

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires
impliqués dans le rejet de xénogreffes de neurones
porcins implantés dans le cerveau du rat**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Médecine

Spécialité : Neuroimmunologie

Présentée et soutenue publiquement par

MELCHIOR Benoît

le 19 mai 2003, devant le jury ci-dessous :

Président : Dr Marc PESCHANSKI, Directeur de Recherche, INSERM U421, Créteil

Rapporteurs Pr Paul HEUSCHLING, Laboratoire de Neurobiologie, Luxembourg
Dr Monique LAFON, Unité de Neuroimmunologie Virale, Institut Pasteur

Examineurs Dr Serge NATAF, Maître de conférence, INSERM U433, Lyon
Pr Philippe DAMIER, Chef de service Neurologie, Nantes

Directeur de Thèse : Dr Philippe BRACHET

INSERM U437, Directeur : Pr Jean-Paul SOULILLOU

A ma mère

Remerciements

J'adresse tout d'abord ma profonde reconnaissance à Philippe Brachet pour m'avoir accueilli, supporté, soutenu, et guidé tout au long de cette thèse. Un grand Merci pour avoir partagé votre inépuisable culture.

Je remercie vivement Jean-Paul Soullou pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Pour toujours avoir su consacrer du temps à la discussion malgré un emploi du temps chargé.

Je tiens à remercier le Docteur Monique Lafon et le Professeur Paul Heuschling d'avoir accepté de consacrer du temps pour juger ce travail.

Je remercie aussi le Docteur Marc Peschanski, le Docteur Serge Nataf et le Professeur Philippe Damier d'avoir accepté de participer à ce jury.

Merci à Philippe Naveilhan et Isabelle Neveu pour m'avoir toujours accompagné et aidé. Merci d'avoir bien souvent su débloquer des situations difficiles.

Je remercie l'ensemble de l'équipe « Neuro » de l'unité, et plus particulièrement Véronique dont je serais à jamais reconnaissant pour la réussite de la majeure partie des manip. Je remercie la bonne humeur générale de l'équipe, merci aux blondes (Caro ou « Crotte », Delphine, Dom et encore Véro), merci aux guys (Duss, Vincent et les petits nouveaux) d'avoir été plus que des collègues pendant ces 3 années. N'oublions pas Solène, mi-blonde, mi-guy.

Merci à Cécile et Séverine, à celles qui sont parties et qui m'ont tout appris.

Merci au reste de l'unité pour avoir tous contribué à la bonne humeur générale du labo, merci à Gro2, à Jul... à tous les autres... et en particulier à Gal pour les corrections apportées à ce manuscrit.

Merci aux 1172 rats, à la quarantaine de « cochettes » et à leurs embryons, pour avoir fait don de leur corps à la Science... ou plutôt... à nos manip...

Enfin Merci à Véro R. pour la relecture de cette thèse et pour son soutien moral.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

AVANT PROPOS

9

INTRODUCTION

I - Immunologie du système nerveux central

1.1 Les composants cellulaires et leur immunophénotype dans le SNC sain

11

- 1.1.1. Les neurones
- 1.1.2. Les cellules gliales :
 - 1.1.1.1 Oligodendrocytes
 - 1.1.1.2 Astrocytes
 - 1.1.1.3 Microglie et macrophages périvasculaires
 - 1.1.1.4 Cellules épendymaires
- 1.1.3. La barrière hémato-encéphalique

1.2 Le statut immunoréprimé du SNC : isolement anatomique ou tolérance active ? 20

- 1.2.1 La trafic leucocytaire dans le SNC sain
- 1.2.2 Les facteurs moléculaires de l'immunosuppression du SNC
- 1.2.3 Un drainage lymphatique particulier
- 1.2.4 Utilisation des privilèges immuns du SNC comme outil de tolérance systémique

1.3 Les mécanismes d'inflammation dans le SNC

27

- 1.3.1 Réactions inflammatoires intrinsèque au SNC et immunité innée
 - 1.3.1.1 Réaction astrocytaire
 - 1.3.1.2 Activation microgliale
 - 1.3.1.3 Les polymorphonucléaires, le complément et les cellules NK dans le SNC
- 1.3.2 Immunité spécifique au sein du SNC
 - 1.3.2.1 Quelles CPA dans le SNC ?
 - 1.3.2.2 Mécanisme d'action des lymphocytes T dans le SNC
 - a. Activation de la BHE et infiltration lymphocytaire
 - b. La présentation antigénique
 - b1. Le complexe CMH/peptide
 - b2. Le récepteur T (TCR), son répertoire et le complexe TCR/CD3
 - b3. Les corécepteurs et les molécules de costimulations
 - 1.3.2.3 Les cytokines et la polarisation Th1/Th2
 - 1.3.2.4 La réponse T cytotoxique
 - 1.3.2.5 La réponse B dans le SNC

II - Modèles de greffes appliquées à la maladie de Parkinson

2.1 La maladie de Parkinson et les principales thérapeutiques

46

- 2.1.1 Pathologie, causes
- 2.1.2 Modèle animaux
- 2.1.3 Interventions thérapeutiques
 - 2.1.3.1 Efficacité relative des traitements pharmacologiques
 - 2.1.3.2 Interventions chirurgicales
 - 2.1.3.3 Stratégies de neuroprotection
 - 2.1.3.4 Apport de dopamine par autogreffe

2.2 Les cas d'allogreffes

51

- 2.2.1 Données expérimentales
- 2.2.2 Application de l'allogreffe en clinique
- 2.2.3 Limitations de l'allotransplantation

2.3 La xénogreffe	54
2.3.1 Le porc comme donneur	
2.3.1.1 Xénogreffes concordantes ou discordantes	
2.3.1.2 Propriété du tissu porcin	
2.3.1.3 Safety of intracerebral xenografts : PERV and others infections	
2.3.2 La protection du greffon	
2.3.3 Effets restaurateurs de la xénogreffe neuronale	
2.3.4 Immunologie du rejet de xénogreffe	
2.3.4.1 Absence de rejet hyperaigüe	
2.3.4.2 Immunogénicité du greffon	
2.3.4.3 Rôle secondaire du complément et des immunoglobulines	
2.3.4.4 Les cellules NK en xénotransplantation	
2.3.4.5 Cas des lymphocytes $\gamma\delta$	
2.3.4.6 Implication majeure des lymphocytes $\alpha\beta$	
 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	 64
 MATERIELS ET METHODES	 66
1. Préparations cellulaires	
2. Animaux et procédures chirurgicales	
3. Immunohistochimie	
4. Extraction d'ARN et rétrotranscription	
5. Analyse quantitative par PCR en temps réel (TaqMan®)	
6. Analyse du répertoire du TCR β .	
7. Combinaison des analyses qualitatives et quantitatives du répertoire : le TcLandscape®	
 RESULTATS	 75
1. Description immunohistochimique et cinétique d'infiltration dans deux cas de xénotransplantation de cellules porcines implantées dans le striatum du rat	
1.1 Xénogreffes d'endothélium aortique porcin dans le striatum du rat	
1.2 Xénogreffes neuronales porcines implantées dans le striatum du rat	
1.3 Les PAEC expriment de fortes quantités d'IL-8 au moment de leur implantation	
1.4 Discussion 1	
2. Cinétique d'expression des gènes de cytokines au cours du rejet de xénogreffes neuronales	
2.1 Cinétique d'infiltration lymphocytaire	
2.2 Cinétique d'expression des lymphokines	
2.3 Expression des chimiokines MCP-1 et RANTES	
2.4 Discussion 2	
3. Analyse du répertoire des lymphocytes T infiltrants et périphériques au cours du rejet xénogreffes neuronales	
3.1 Choix des échantillons	
3.2 Etudes quantitatives et qualitatives du segment β du TCR dans la greffe	
3.3 Etude du répertoire en périphérie	
3.4 Discussion 3	
 PERSPECTIVES	 97
 BIBLIOGRAPHIE	 101
 ADDENDUM	 149
Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependant neuroprotection. <i>Exp Neurol, In press.</i>	

