Herman JP, Abrous ND. Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog Neurobiol*. 1994;44:1-35.
134. Herold KC, Lu J, Rulifson I, Vezys V, Taub D, Grusby MJ, Bluestone JA. Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation. *J Immunol*. 1997;159:4150-3.
135. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1991;28:254-60.

136. Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol.* 1999;11:125-37.
137. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996;32:687-98.
138. Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, Lin LF, Gerhardt GA. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett.* 1994;182:107-11.
139. Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* 2004;14:43-50.
140. HogenEsch RI, Koopmans J, Copray JC, van Roon WM, Kema I, Molenaar G, Go KG, Staal MJ. Fetal porcine ventral mesencephalon graft. Determination of the optimal gestational age for implantation in parkinsonian patients. *Exp Brain Res.* 2000;132:345-50.
141. Hoglinger GU, Widmer HR, Spenger C, Meyer M, Seiler RW, Oertel WH, Sautter J. Influence of time in culture and BDNF pretreatment on survival and function of grafted embryonic rat ventral mesencephalon in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2001;167:148-57.
142. Honey CR, Clarke DJ, Dallman MJ, Charlton HM. Human neural graft function in rats treated with anti-interleukin II receptor antibody. *Neuroreport.* 1990;1:247-9.
143. Howard OM, Ben-Baruch A, Oppenheim JJ. Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol.* 1996;14:46-51.
144. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2001;24:719-25.
145. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999;397:263-6.
146. Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM. Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci.* 1994;14:335-47.
147. Ideguchi M, Kajiwara K, Yoshikawa K, Uchida T, Ito H. Local adenovirus-mediated CTLA4-immunoglobulin expression suppresses the immune responses to adenovirus vectors in the brain. *Neuroscience.* 2000;95:217-26.

148. Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH. Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med.* 1995;1:1189-94.
149. Isacson O, Deacon TW. Specific axon guidance factors persist in the adult brain as demonstrated by pig neuroblasts transplanted to the rat. *Neuroscience.* 1996;75:827-37.
150. Isacson O, Deacon T. Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *Trends Neurosci.* 1997;20:477-82.
151. Issazadeh S, Navikas V, Schaub M, Sayegh M, Khoury S. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J Immunol.* 1998;161:1104-12.
152. Jemison LM, Williams SK, Lublin FD, Knobler RL, Korngold R. Interferon-gamma-inducible endothelial cell class II major histocompatibility complex expression correlates with strain- and site-specific susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1993;47:15-22.
153. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol.* 1991;147:2461-6.
154. Johansson M, Ellegren H, Andersson L. Comparative mapping reveals extensive linkage conservation--but with gene order rearrangements--between the pig and the human genomes. *Genomics.* 1995;25:682-90.
155. Jolliet P. [Pharmacologic constraints imposed by the blood-brain barrier: the example of multiple sclerosis]. *Rev Neurol (Paris).* 2000;156:681-3.
156. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today.* 1994;15:321-31.
157. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:207-32.
158. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med.* 1996;184:783-8.
159. Karpus WJ, Kennedy KJ. MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol.* 1997;62:681-7.

160. Kato T, Nariuchi H. Polarization of naive CD4⁺ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation. *J Immunol.* 2000;164:3554-62.
161. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 1994;266:1395-9.
162. Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, Schall TJ, Weiss MC, Yssel H, Schneider PV, Cocks BG, Bacon KB, Zlotnik A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol.* 1995;155:203-9.
163. Kerfoot SM, Kubes P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002;169:1000-6.
164. Kida S, Weller RO, Zhang ET, Phillips MJ, Iannotti F. Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1995;21:181-4.
165. Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol.* 1995;155:4917-25.
166. Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci.* 2004;7:105-10.
167. Kitada T, Asakawa S, Matsumine H, Hattori N, Shimura H, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y. Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism. *Neurogenetics.* 2000;2:207-18.
168. Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, Barner M, Oxenius A, Gallimore A, Gutierrez-Ramos JC, Bachmann MF. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med.* 2000;192:53-61.
169. Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP, et al. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 1995;332:1118-24.
170. Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science.* 2000;290:767-73.