Table des illustrations

- Fig. 1.** Les composants cellulaires du tissu cérébral
- Fig. 2.** Connexions et fonctions astrocytaires
- Fig. 3.** Section d'un microcapillaire cérébral
- Fig. 4.** Pénétration des lymphocytes T dans le système nerveux central sain
- Fig. 5.** Schéma illustrant le turn over du liquide interstitiel cérébral et du LCR
- Fig. 6.** Les différents états de la microglie au cours de l'inflammation
- Fig. 7.** Recrutement des lymphocytes circulants au niveau de la BHE
- Fig. 8.** Réarrangements des chaînes α et β du TCR
- Fig. 9.** Schéma des principales voies de transduction induites par le complexe TCR/CD3
- Fig.10.** Molécules impliquées dans l'interaction entre le lymphocyte T et la CPA
- Fig.11.** Importance des molécules de costimulation
- Fig.12.** Représentation schématique de l'induction et de la régulation des cellules Th1 et Th2
- Fig.13.** Trois voies différentes sont utilisées par les CTL pour détruire les cellules cibles
- Fig.14.** Dégénérescence de la voie nigro-striée dans la maladie de Parkinson
- Fig.15.** Stratégies de neuroprotection dans la maladie de Parkinson
- Fig.16.** Détection en temps réel des ADNc (TaqMan®)
- Fig.17.** Amplification spécifique d'une famille V β par PCR
- Fig.18.** Principe de l'analyse du répertoire par le logiciel Immunoscope®
- Fig.19.** Le Tlandscape®
- Fig.20.** Rejet de xélogreffes intrastriales de cellules endothéliales porcines
- Fig.21.** Rejet de xélogreffes de neurones mésencéphaliques fœtaux porcins
- Fig.22.** Traçage moléculaire du tissu porcin implanté dans le striatum du rat
- Fig.23.** Détection des transcrits d'ARNm d'IL-8 porcine par PCR en temps réel
- Fig.24.** Cinétique d'expression de la chaîne β du TCR
- Fig.25.** Immunohistochimie des greffes de neurones fœtaux au 28^{ème} jour post-transplantation
- Fig.26.** Cinétique d'expression des transcrits de gènes de cytokines
- Fig.27.** Cinétique d'expression des transcrits des gènes de chimiokines RANTES et MCP-1
- Fig.28.** Tlandscape sur les striata infiltrés
- Fig.29.** Moyennes des altérations des longueurs de la région CDR3 par famille V β
- Fig.30.** Profil d'altération des longueurs de la région CDR3 du gène V β 20 des striata infiltrés
- Fig.31.** Comparaison des profils d'altérations du CDR3 dans les striata infiltrés et en périphérie
- Fig.32.** Comparaison, par organe, des moyennes des altérations de l'ensemble des familles V β

Tableau 1. Types de récepteurs immunologiques retrouvés sur la microglie au repos

Tableau 2. Liste « non exhaustive » des principales molécules impliquées dans la modulation du statut immunologique du SNC

Tableau 3. Listes des anticorps utilisés en immunohistochimie

Tableau 4. Listes des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR quantitative

En addendum :

Fig.1. Expression of TrkA in E293 and nnr5 cells

Fig.2. RNase protection assay of *trkA* transcripts

Fig.3. Detection of TrkA or c-Myc 6 weeks following unilateral stereotaxic injection of rAAV TrkA_{myc}

Fig.4. Expression of TrkA in TH⁺ neurons. Confocal microscopy.

Fig.5. Striatofuge transport of [¹²⁵I] NGF

Fig.6. Neuroprotection associated with rAAV TrkA_{myc} administration

ABREVIATIONS

6-OHDA	: 6-hydroxydopamine
αMSH	: α melanocyte-stimulating hormone
ACAID	: anterior chamber associated immune deviation
ACTH	: adrenocorticotrop hormone
ADCC	: antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	: adenosine monophosphate cyclique
APC	: cellule présentatrice d'antigène
APP	: amyloid precursor protein
ARNm	: messenger de l'acide ribonucléique
ATP	: adénosine triphosphate
BDNF	: brain derived neurotrophic factor
BHE	: barrière hémato-encéphalique
BRAID	: brain associated immune deviation
C1-inh	: inhibiteur du fragment C1 du complément
CD	: cellule dendritique
CDR	: complementary determining region
CGRP	: calcitonin-gene related peptide
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
COIIp	: cytochrome C oxydase II porcine
CR3	: complement receptor 3 (CD11b)
CRH	: corticotropin-releasing hormone
CsA	: ciclosporine A
CSF	: colony-stimulating factor
CTL	: cytotoxic T lymphocyte (CD8 ⁺)
CTLA-4	: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CD152)
DCLN	: ganglions lymphatiques cervicaux profonds
dNTP	: désoxyribonucléotides-triphosphates
DTH	: hypersensibilité retardée
EAE	: encéphalomyélite allergique expérimentale
EGF	: epithelial growth factor
FGF	: fibrillary growth factor
GDNF	: glial derived neurotrophic factor
GFAP	: glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	: granulocyte-macrophage-CSF
HPRT	: hypoxanthine phosphoribosyl transferase
IFN	: interféron
IL	: interleukine
IP10	: gamma-interferon-inducible protein 10
IRM	: imagerie par résonance magnétique
LCR	: liquide céphalo-rachidien

LFA : lymphocyte function-associated antigen
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocyte T
MBP : protéine basique de la myéline
McP : membrane cofactor protein
MCP : monocyte chemoattractant protein
M-CSF : macrophage-CSF
MEC : matrice extra-cellulaire
MIP : macrophage inflammatory protein
MOG : myéline oligodendrocytaire
MP : maladie de Parkinson
MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MV : mésencéphale ventral
NA : noradrénaline
NF κ B : Nuclear factor- κ B
NGF : nerve growth factor
NK : cellule tueuse (natural killer)
NO : monoxyde d'azote
NT-3 : neurotrophine-3
PAEC : cellules endothéliales aotriques porcines
PBL : lymphocytes du sang
PBS : tampon phosphate salin
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PDGF : platelet derived growth factor
PERV : rétrovirus porcin endogène
PET : tomographie par émission de positron
PVM : macrophage périvasculaire
RANTES: regulated on activation normal T-cell expressed
RT : retrotranscription
SEP : sclérose en plaque
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SVF : sérum de veau fœtal
TCR : recepteur des lymphocytes T
TGF : transforming growth factor
Th : lymphocyte T auxilliaire (helper)
TH : tyrosine hydroxylase
TNF : tumour necrosis factor
VIP : vasoactive intestinal peptide
XAN : xenoanticorps naturels

Avant propos

Le système nerveux et le système immunitaire interagissent selon des règles particulières qui constituent une régionalisation du fonctionnement du système immunitaire, nommé « privilège immunitaire ». Pour réaliser ces fonctions, les composants cellulaires et moléculaires du système immunitaire doivent apprendre quelles sont les entités potentiellement dangereuses qui existent dans le système nerveux central (SNC), sélectionner le mode de réponse approprié, permettre l'accès au SNC, et enfin, isoler et éradiquer le danger.

Bien que le système immunitaire défende le SNC contre les infections, il sécrète aussi des substances capables de tuer nos irremplaçables cellules nerveuses : les neurones. L'organisme minimise cette destruction en restreignant le trafic des cellules immunitaires au travers des vaisseaux sanguins qui irriguent le cerveau. Aussi, les réponses immunitaires qui surviennent au sein du SNC sont, en règle générale, d'amplitude moindre qu'en périphérie. Le SNC est ainsi très largement perçu comme un sanctuaire immunologique, ce qui est loin d'être exact.

Dès le milieu du XX^e siècle, un ensemble d'études utilisant des tumeurs transplantables a révélé le caractère « immuno-privilégié » du tissu nerveux : les greffes de tumeurs ou de tissus embryonnaires persistent plus longtemps dans le parenchyme nerveux qu'en périphérie (Medawar, 1948). D'un point de vue immunologique, il a d'abord été considéré que les greffons intracérébraux persistent dans le parenchyme nerveux, non par le fait d'un état de tolérance, mais parce que leur présence est ignorée. Ce statut immunologique particulier est la conséquence de caractéristiques anatomiques particulières, comme la présence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) et l'absence d'un drainage lymphatique conventionnel, mais il résulte aussi de nombreux facteurs cellulaires et moléculaires qui freinent les réponses immunitaires. C'est grâce à l'existence de mécanismes régulateurs multiples, que l'allotransplantation de cellules neuronales fœtales a été envisagée en clinique, dans le cas d'affections neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson ou de Huntington. Pourtant, le potentiel immunosuppresseur du SNC peut être insuffisant dans certaines circonstances : c'est ainsi que l'utilisation de transplants xénogéniques

conduit généralement à un phénomène de rejet. Il apparaît donc que la connaissance approfondie des mécanismes gouvernant les réponses immunitaires dans le tissu nerveux est nécessaire pour développer à bon escient de nouvelles approches thérapeutiques, en particulier celles faisant appel à la xénotransplantation.

Certains composants du système immunitaire, comme les lymphocytes T (LT), paraissent essentiels dans le processus de rejet de xénogreffes. C'est pourquoi la présente étude a tenté d'expliquer de quelles manières les lymphocytes, depuis leur lieu de résidence dans les tissus périphériques, pouvaient être engagés comme effecteurs dans le SNC. Nous évoquerons aussi l'afférence antigénique, c'est à dire les possibilités de reconnaissance et de transport des antigènes du transplant depuis le SNC jusqu'au système immunitaire systémique, un circuit qui pourrait être essentiel dans les interactions neuro-immunologiques.

Immunologie du système nerveux central

1.1 Les composants cellulaires et leur immunophénotype dans le SNC sain

La fonction du système nerveux est de percevoir les stimuli provenant à la fois des milieux intérieurs et extérieurs. Ceux-ci sont ensuite analysés et intégrés pour provoquer des réponses adaptées et coordonnées au niveau des différents organes effecteurs. Le système nerveux est constitué d'un réseau intercommunicant de cellules ultra-spécialisées, les neurones, qui constituent la plupart des récepteurs sensoriels, les voies de conduction et les lieux d'intégration et d'analyse.

Le SNC est organisé en substance blanche et substance grise, disposées autour des cavités ventriculaires. La substance grise est principalement constituée par les corps cellulaires des neurones et est peu vascularisée, tandis que la substance blanche comporte surtout des faisceaux de fibres nerveuses, dont les lipides de la myéline qui les recouvrent lui donnent son aspect blanchâtre. La vascularisation y est plus développée mais, par la présence de la BHE, reste toujours soumise à des règles de perméabilité spécifiques au SNC. Cependant, histologiquement, tout le système nerveux se compose essentiellement de neurones, seuls varient leur arrangement et leur tissu de soutien, la glie, qui est composée de 4 types cellulaires : oligodendrocytes, astrocytes, cellules épendymaires et cellules microgliales, ces dernières ayant la particularité d'avoir une origine hématopoïétique.

1.1.1 Les neurones

Les neurones sont des cellules hautement différenciées, spécialisées dans la communication intercellulaire et dont la disparition est à l'origine de nombreuses pathologies dont les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer. S'ils sont indirectement l'objet d'attaques lors de maladies auto-immunes, ils sont immunologiquement défavorables à toute action du système immunitaire. Leur

haut degré de spécialisation est responsable de la perte de nombreux marqueurs immunologiques. Cette absence est surtout le fait d'une suppression active due à l'activité électrique des cellules nerveuses. Ainsi les dommages du système nerveux se traduisent par un blocage de l'activité électrique qui entraîne l'expression de certaines molécules de l'immunité sur les neurones et les cellules gliales voisines (Neumann et al., 1995 ; Neumann et Wekerle, 1998). Les neurones ont donc un phénotype qui dépend de leur morphologie et du type de neurotransmetteurs qu'ils sécrètent. Ils sont immunologiquement inertes et nous verrons que par la synthèse de neurotransmetteurs agissant sur les cellules microgliales, ils peuvent même limiter la réponse inflammatoire dans le cerveau.