171. Krach P. Parkinson'disease:deep brain stimulation. *Rev neurol (Paris)*. 2002;158(HS): 7S135-7S141.
172. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19:312-8.
173. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. *J Exp Med*. 1996;184:2013-8.
174. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182:459-65.
175. Kubes P, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res*. 1996;32:699-708.
176. Kurlberg G, Haglind E, Schon K, Tornqvist H, Lycke N. Blockade of the B7-CD28 pathway by CTLA4-Ig counteracts rejection and prolongs survival in small bowel transplantation. *Scand J Immunol*. 2000;51:224-30.
177. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med*. 2000;6:686-8.
178. Lambeng N, Hourez R, Torch S, Verna JM, Blum D. Mort neuronale dans les modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson. *Medecine/Sciences*. 2002;18:457-466.
179. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. 1998;339:1130-43.
180. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983;219:979-80.
181. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med*. 1990;172:1483-93.
182. Larsen CP, Pearson TC. The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:641-7.
183. Larsson LC, Czech KA, Widner H, Korsgren O. Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. *Transplantation*. 1999;68:1153-60.

184. Larsson LC, Frielingsdorf H, Mirza B, Hansson SJ, Anderson P, Czech KA, Strandberg M, Widner H. Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp Neurol.* 2001a;172:100-14.
185. Larsson LC, Anderson P, Widner H, Korsgren O. Enhanced survival of porcine neural xenografts in mice lacking CD1d1, but no effect of NK1.1 depletion. *Cell Transplant.* 2001b;10:295-304.
186. Larsson LC, Corbascio M, Widner H, Pearson TC, Larsen CP, Ekberg H. Simultaneous inhibition of B7 and LFA-1 signaling prevents rejection of discordant neural xenografts in mice lacking CD40L. *Xenotransplantation.* 2002;9:68-76.
187. Larsson LC, Corbascio M, Pearson TC, Larsen CP, Ekberg H, Widner H. Induction of operational tolerance to discordant dopaminergic porcine xenografts. *Transplantation.* 2003;75:1448-54.
188. Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF. Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res.* 1991;28:236-43.
189. Laumonier T, Potiron N, Boeffard F, Chagneau C, Brouard S, Guillot C, Souillou JP, Anegon I, Le Mauff B. CTLA4Ig adenoviral gene transfer induces long-term islet rat allograft survival, without tolerance, after systemic but not local intragraft expression. *Hum Gene Ther.* 2003;14:561-75.
190. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 1990;39:151-70.
191. Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* 1999;53:122-30.
192. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation.* 2002;73:1373-81.
193. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996;271:1734-6.
194. Lechler R, Ng WF, Steinman RM. Dendritic cells in transplantation--friend or foe? *Immunity.* 2001;14:357-68.
195. Lee SJ, Park JY, Hou J, Benveniste EN. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by proinflammatory cytokines in human astrocytes. *Glia.* 1999;25:21-32.

196. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS, Bluestone JA. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science*. 1992;257:789-92.
197. Lescaudron L, Unni D, Dunbar GL. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. *Int J Neurosci*. 2003;113:945-56.
198. Levisetti MG, Padrid PA, Szot GL, Mittal N, Meehan SM, Wardrip CL, Gray GS, Bruce DS, Thistlethwaite JR, Jr., Bluestone JA. Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation. *J Immunol*. 1997;159:5187-91.
199. Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med*. 1999;5:1298-302.
200. Li TS, Hamano K, Kajiwara K, Nishida M, Zempo N, Esato K. Prolonged survival of xenograft fetal cardiomyocytes by adenovirus-mediated CTLA4-Ig expression. *Transplantation*. 2001;72:1983-5.
201. Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL. Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 1998;339:1105-11.
202. Lin H, Bolling SF, Linsley PS, Wei RQ, Gordon D, Thompson CB, Turka LA. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med*. 1993;178:1801-6.
203. Lindvall O, Rehncrona S, Gustavii B, Brundin P, Astedt B, Widner H, Lindholm T, Bjorklund A, Leenders KL, Rothwell JC, et al. Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease. *Lancet*. 1988;2:1483-4.
204. Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*. 1990;247:574-7.
205. Lindvall O, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Odin P, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, et al. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol*. 1992;31:155-65.