1.1.2. Les cellules gliales

C'est le pathologiste allemand Rudolf Virchow qui, en 1846, fut à l'origine du concept de glie après avoir décrit ce qu'il appelait un *Nerven Kitt*, c'est à dire un mastic ou une substance assimilée à de la glue (d'où le terme glie). La glie comprend toutes les cellules du SNC autres que les neurones. Ces cellules très ramifiées constituent presque la moitié de la masse totale du SNC qui contient donc peu de matériel extracellulaire. La glie a des relations étroites et essentielles avec les neurones, leur assurant un support mécanique et métabolique. On distingue quatre types principaux de cellules gliales : les oligodendrocytes, les astrocytes, la microglie et les cellules épendymaires (Fig. 1).

1.1.2.1 Les oligodendrocytes :

Les oligodendrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses de la substance blanche. Leur seule fonction reconnue est la myélinisation des neurones dans le SNC ; c'est à dire procurer une gaine de protection électrochimique autour de certains axones de la substance blanche, de manière à augmenter la vitesse de propagation des potentiels d'action le long de la fibre. Un seul oligodendrocyte peut être responsable de la myélinisation de plus de 50 fibres nerveuses. C'est cette caractéristique qui les place au centre des maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaque (SEP). L'étude de l'étiologie de la SEP et de son modèle animal le plus proche,

l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), a montré que les oligodendrocytes étaient loin d'être des acteurs du système immunitaire. En effet, aucun marqueur de type immunologique, telles que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), n'est retrouvé sur les oligodendrocytes dans un cerveau sain. A l'inverse, les protéines de la myéline telles la protéine basique de la myéline (MBP) ou la myélin-oligodendrocytaire (MOG) reconnues spécifiquement par certains anticorps et lymphocytes T activés, en font une cible privilégiée de la réponse immune adaptative.

1.1.2.2 Les astrocytes :

Ce sont les méthodes d'imprégnation d'histologie qui ont révélé l'existence de cellules gliales en forme d'étoile, d'où leur nom (Dieters, 1865). Ces cellules, qui sont les composants cellulaires les plus représentés dans le cerveau (elles représentent plus de dix fois le nombre de neurones et occupent près d'un tiers du volume du cortex cérébral), ont des prolongements multiples occupant la majeure partie des espaces séparant les neurones, et se terminent par des expansions sur les membranes basales des capillaires, les pieds périvasculaires, qui jouent un rôle déterminant dans l'étanchéité de la BHE. D'autres prolongements se terminent par apposition étroite sur les régions non synaptiques des neurones. Par ces caractéristiques anatomiques, il a été très vite considéré que les astrocytes avaient un rôle d'intermédiaire dans les échanges métaboliques entre les neurones et le sang (Golgi, 1903). Mais ils sont aussi le support architectural des neurones, jouent un rôle important dans la réparation des lésions, la protection neuronale et peuvent aussi contrôler les mécanismes de l'inflammation dans le SNC (Fig. 2).

Les astrocytes forment une population apparemment hétérogène car ils diffèrent d'une région du cerveau à l'autre, tant par leur morphologie que par leur capacité à répondre à l'inflammation (pour revue : Lafont et Prochiantz, 1994). En fait, il est probable qu'il y ait autant de types d'astrocytes qu'il existe de types de neurones puisqu'ils paraissent s'adapter aux compétences neurochimiques et aux variétés morphologiques des neurones qu'ils protègent, et participent également au métabolisme de certains neuromédiateurs. En rapport avec notre modèle d'étude, il est intéressant de noter que les astrocytes du mésencéphale permettent d'induire une arborisation extensive des

neurones dopaminergiques, alors que les astrocytes striataux ont un effet limité, induisant une longue et unique extension neuritique (Denis-Donini et al., 1984). Cette notion paraît largement généralisable, puisqu'il semble que les astrocytes situés dans des aires cérébrales différentes exercent une influence déterminante sur la différenciation des cellules souches neuronales (pour revue : Taupin et Gage, 2002).

Il a été décrit que des excès de concentration de glutamate ou de neuropeptides dans l'environnement peuvent accroître la capacité des astrocytes à exprimer des marqueurs immunologiques tels que la molécule du CMH de classe II (Lee et al, 1992 ; Frohman et al., 1988). Cependant, ils sont également capables d'accroître leur production de facteurs neurotrophiques, lesquels assurent la survie et la régénération neuronale. De ce fait, ils participent plus au maintien d'une homéostasie neuroimmunologique qu'au développement de réponses immunes spécifiques.

1.1.2.3 La microglie :

Les cellules microgliales sont des petites cellules, relativement peu nombreuses, d'origine mésenchymateuse, immigrées dans le SNC au cours du développement fœtal. Lors de processus inflammatoires, les cellules microgliales, qui forment à l'âge adulte un vaste réseau de défense du tissu nerveux, peuvent se transformer en cellules phagocytaires amiboïdes. Cette idée est née au début du XXe siècle, des observations de Pio del Rio Hortega, qui constata qu'après lésion du cerveau, certaines cellules ramifiées du SNC pouvaient réagir et reprendre leur forme ronde et immature qu'elles présentent dans le cerveau en cours de développement. Ces cellules ressemblent alors aux macrophages présents hors du SNC, or del Rio Hortega savait que lorsque les macrophages détectent une lésion ou une infection, ils migrent vers les tissus endommagés, prolifèrent et phagocytent les cellules lésées. Selon lui, les changements de morphologie des cellules microgliales matures correspondent à une métamorphose macrophagique et il postula que les cellules microgliales sont les macrophages du cerveau (del Rio Hortega, 1932). Par la suite, c'est l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui permit à l'équipe de Perry de mettre en évidence des éléments en faveur du rôle immunitaire des cellules microgliales (Perry et al., 1985).

Bien qu'ayant des caractéristiques similaires, les cellules microgliales qui occupent autour de 10% des cellules gliales, n'ont pas la même morphologie dans tout le SNC (Lawson et al., 1990, 1993), indiquant qu'il peut y avoir des facteurs locaux qui influencent cette différenciation. Elles sont ainsi caractérisées par une différence d'expression des molécules de CMH de classe II, qui, selon les espèces, reste à un taux basal dans le parenchyme, mais est plus prononcée en se rapprochant de la barrière hémato-encéphalique. A l'inverse, l'expression de récepteurs de la réponse immune tels que TREM-2 (Triggering Receptor Express on Myeloid cells-2) est plus faible près de la barrière, une caractéristique qui peut être interprétée comme un obstacle à une activation immune par inadvertance (Schmid et al., 2002).

A l'état de repos, la microglie est décrite comme sécrétant des cytokines immunosuppressives comme le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF β 1 ; Kiefer et al., 1995). En règle générale, de nombreux marqueurs leucocytaires, et même ceux restreints aux macrophages, ont des degrés d'expression très faibles sur la microglie au repos (Tableau 1), reflétant le microenvironnement du CNS (Perry et Gordon, 1987 ; Streit, 2002). C'est le cas des molécules de CMH, du leukocyte common antigen (LCA), une tyrosine phosphatase aussi connue sous le nom de CD45, autant que du récepteur Fc, ou des marqueurs CD4 et F4/80 murins (Sedgwick et al., 1991b ; Streit et al., 1999 ; Kreutzberg, 1996). Il apparaît, en fait, qu'une grande partie des marqueurs macrophagiques ne sont pas retrouvés sur la microglie, et à l'inverse, tous les marqueurs de la microglie sont exprimés par les macrophages (Matyszak et al., 1992). Toutefois, dans les cerveaux âgés, la microglie paraît plus activée : les molécules de classe II, CD11b (CR3), CD45 et CD4 sont plus nettement détectables (Perry et al., 1993). De même, le marqueur ED-1, qui reconnaît spécifiquement un antigène de la membrane lysosomale présent sur tous les macrophages au cours du développement, est absent de la microglie adulte au repos, puis réexprimé dans le cerveau âgé (Sminia et al., 1987). Ainsi, malgré une origine commune avec les macrophages, les cellules microgliales quiescentes se caractérisent par une perte de marqueurs immunologiques. Cependant lors de leur activation, elles peuvent rétablir une partie de cette expression, migrer, proliférer, phagocyter les débris cellulaires (*Cf. 1.3.1.2 Activation microgliale*) et même participer à la réponse immune adaptative (*Cf. 1.3.2.1 Quelles APC dans le CNS?*).

Le cas des macrophages périvasculaires (PVM)

En plus de la microglie, il existe une population de macrophages associée au réseau vasculaire du SNC. Ces PVM, qui n'appartiennent pas proprement dit à la glie, sont insérés dans la membrane basale entourant les vaisseaux et sont adjacents à l'endothélium (Graeber et al., 1989 ; Gehrmann et al., 1995). Il leur manque la ramification caractéristique de la microglie, mais ils partagent pourtant une origine commune comme cela a été montré dans des expériences basées sur des moelles osseuses chimériques (Hickey et Kimura, 1988).

Au contraire de la microglie, ces cellules expriment une grande variété de marqueurs de type macrophagique (pour revue : Williams et al., 2001). Les PVM expriment l'antigène ED-2 (Graeber et al., 1989 ; Angelov et al., 1996) et un certain nombre d'entre eux expriment constitutivement la molécule de CMH de classe II (Streit et al., 1989) et la molécule de costimulation B7-2, alors que l'expression de la molécule B7-1 nécessite des conditions inflammatoires (Williams et al., 1994). Ils expriment en plus, le récepteur d'ébouage (scavenger), la molécule CD45 (Sedgwick et al., 1991b ; Ulvestad et al., 1994), le co-récepteur CD4 et ont une activité phagocytaire (Mato et al., 1996).

D'autres macrophages ont été identifiés au niveau des méninges, dans les parois des ventricules et, dans une moindre mesure, dans le stroma du plexus choroïdien. Cependant ceux-ci ont un phénotype comparable aux macrophages du système immunitaire périphérique et la molécule de classe II est facilement détectable.

Aussi, nous verrons dans le chapitre consacré à l'inflammation que par leurs caractéristiques immunologiques favorables et leur proximité avec la barrière et le milieu extérieur, les PVM sont des acteurs importants lors d'une inflammation du SNC. Ainsi, dans le contexte d'une réponse spécifique incluant une présentation antigénique, les LT activés, qui ont la capacité de franchir une BHE intacte, rencontreront en premier ces macrophages lorsqu'ils traverseront l'endothélium vasculaire cérébral.

1.1.2.4 Les cellules épendymaires

Elles forment un épithélium simple, cubique, bordant les ventricules et le canal médullaire. Contrairement aux autres épithéliums cérébraux, ces cellules ne reposent pas sur une lame basale, mais se ramifient directement dans la couche de prolongements des astrocytes. Au pôle apical, elle peuvent porter des cils en nombre variable qui joueraient un rôle dans la propulsion du liquide céphalo-rachidien (LCR) à l'intérieur des ventricules. Cet épithélium, continu et imperméable, constitue les barrières hémato-méningée et méningo-encéphalique, séparant ainsi le LCR du sang ou le LCR du parenchyme cérébral. Ces barrières présentent les mêmes caractéristiques que la BHE et elles participent, au même titre, à l'isolement du SNC. C'est au niveau de certaines structures épendymaires que se forment en permanence les cellules souches qui assurent le renouvellement des neurones du bulbe olfactif.

1.1.3 La barrière hémato-encéphalique

L'existence de cette barrière, qui isole le parenchyme nerveux des fluctuations nuisibles des composants portés par la circulation sanguine, a été reconnue très tôt grâce à l'absence de marquage cérébral après injection intraveineuse de colorants comme le bleu Evans (Ehrlich, 1885). Cette imperméabilité est la conséquence de plusieurs caractéristiques morphologiques : la présence de jonctions serrées de type *zonulae occludentes*, la forte activité de transfert vésiculaire, la grande richesse mitochondriale traduisant une activité métabolique intense, l'absence de canaux transendothéliaux, le contact étroit avec les pieds astrocytaires (pour revue : Selmaj, 1996 ; Andjelkovic et Pachter, 1998 ; Huber et al., 2001). Les capillaires cérébraux comportent une seule couche de cellules endothéliales, reposant sur une lame basale, entourée d'un manchon quasi-ininterrompu, constitué de prolongements astrocytaires périvasculaires jointifs formant la *glia limitans* (Fig. 3 ; Goldstein et Betz, 1986). D'autres cellules sont localisées autour des capillaires : les cellules microgliales périvasculaires précédemment décrites, et les péricytes d'origine hématopoïétique, cellules contractiles dont la fonction n'est pas encore clairement établie (pour revue : Balabanov et Dore-Duffy, 1998 ; Thomas, 1999 ; Allt et Lawrenson, 2001).

Ainsi les échanges au travers de la BHE sont fonction de l'hydro ou de la liposolubilité d'une

substance. Les substances hydrosolubles sont largement exclues, mais certaines d'entre elles font au contraire l'objet d'un phénomène de transport actif vésiculaire (transcytose) efficace. Les substances liposolubles passent aisément cette barrière, éventuellement par un phénomène de diffusion passive. Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux se comportent, en outre, comme une barrière métabolique à la diffusion de neurotransmetteurs aminés, ou de leurs précurseurs immédiats. Cette sélectivité est une caractéristique fâcheuse dans le cas du traitement de la maladie de Parkinson que nous développerons plus tard, puisque l'activité enzymatique intra-endothéliale de la Dopa-décarboxylase empêche tout traitement systémique visant à acheminer directement la dopamine vers le cerveau.