206. Lindvall O, Sawle G, Widner H, Rothwell JC, Bjorklund A, Brooks D, Brundin P, Frackowiak R, Marsden CD, Odin P, et al. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1994;35:172-80.
207. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 1991;174:561-9.
208. Liu Y, Jones B, Brady W, Janeway CA, Jr., Linsley PS, Linley PS. Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur J Immunol.* 1992;22:2855-9.
209. Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ, Taub DD. Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol.* 1996;156:932-8.
210. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:932-42.
211. Lou J, Dayer JM, Grau GE, Burger D. Direct cell/cell contact with stimulated T lymphocytes induces the expression of cell adhesion molecules and cytokines by human brain microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1996;26:3107-13.
212. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meo G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med.* 2000;342:1560-7.
213. Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol.* 1999;163:1628-35.
214. Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science.* 1999;283:496-7.
215. Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med.* 1999;189:587-92.
216. Mallat M, Houlgatte R, Brachet P, Prochiantz A. Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev Biol.* 1989;133:309-11.
217. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today.* 1997;18:231-40.

218. Marcus BC, Wyble CW, Hynes KL, Gewertz BL. Cytokine-induced increases in endothelial permeability occur after adhesion molecule expression. *Surgery*. 1996;120:411-6; discussion 416-7.
219. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*. 1987;51:813-9.
220. Martin U, Kiessig V, Blusch JH, Haverich A, von der Helm K, Herden T, Steinhoff G. Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet*. 1998;352:692-4.
221. Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, Reiner SL, Thompson CB. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol*. 2000;164:5319-27.
222. Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, Masuzawa T, Suzuki H, Honda M, Yazaki Y, Watanabe E, Luoma J, Yla-Herttuala S, Fraser I, Gordon S, Kodama T. Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3269-74.
223. Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M. Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology*. 1992;76:209-16.
224. Matsuo A, Nakamura S, Akiguchi I. Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-1 in the rat brain: confirmation of expression in various neuronal systems. *Brain Res*. 2000;859:57-71.
225. McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol*. 2000;165:5035-40.
226. McCarron RM, Wang L, Racke MK, McFarlin DE, Spatz M. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*. 1993;43:23-30.
227. McGrath J, Lintz E, Hoffer BJ, Gerhardt GA, Quintero EM, Granholm AC. Adeno-associated viral delivery of GDNF promotes recovery of dopaminergic phenotype following a unilateral 6-hydroxydopamine lesion. *Cell Transplant*. 2002;11:215-27.
228. Melchior B, Remy S, Nerriere-Daguin V, Heslan JM, Soullillou JP, Brachet P. Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. *J Neurosci Res*. 2002;68:284-92.

229. Melchior B, Nerriere-Daguin V, Laplaud DA, Remy S, Wiertlewski S, Neveu I, Naveilhan P, Meakin SO, Brachet P. Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependent neuroprotection. *Exp Neurol*. 2003;183:367-78.
230. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*. 1999;20:469-73.
231. Menei P, Pean JM, Nerriere-Daguin V, Jollivet C, Brachet P, Benoit JP. Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage. *Exp Neurol*. 2000;161:259-72.
232. Michel PP, Hirsch EC, Agid Y. [Parkinson disease: mechanisms of cell death]. *Rev Neurol (Paris)*. 2002;158 Spec no 1:S24-32.
233. Mishra RK, Gardner EL, Katzman R, Makman MH. Enhancement of dopamine-stimulated adenylate cyclase activity in rat caudate after lesions in substantia nigra: evidence for denervation supersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71:3883-7.
234. Molenaar GJ, Hogenesch RI, Sprengers ME, Staal MJ. Ontogenesis of embryonic porcine ventral mesencephalon in the perspective of its potential use as a xenograft in Parkinson's disease. *J Comp Neurol*. 1997;382:19-28.
235. Montero-Menei CN, Sindji L, Pouplard-Barthelaix A, Jehan F, Denechaud L, Darcy F. Lipopolysaccharide intracerebral administration induces minimal inflammatory reaction in rat brain. *Brain Res*. 1994;653:101-11.
236. Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today*. 1996;17:461-6.
237. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-57.
238. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
239. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17:138-46.
240. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998;281:1191-3.