Les cellules endothéliales cérébrales sont caractérisées par des marqueurs spécifiques comme le facteur VIII, le transporteur du glucose de type 1 et l'ectine UEA-1 (Wong et Dorovini-Zis, 1992, 1995 ; Stanimirovic et al., 1997 ; Prat et al., 2000). Ces cellules n'expriment pas d'immunophénotype marqué, et n'expriment les molécules de CMH de classe II et les molécules de costimulations qu'après activation par des cytokines pro-inflammatoires tels le TNF α (tumor necrosis factor) ou l'IFN γ (Interferon- γ , Omari et Dorovini-Zis, 1999 ; Prat et al., 2000). L'expression des molécules d'adhésion, qui est essentielle au contact cellule à cellule lors de la migration des cellules inflammatoires, est faible sur les cellules de l'endothélium cérébral sain (Sobel et al., 1990 ; Raine et al., 1990 ; Male et al., 1990 ; Lassmann et al., 1991 ; Rössler et al., 1992). Il reste intéressant de noter que les cellules endothéliales du SNC adulte expriment à un très haut niveau d'expression l'intégrine β 1 (Archelos et al., 1999 ; Milner et Campbell, 2002). Celle-ci est très fortement régulée dans des conditions pathologiques ce qui laisse suggérer qu'elle joue un rôle critique dans les régulations des fonctions des cellules endothéliales du SNC. Pourtant ces caractéristiques ne rendent pas la barrière infranchissable, et certains leucocytes peuvent quand même passer sans son activation (*Cf. 1.2.1 Trafic leucocytaire dans le SNC sain*).

La rupture de la BHE est associée à de nombreux désordres du SNC et a aussi été évoquée dans le cas des rejets de greffes neuronales. Lors des processus inflammatoires sévères, comme dans le cas de la SEP, la rupture de la BHE, visualisable en IRM (imagerie par résonance magnétique) par injection de Gadolinium, rapproche les caractéristiques histologiques des cellules endothéliales

de celles des tissus extracérébraux : présence d'un plus grand nombre de vésicules de pinocytose, présence de pores intercellulaires, diminution marquée de la respiration et du métabolisme énergétique mitochondrial, perte d'expression ou délocalisation des protéines caractéristiques des jonctions serrées des cellules endothéliales de la BHE (Occludine et Zona Occludens-1 ; Bolton et al., 1998). Dans cette maladie, certains traitements immunosuppresseurs, comme l'IFN β (Stone et al., 1995) ou la mitoxantrone (Edan et al., 1997), permettent de restituer l'intégrité de la BHE et de freiner l'infiltration leucocytaire et la survenue de nouvelles lésions. L'action sur les composants de la matrice extracellulaire paraît aussi importante dans le traitement des maladies du CNS (Yong et al., 1998).

La BHE permet aussi l'accumulation dans le LCR de médiateurs immunosuppresseurs produits par les cellules nerveuses. En sens inverse, elle empêche la diffusion de facteurs sanguins tels que les divers éléments du complément, les immunoglobulines ou encore les cytokines. Elle est en cela un des acteurs principaux du caractère immuno-privilegié du SNC.

1.2

Le statut immunoréprimé du SNC : isolement anatomique ou tolérance active?

“On peut supposer qu’il est plus bénéfique pour l’organisme de ne pas transformer le cerveau en un champs de bataille dans lequel la réponse immunitaire peut-être parfois plus endommageante que l’antigène qui l’a provoquée.”

Leslie Brent, 1990.

Au début des années 80, l’absence de circuit lymphatique conventionnel dans le SNC était considérée comme interférant avec la partie afférente de la réponse immunitaire puisqu’elle interdisait le drainage des signaux immunogènes vers les organes lymphoïdes secondaires les plus proches. La présence de la BHE était représentée comme un rempart à la partie efférente en empêchant l’entrée des cellules effectrices et des molécules du système immunitaire dans le cerveau. De ce point de vue, le statut privilégié du SNC pouvait être considéré comme un état de non réactivité passive résultant de l’isolement physique du cerveau vis à vis du système immunitaire (Barker et Billingham, 1977). L’utilisation perverse de cet état fait que certains virus neurotropes (par exemple le virus de la rage, l’herpes simplex de type I ou le polio-virus), qui sont capables d’entrer par les terminaisons des nerfs périphériques, ne sont pas immédiatement reconnus par le système immunitaire (Aloisi et al., 2001). Depuis, de nombreuses connexions actives entre le cerveau, les ganglions lymphatiques et la rate, ont été mises en évidence, par la description du passage de lymphocytes à travers l’endothélium vasculaire ou l’existence possible d’un drainage inhabituel des liquides interstitiels du parenchyme cérébral.

1.2.1 Le trafic leucocytaire dans le SNC sain

La BHE empêche l’intrusion dans le SNC des cellules circulantes du système immunitaire, à l’exception notable des LT activés : ceux-ci peuvent pénétrer dans le parenchyme nerveux, à l’inverse des cellules T naïves ou au repos (Barker et Billingham, 1977 ; Hauser et al., 1983). Il existe en permanence un faible taux de lymphocytes dans le SNC normal, et quand une forte

réaction immunitaire se produit, même au dehors du SNC, un nombre plus élevé de LT se retrouve dans le SNC (Wekerle et al., 1986 ; Hickey et Kimura, 1987). La nature de l'antigène, le CMH utilisé et le phénotype des cellules T ne constituent pas des éléments critiques permettant de gagner l'accès au SNC : une récente activation antigénique suffit. Hickey a démontré par une expérience simple (Fig. 4), que les LT activés *in vitro* de façon non spécifique par la concanavaline A pouvaient pénétrer efficacement dans le SNC, quelle que soit leur spécificité antigénique (Hickey et al., 1991).

Les cellules T passant au travers de la BHE dans le SNC sont considérées comme chercheuses d'antigène. Ce sont des LT stimulés en périphérie par un antigène spécifique et qui font alors partie d'un pool de cellules circulantes susceptibles de passer au travers le parenchyme des organes. Ainsi, le concept de cellules T ayant un adressage particulier vers le système nerveux, ou de cellules spécifiquement destinées à pénétrer dans le SNC, n'a pas de support expérimental. Il n'existe pas de récepteur pour un « homing » (hébergement), ni de molécules d'adressage (adressines) identifiées sur l'endothélium du SNC, comme cibles spécifiques des leucocytes. Les cellules T activées pénètrent donc apparemment de façon aléatoire dans le SNC.

Cependant, la fraction de cellules T pouvant entrer dans le cerveau normal paraît plus faible que celle trouvée dans les autres organes. Ce phénomène pourrait être lié à une plus faible expression, sur l'endothélium cérébral non stimulé, des molécules d'adhésion nécessaires à l'ancrage du LT activé (*Cf. 1.3.2.2a : Activation de la BHE et infiltration lymphocytaire*). Celui-ci se ferait peut-être par le biais de la P-selectine, seule molécule décrite à ce jour dans ce processus (Carrithers et al., 2000, Hickey, 2000). On notera toutefois que la pénétration du SNC par les cellules lymphocytaires s'effectue selon la structure. Les LT bénéficient d'une entrée plus facile au niveau de la moelle épinière et plus difficile au niveau du cervelet (Philips et Lampson, 1999).

L'homme et l'animal possèdent naturellement des LT capables de reconnaître des antigènes cérébraux. On constate toutefois que ces cellules sont généralement incapables de provoquer une réaction immune dans le SNC, ce qui suggère l'existence de mécanismes capables d'entretenir l'homéostasie cérébrale. En fait, une particularité des cellules T entrant dans le SNC est leur apparente capacité à favoriser la réparation du système nerveux (pour revue : Neumann, 2000 ;

Bechman et Nitsch, 2001 ; Schwartz et al., 1999a, 1999b ; Schwartz et Cohen, 2000). En effet, les cellules T, particulièrement quand elles sont activées, ont la capacité de produire de nombreux facteurs neurotrophiques comme le BDNF (Brain derived neurotrophic factor ; Hohnfeld et al., 2000). Leur présence paraît avoir un rôle neuroprotecteur marqué dans divers modèles de lésions du SNC, à l'exclusion de rares souches de rats ou de souris, qui développent des maladies autoimmunes comme l'EAE.

Par ailleurs, il n'est pas certain que les LT activés entrant dans un SNC sain puissent en ressortir pour induire une éventuelle réponse systémique. En effet, les LT meurent rapidement dans le parenchyme cérébral suivant un mécanisme de mort apoptotique (Pender et al., 1992). Cette mort ne semble pas être liée à la reconnaissance de l'antigène, ni réservée aux lymphocytes qui ont une spécificité particulière pour les antigènes du SNC (Lassmann et al., 1993 ; Bauer et al., 1998, Lehmann, 1998). Il s'agirait de facteurs environnementaux du SNC qui induiraient la mort des lymphocytes *in situ*. *In vitro*, il a été observé que les astrocytes autant que les macrophages pouvaient induire l'apoptose des LT (Ford et al., 1996 ; Gold et al., 1996). Il a été suggéré que le couple Fas / Fas Ligand jouerait un rôle capital dans le maintien des LT dans le SNC normal, comme dans le contrôle de l'inflammation (pour revue : Green et Ferguson, 2001). En effet, les LT à l'état activé expriment le récepteur Fas/Apo1 (CD95), qui reconnaît le ligand FasL (CD95L) situé à la surface de la plupart des cellules du parenchyme nerveux (Bechmann et al., 1999 ; Flugel et al., 2000 ; Lee et al., 2000) ainsi que dans de nombreux autres sites immuno-privilégiés, comme sur les cellules de Sertoli, la chambre antérieure de l'œil ou le placenta (Bellgrau et al., 1995 ; Griffith et Ferguson, 1997 ; Mor et al., 1998). Il est cependant intéressant de noter que les LT spécifiques de la MBP, retrouvés chez les patients atteints de SEP, sont résistants à l'apoptose dépendante de FasL (Zipp et al., 1997). Mais d'autres mécanismes pourraient participer à l'élimination des LT, comme l'absence d'expression d'IL-2 (ce qui diminue l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2) et l'inhibition de la prolifération des lymphocytes par les gangliosides, très présents dans le SNC (Irani et al., 1997). La mort des LT pourraient encore être provoquée par la production de dérivés oxygénés par les macrophages et la glie, par la présence de glucocorticostéroïdes (pour revue : Pender et Rist, 2001) ou de glycoconjugués comme la

galectine-1 qui est retrouvée dans tous les sites immuno-privilegiés (Sotomayor et Rabinovich, 2000).

Mais la survie lymphocytaire est également abérrée par le manque de signaux inducteurs. L'absence des molécules des CMH I ou II et des signaux de costimulation interdisent en effet toute restimulation intraparenchymateuse des LT dans un cerveau sain (*Cf. 1.3.2.1 Quelle APC dans le SNC?*). On notera que l'expression faible ou nulle des CMH paraît être liée tant à l'absence de stimuli inducteurs (cytokines pro-inflammatoires par exemple) qu'à la présence de facteurs inhibiteurs présents dans l'environnement du tissu nerveux.

1.2.2 Les facteurs moléculaires de « l'immunosuppression »

Au sein du tissu nerveux, la possibilité de réponses inflammatoires est réduite par la conjonction de multiples facteurs immunosuppresseurs : la production locale de facteurs solubles, en particulier de cytokines anti-inflammatoires, crée un microenvironnement immunosuppresseur. Nous venons de voir qu'il est responsable de la diminution de l'expression des molécules du CMH, qu'il est impliqué dans l'état de latence de la microglie et dans l'élimination par apoptose des LT infiltrants.

Ces facteurs sont soit solubles, soit présents à la surface des cellules ou liés à la matrice extracellulaire (MEC). La plupart de ces molécules immunosuppressives présentes dans le SNC sain et leurs effets sont répertoriés dans le tableau 2.

On peut souligner quelques caractères importants :

- Le TGF β a une expression constitutive dans le SNC et est présent à des taux importants dans le LCR (Johnson et al., 1992). Il a la capacité d'empêcher la prolifération des LT (Taylor et Streilein, 1996) ou d'atténuer leurs effets (Wilbanks et Streilein, 1992), de bloquer la production de molécules chimioattractantes par les astrocytes (Weiss et Berman, 1998), et de modifier les propriétés de passage de la BHE (Fabry et al., 1995).
- Un autre facteur important dans le contrôle des réponses inflammatoires est l'élimination par apoptose de nombreux LT activés ayant pénétré dans le tissu nerveux. Nous avons vu que cet

effet était principalement provoqué par l'interaction Fas/FasL. Cependant la mort par apoptose des LT entraîne aussi la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF β dans le milieu extra-cellulaire (Chen et al., 1998 ; Li et al., 2000). L'action conjuguée de ces deux cytokines renforce l'immunosuppression en inhibant la fonction cytotoxique des lymphocytes T. Le TGF β et l'IL-10 ne sont cependant pas les seuls facteurs solubles capables de supprimer l'action des LT, d'autres facteurs comme des neuropeptides ou des protéoglycanes peuvent aussi contribuer au statut privilégié du SNC (Lindsey et Jin., 2000).