241. Murray AG, Khodadoust MM, Pober JS, Bothwell AL. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity*. 1994;1:57-63.
242. Nakajima K, Tsuzaki N, Nagata K, Takemoto N, Kohsaka S. Production and secretion of plasminogen in cultured rat brain microglia. *FEBS Lett*. 1992;308:179-82.
243. Nakao N, Frodl EM, Duan WM, Widner H, Brundin P. Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12408-12.
244. Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science*. 1995;269:549-52.
245. Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med*. 1997;185:305-16.
246. Nikcevich KM, Gordon KB, Tan L, Hurst SD, Kroepfl JF, Gardinier M, Barrett TA, Miller SD. IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J Immunol*. 1997;158:614-21.
247. Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*. 1996;157:636-42.
248. Norman DJ. Mechanisms of action and overview of OKT3. *Ther Drug Monit*. 1995;17:615-20.
249. Norton SD, Zuckerman L, Urdahl KB, Shefner R, Miller J, Jenkins MK. The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. *J Immunol*. 1992;149:1556-61.
250. Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, Rodriguez ME, Martinez-Lage JM. Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology*. 1989;39:11-9.
251. Ohnishi T, Tamai I, Sakanaka K, Sakata A, Yamashita T, Yamashita J, Tsuji A. In vivo and in vitro evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol*. 1995;49:1541-4.
252. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev*. 1996;59:89-102.

253. Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Tanuma N, Matsumoto Y. Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation: tolerance induction by anti-T-cell antibodies. *J Neurosci Res*. 1997;48:385-96.
254. Olanow CW, Freeman T, Kordower J. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2001;345:146; author reply 147.
255. Olthoff KM, Judge TA, Gelman AE, da Shen X, Hancock WW, Turka LA, Shaked A. Adenovirus-mediated gene transfer into cold-preserved liver allografts: survival pattern and unresponsiveness following transduction with CTLA4Ig. *Nat Med*. 1998;4:194-200.
256. Pakzaban P, Deacon TW, Burns LH, Dinsmore J, Isacson O. A novel mode of immunoprotection of neural xenotransplants: masking of donor major histocompatibility complex class I enhances transplant survival in the central nervous system. *Neuroscience*. 1995;65:983-96.
257. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*. 1997;387:611-7.
258. Panek RB, Lee YJ, Itoh-Lindstrom Y, Ting JP, Benveniste EN. Characterization of astrocyte nuclear proteins involved in IFN-gamma- and TNF-alpha-mediated class II MHC gene expression. *J Immunol*. 1994;153:4555-64.
259. Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E. 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.
260. Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem*. 1990;265:18035-40.
261. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med*. 1997;3:282-6.
262. Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*. 1979;204:643-7.

263. Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, June CH, Racke MK. CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 1996;157:1333-6.
264. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*. 1985;15:313-26.
265. Perry VH, Anthony DC, Bolton SJ, Brown HC. The blood-brain barrier and the inflammatory response. *Mol Med Today*. 1997;3:335-41.
266. Perry VH. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol*. 1998;90:113-21.
267. Perry VH. Persistent pathogens in the parenchyma of the brain. *J Neurovirol*. 2000;6 Suppl 1:S86-9.
268. Peschanski M, Defer G, N'Guyen JP, Ricolfi F, Monfort JC, Remy P, Geny C, Samson Y, Hantraye P, Jeny R, et al. Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain*. 1994;117 (Pt 3):487-99.
269. Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehnström S, Widner H, Lindvall O. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*. 1999;2:1137-40.
270. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestweber D, Butcher EC, Constantin G. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol*. 2002;168:1940-9.
271. Pierson RN, 3rd, Winn HJ, Russell PS, Jr., Auchincloss H, Jr. CD4+ lymphocytes play a dominant role in murine xenograft rejection. *Transplant Proc*. 1989;21:519.
272. Prat A, Biernacki K, Becher B, Antel JP. B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59:129-36.
273. Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*. 2001;36:145-55.
274. Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH. Allograft immune response with sCR1 intervention. *Transpl Immunol*. 1996;4:72-5.

275. Qian D, Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:205-12.
276. Quinonero J, Tchelingierian JL, Vignais L, Foignant-Chaverot N, Colin C, Horellou P, Liblau R, Barbin G, Strosberg AD, Jacques C, Couraud PO. Gene transfer to the central nervous system by transplantation of cerebral endothelial cells. *Gene Ther.* 1997;4:111-9.
277. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:569-81.
278. Rascol O. [Arguments in favor of early treatment of Parkinson's disease with dopaminergic agonists]. *Rev Neurol (Paris).* 1999;155:35-42.
279. Rascol O, Goetz C, Koller W, Poewe W, Sampaio C. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *Lancet.* 2002;359:1589-98.
280. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000;192:295-302.
281. Remy P, Samson Y, Hantraye P, Fontaine A, Defer G, Mangin JF, Fenelon G, Geny C, Ricolfi F, Frouin V, et al. Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients. *Ann Neurol.* 1995;38:580-8.
282. Remy S, Canova C, Daguin-Nerriere V, Martin C, Melchior B, Neveu I, Charreau B, Soullillou JP, Brachet P. Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotransplantation.* 2001;8:136-48.
283. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today.* 2000;21:479-83.
284. Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Kunz J, Vogel W, Hameister H. Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics.* 1995;26:372-8.
285. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 1998;393:474-8.
286. Riley JL, Blair PJ, Musser JT, Abe R, Tezuka K, Tsuji T, June CH. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol.* 2001;166:4943-8.

287. Risau W, Engelhardt B, Wekerle H. Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J Cell Biol.* 1990;110:1757-66.
288. Rosenberg AS, Singer A. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:333-58.
289. Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Bjorklund A. Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci.* 1999;11:1554-66.
290. Rothstein DM, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev.* 2003;196:85-108.
291. Roza AM, Kimura H, Markmann J, Najj A. Effect of prolonged monoclonal antibody administration on cardiac allograft survival in the rat. *Scand J Immunol.* 1989;30:333-8.
292. Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol.* 1997;158:658-65.
293. Sachs C, Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol.* 1975;24:1-8.
294. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12:431-40.
295. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:225-52.
296. Satoh J, Kim SU, Kastrukoff LF, Takei F. Expression and induction of intercellular adhesion molecules (ICAMs) and major histocompatibility complex (MHC) antigens on cultured murine oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res.* 1991;29:1-12.
297. Satoh J, Lee YB, Kim SU. T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture. *Brain Res.* 1995;704:92-6.
298. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int.* 2001;59:3-16.

299. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med*. 1995;181:1869-74.
300. Sayegh MH, Zheng XG, Magee C, Hancock WW, Turka LA. Donor antigen is necessary for the prevention of chronic rejection in CTLA4Ig-treated murine cardiac allograft recipients. *Transplantation*. 1997;64:1646-50.
301. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med*. 1998;338:1813-21.
302. Schmidt RH, Ingvar M, Lindvall O, Stenevi U, Bjorklund A. Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum: neurotransmitter metabolism and [14C]2-deoxy-D-glucose autoradiography. *J Neurochem*. 1982;38:737-48.
303. Schumacher JM, Elias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, Fischman AJ, Thomas C, Feldman RG, Kassissieh S, Raineri R, Manhart C, Penney D, Fink JS, Isacson O. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*. 2000;54:1042-50.
304. Sebille F, Guillet M, Brouard S, Gagne K, Petzold T, Blancho G, Vanhove B, Souillou JP. T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *Am J Transplant*. 2001;1:21-8.
305. Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2000;191:813-22.
306. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*. 1992;42:1328-35.
307. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:116-26.
308. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:385-402.
309. Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M, Kohsaka S. Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett*. 1991;123:229-31.
310. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol*. 1998;10:581-7.

311. Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1994;51:209-20.
312. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990;144:3034-8.
313. Simpson E. Minor transplantation antigens: animal models for human host-versus-graft, graft-versus-host, and graft-versus-leukemia reactions. *Transplantation.* 1998;65:611-6.
314. Sinden JD, Rashid-Doubell F, Kershaw TR, Nelson A, Chadwick A, Jat PS, Noble MD, Hodges H, Gray JA. Recovery of spatial learning by grafts of a conditionally immortalized hippocampal neuroepithelial cell line into the ischaemia-lesioned hippocampus. *Neuroscience.* 1997;81:599-608.
315. Snyder SH, D'Amato RJ. MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. The 1985 George C. Cotzias lecture. *Neurology.* 1986;36:250-8.
316. Soos JM, Ashley TA, Morrow J, Patarroyo JC, Szenté BE, Zamvil SS. Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. *Int Immunol.* 1999;11:1169-79.
317. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-14.
318. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature.* 1988;334:255-8.
319. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 1999;57:563-81.
320. Studer L, Tabar V, McKay RD. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci.* 1998;1:290-5.
321. Sumitran S, Liu J, Czech KA, Christensson B, Widner H, Holgersson J. Human natural antibodies cytotoxic to pig embryonic brain cells recognize novel non-Galalpha1,3Gal-based xenoantigens. *Exp Neurol.* 1999a;159:347-61.
322. Sumitran S, Anderson P, Widner H, Holgersson J. Porcine embryonic brain cell cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Cell Transplant.* 1999b;8:601-10.

323. Sumitran-Holgersson S, Brevig T, Widner H, Holgersson J. Activated porcine embryonic brain endothelial cells induce a proliferative human T-lymphocyte response. *Cell Transplant*. 2003;12:637-46.
324. Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmioli S, Dunnett SB. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 1997;148:135-46.
325. Svenningsson A, Andersen O, Edsbacke M, Stemme S. Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol*. 1995;63:39-46.
326. Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity*. 1999;11:423-32.
327. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192:303-10.
328. Takei K, Nakano Y, Shinozaki T, Toya S, Tsukada Y, Kohsaka S. Immunological rejection of grafted tissue in xenogeneic neural transplantation. *Prog Brain Res*. 1990;82:103-9.
329. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, Melrose J, Brunvand M, Bradshaw J, Ledbetter JA, Linsley PS. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med*. 1993;177:165-73.
330. Tanaka M, Sato A, Makino M, Tabira T. Binding of an SJL T cell clone specific for myelin basic protein to SJL brain microvessel endothelial cells is inhibited by anti-VLA-4 or its ligand, anti-vascular cell adhesion molecule 1 antibody. *J Neuroimmunol*. 1993;46:253-7.
331. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *Faseb J*. 1991;5:2516-22.
332. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002;196:447-57.
333. Thervet E, Legendre C. Les traitements immunosuppresseurs dans les transplantations d'organes solides. *La lettre du Pharmacologue*. 1988;12:198-203. 334. Thomas M, Le WD. Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des*. 2004;10:679-86.

335. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3:541-7.
336. Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*. 1995;373:335-9.
337. Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, Dijkstra CD, Owens T. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol*. 1998;161:3767-75.
338. Traugott U, Lebon P. Interferon-gamma and Ia antigen are present on astrocytes in active chronic multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci*. 1988;84:257-64.
339. Tsicopoulos A, Hamid Q, Varney V, Ying S, Moqbel R, Durham SR, Kay AB. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol*. 1992;148:2058-61.
340. Tsuji A, Tamai I, Sakata A, Tenda Y, Terasaki T. Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*. 1993;46:1096-9.
341. Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei RQ, Gibson ML, Zheng XG, Myrdal S, Gordon D, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:11102-5.
342. Uchida T, Kajiwara K, Ideguchi M, Yoshikawa K, Morioka J, Suzuki M. Co-administration of adenovirus vector expressing CTLA4-Ig prolongs transgene expression in the brain of mice sensitized with adenovirus. *Brain Res*. 2001;898:272-80.
343. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*. 1970;24:485-93.
344. Van Wagoner NJ, Benveniste EN. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1999;100:124-39.
345. Vass K, Lassmann H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol*. 1990;137:789-800.

346. Vella AT, Mitchell T, Groth B, Linsley PS, Green JM, Thompson CB, Kappler JW, Marrack P. CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival in vivo. *J Immunol.* 1997;158:4714-20.
347. Vidovic M, Sparacio SM, Elovitz M, Benveniste EN. Induction and regulation of class II major histocompatibility complex mRNA expression in astrocytes by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol.* 1990;30:189-200.
348. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science.* 1996;273:104-6.
349. Walker WS. Separate precursor cells for macrophages and microglia in mouse brain: immunophenotypic and immunoregulatory properties of the progeny. *J Neuroimmunol.* 1999;94:127-33.
350. Wallace PM, Johnson JS, MacMaster JF, Kennedy KA, Gladstone P, Linsley PS. CTLA4Ig treatment ameliorates the lethality of murine graft-versus-host disease across major histocompatibility complex barriers. *Transplantation.* 1994;58:602-10.
351. Wallace PM, Rodgers JN, Leytze GM, Johnson JS, Linsley PS. Induction and reversal of long-lived specific unresponsiveness to a T-dependent antigen following CTLA4Ig treatment. *J Immunol.* 1995;154:5885-95.
352. Walther M, Popratiloff A, Lachnit N, Hofmann N, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Angelov DN. Exogenous antigen containing perivascular phagocytes induce a non-encephalitogenic extravasation of primed lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2001;117:30-42.
353. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med.* 1996;183:2541-50.
354. Wang YF, Xu AG, Hua YB, Wu WX. Effect of local CTLA4Ig gene transfection on acute rejection of small bowel allografts in rats. *World J Gastroenterol.* 2004;10:885-8.
355. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science.* 1995;270:985-8.
356. Weber CJ, Zabinski S, Koschitzky T, Wicker L, Rajotte R, D'Agati V, Peterson L, Norton J, Reemtsma K. The role of CD4+ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice. *Transplantation.* 1990;49:396-404.

357. Weinstein DL, Walker DG, Akiyama H, McGeer PL. Herpes simplex virus type I infection of the CNS induces major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia. *J Neurosci Res*. 1990;26:55-65.
358. Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R. Cellular immune reactivity within the CNS. *TINS*. 1986; june:271-277.
359. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nunez G, Tang A, Sayegh M, Hancock WW, Strom TB, Turka LA. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med*. 1999;5:1303-7.
360. Wennberg L, Karlsson-Parra A, Sundberg B, Rafael E, Liu J, Zhu S, Groth CG, Korsgren O. Efficacy of immunosuppressive drugs in islet xenotransplantation: leflunomide in combination with cyclosporine and mycophenolate mofetil prevents islet xenograft rejection in the pig-to-rat model. *Transplantation*. 1997;63:1234-42.
361. Wennberg L, Czech KA, Larsson LC, Mirza B, Bennet W, Song Z, Widner H. Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation*. 2001;71:1797-806.
362. Wenning GK, Odin P, Morrish P, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Brown R, Gustavii B, Hagell P, Jahanshahi M, Sawle G, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1997;42:95-107.
363. Widner H, Moller G, Johansson BB. Immune response in deep cervical lymph nodes and spleen in the mouse after antigen deposition in different intracerebral sites. *Scand J Immunol*. 1988;28:563-71.
364. Widner H, Tetrud J, Rehncrona S, Snow B, Brundin P, Gustavii B, Bjorklund A, Lindvall O, Langston JW. Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med*. 1992;327:1556-63.
365. Williams K, Jr., Ulvestad E, Cragg L, Blain M, Antel JP. Induction of primary T cell responses by human glial cells. *J Neurosci Res*. 1993;36:382-90.
366. Williams K, Ulvestad E, Antel JP. B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. *Eur J Immunol*. 1994;24:3031-7.
367. Williams K, Dooley N, Ulvestad E, Becher B, Antel JP. IL-10 production by adult human derived microglial cells. *Neurochem Int*. 1996;29:55-64.

368. Williams A, Van Dam AM, Ritchie D, Eikelenboom P, Fraser H. Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res.* 1997;754:171-80.
369. Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, Charlton HM. Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience.* 1996;70:775-89.
370. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61:364-70.
371. Xiao BG, Zhang GX, Ma CG, Link H. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1)-mediated inhibition of glial cell proliferation and down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are interrupted by interferon-gamma (IFN-gamma). *Clin Exp Immunol.* 1996;103:475-81.
372. Xiao BG, Link H. Immune regulation within the central nervous system. *J Neurol Sci.* 1998;157:1-12.
373. Yamada K, Sachs DH, DerSimonian H. Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J Immunol.* 1995;155:5249-56.
374. Yan Q, Matheson C, Lopez OT. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature.* 1995;373:341-4.
375. Yang Z, Rostami S, Koeberlein B, Barker CF, Naji A. Cardiac allograft tolerance induced by intra-arterial infusion of recombinant adenoviral CTLA4Ig. *Transplantation.* 1999;67:1517-23.
376. Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayaishi O. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch Biochem Biophys.* 1980;203:343-51.
377. Yurek DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of dopaminergic neurons in transplants of fetal ventral mesencephalic tissue. *Exp Neurol.* 1998;153:195-202.
378. Zawada WM, Zastrow DJ, Clarkson ED, Adams FS, Bell KP, Freed CR. Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. *Brain Res.* 1998;786:96-103.

379. Zhang SC, Goetz BD, Duncan ID. Suppression of activated microglia promotes survival and function of transplanted oligodendroglial progenitors. *Glia*. 2003;41:191-8.
380. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002;174:11-20.
381. Zhuang X, Silverman AJ, Silver R. Brain mast cell degranulation regulates blood-brain barrier. *J Neurobiol*. 1996;31:393-403.
382. Zurn AD, Widmer HR, Aebischer P. Sustained delivery of GDNF: towards a treatment for Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;36:222-9.

RESUME

La xénotransplantation de neurones fœtaux porcins constitue une approche alternative aux allotransplantations de neurones fœtaux humains dans la maladie de Parkinson. De telles greffes sont généralement l'objet d'un rejet immunitaire médié par les cellules T et sont peu sensibles aux traitements immunosuppresseurs conventionnels.

Nous avons étudié l'immunogénicité des cellules fœtales greffées en comparant le rejet des neurones porcins à celui des cellules endothéliales aortiques porcines implantées dans le striatum de rat. Celles-ci induisent une forte réponse macrophagique qui conduit très rapidement à la destruction du greffon. L'étude du tissu mésencéphalique fœtal et le suivi des cellules mésencéphaliques après leur greffe révèlent la présence de cellules endothéliales porcines, mises en évidence par l'expression de l'intégrine $\beta 1$, qui pourraient contribuer à déclencher le mécanisme de rejet. Cependant les cellules neuronales embryonnaires expriment temporairement cette même intégrine, qui pourrait alors constituer un xénoantigène impliqué dans le rejet des xéno greffes neuronales.

Dans le but de favoriser le maintien de la xéno greffe, nous avons généré des porcs transgéniques dont les neurones, greffés dans le striatum de rat, expriment *in situ* la molécule immunosuppressive CTLA4-Ig. Ces neurones réduisent de 50% la réponse proliférative des lymphocytes T humains *in vitro*, mais cet effet immunosuppresseur n'est pas suffisant *in vivo* pour retarder le rejet des xéno greffes chez le rat. Pour poursuivre ce travail, d'autres expérimentations sont proposées, qui visent à améliorer l'efficacité d'une production intracérébrale de CTLA4-Ig.

MOTS CLES : Xénotransplantation - Système nerveux central (SNC) - Maladie de Parkinson - Porc - Neurones - Cellules endothéliales - Intégrine $\beta 1$ - CTLA4-Ig - Transgène - Cellules T

ABSTRACT

Xenotransplantation of porcine fetal neurons provides an alternative approach to the allotransplantation of human fetal neurons for the treatment of Parkinson's disease. Such grafts are generally rejected by a T cells mediated process which is fairly resistant to conventional immunosuppressive treatments.

We have studied the immunogenicity of grafted fetal cells by comparing the rejection of porcine neurons with aortic endothelial cells implanted into the rat striatum. These latter cells induce a strong macrophagic reaction which results in a rapid rejection. The study of mesencephalic tissue and the following of mesencephalic cells after their graft, reveal the presence of endothelial cells expressing $\beta 1$ integrin whose may contribute to the initiation of rejection. However, porcine fetal neuronal cells express temporarily this integrin which may constitute a xenoantigen involved in the neuronal xenografts rejection. In an attempt to delay the rejection process, we have generated transgenic pigs whose neurons express the immunosuppressive protein CTLA4-Ig *in situ* after their graft into the rat striatum. *In vitro*, these neurons reduce the proliferative response of human T lymphocyte by 50%, but they appear insufficient to influence the rejection of xenografts implanted into the rat brain. We propose several experimental approaches which might improve the efficacy of the intracerebral production of CTLA4-Ig.

KEY WORDS : Xenotransplantation - Parkinson's disease - Central nervous system (CNS) - Pig - Neurons - Endothelial cells - $\beta 1$ integrin - CTLA4-Ig - Transgene - T cells