- Concernant la faible expression des molécules de CMH, on pourra par exemple noter que les molécules de classe II sont très sensibles à l'induction par l'IFN γ , mais il n'y a pas d'expression endogène d'IFN γ dans le SNC sain. A l'inverse, les gangliosides du cerveau seraient responsables d'un blocage de l'induction des antigènes du CMH (Massa, 1993). D'autres molécules présentes dans le SNC, comme le colony stimulating factor-1 (CFS-1), ou l'IL-10 sont aussi impliquées dans la faible expression des CMH de classe II (Lodge et Sriram, 1996 ; Frei et al., 1994).
- Les neurones eux-mêmes, par des contacts de cellule à cellule impliquant la molécule OX2 (CD200) peuvent sécréter des facteurs tels que des neurotrophines et réguler l'état d'activation de la microglie (Hoek et al., 2000).
- En outre, on peut aussi signaler que les différentes formes du complément – qui peuvent être synthétisées par la microglie, les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones – ne sont présentes qu'à de faibles concentrations dans le SNC, et sous forme inactive (Gasque et al., 2000) réduisant les possibilités de réactions inflammatoires menées par les anticorps.

On peut conclure qu'un réseau complexe de molécules extrêmement variées, tant par leur structure que par leur origine, contribuent au statut anti-inflammatoire du SNC.

1.2.3 Un drainage lymphatique particulier

Dans les organes périphériques, une partie importante des substances libérées dans l'espace inter-cellulaire est drainée par la lymphe vers les ganglions lymphatiques. Anatomiquement, il n'y a pas de canaux lymphatiques définis dans le cerveau du rat ou de l'homme. Pourtant les

connections afférentes avec le système immunitaire peuvent se réaliser grâce à un flux sortant de signaux antigéniques depuis le liquide interstitiel, cheminant le long des espaces péri-vasculaires, appelés espaces de Virchow-Robin, vers le LCR, ou qui s'échappent par les prolongations de l'espace subarachnoïdien le long des nerfs craniaux (olfactif, optique, trigéminal et accoustique) et peuvent ainsi aisément atteindre les ganglions cervicaux ou la rate (Fig. 5, Bradbury et al., 1981 ; Cserr et Knopf, 1992 ; Kida et al., 1995). Ainsi Cserr et son équipe ont pu mettre en évidence que, selon le site d'injection, 18 à 47% de protéines injectées dans le cerveau du lapin pouvaient se retrouver dans les ganglions cervicaux au bout d'un vingtaine d'heures. Il a ainsi été montré que les protéines ou les molécules de fort poids moléculaire se retrouvent dans les ganglions lymphatiques profonds (Yamada et al., 1991). Plus récemment, il a été observé chez l'agneau que 40 à 48% du volume total de LCR recyclé transitait par ces mêmes ganglions (Boulton et al., 1998). Ce mode de diffusion, s'il est significatif, n'est pas pour autant comparable au réseau lymphatique conventionnel. En effet, de nombreux facteurs physiques et géométriques, dus à l'architecture du parenchyme cérébral, viennent freiner le drainage des molécules dans les espaces extracellulaires (pour revue : Nicholson et Sykova, 1998 ; Rusakov et Kullmann, 1998). Certains antigènes de taille importante peuvent ainsi persister dans le cerveau jusqu'à deux ans après leur injection (Zhang et al., 1992).

1.2.4 Utilisation des privilèges immuns du SNC comme outil de tolérance systémique

Partant de l'observation que la réponse humorale systémique aux antigènes placés dans les sites immuno-privilégiés (SNC, chambre antérieure de l'oeil, vitrée, cornée stromale, interface mère-foetus, testicules, ovaires, foie, matrice des follicules du cuir chevelu... pour revue : Barker et Billingham, 1977) diffère qualitativement et quantitativement de la réponse aux antigènes injectés en périphérie (Gordon et al., 1992), plusieurs équipes ont utilisé les propriétés particulières de ces compartiments pour induire une déviation de la réponse immune ou un état de tolérance contre des antigènes injectés dans ces sites. C'est ce que Streilein appelle le concept de « spécialisation régionale » de la réponse immune qui permet des réponses différentes de celles

qui pourraient être obtenues en périphérie (pour revue : Stein-Streilein et Streilein, 2002). En effet, il apparaît que l'injection d'un peptide dans la chambre antérieure de l'oeil induit une tolérance systémique vis à vis de cet antigène, un principe nommé ACAID (Anterior Chamber Associated Immune Deviation). De la même façon, il a été récemment évoqué le même principe après administration du même peptide dans le parenchyme cérébral (BRAID, pour BRain Associated Immune Deviation, Wenkel et al., 2001). D'une manière plus appliquée, on peut citer des stratégies similaires dans des cas d'EAE. En effet, il a été montré que l'instillation préalable de la protéine MBP dans le LCR, rend la sévérité de la maladie beaucoup moins importante, que lorsque l'antigène est injecté en périphérie (Harling-Berg et al., 1991).

1.3

Les mécanismes d'inflammation dans le SNC

La réponse immunitaire a deux composantes de base : l'immunité innée et l'immunité acquise, qui se complètent en s'interpénétrant étroitement. La première est une réponse aigüe qui mène dans la plupart des cas à l'élimination du pathogène et à la réparation du tissu. Ainsi, les cellules douées de phagocytose peuvent éliminer directement les premiers effecteurs de l'inflammation. Pourtant, lorsque l'immunité innée a failli, cette même cellule peut aussi intervenir au départ de l'immunité spécifique. Cette réponse plus tardive sera alors dirigée autant par des LT que par des anticorps.

Le type et la quantité de cellules inflammatoires qui apparaissent dans le SNC dépend essentiellement du stimulus qui les attire et de leur capacité à détruire l'antigène. Les composants de l'inflammation ont une part importante dans de nombreux désordres du CNS, incluant les traumatismes (Clark et al., 1994 ; Dusart et Schwab, 1994 ; Arvin et al., 1996), les ischémies (Kogure et al., 1996, Arvin et al., 1996), les démences liées au virus du SIDA (Gendelman et al., 1994), ainsi que dans des maladies telles que la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions, lesquelles avaient été initialement décrites comme exclusivement neurodégénératives (Rogers et al., 1996). Les dépôts de substance amyloïde qui se produisent lors de la maladie d'Alzheimer et des maladies à prions provoquent une activation chronique des cellules du lignage microglial sans mobilisation importante de LT. A l'inverse, dans les infections tuberculeuses, la majorité des encéphalopathies virales aiguës ou d'autres désordres dans lesquels aucun agent infectieux n'est défini, comme la SEP, des LT infiltrent le cerveau en abondance. De la même façon, nous verrons dans le cas des xénotransplantations réalisées au laboratoire, que le type de réponse immune induite dépend de la nature des cellules implantées (Remy et al., 2001).

1.3.1 Réactions inflammatoires intrinsèques au SNC et immunité innée.

De nombreux types cellulaires peuvent intervenir spontanément de manière non spécifique. Au sein du SNC, les cellules gliales elles-mêmes participent à la régulation de l'inflammation.

Astrocytes et cellules microgliales, fantassins du système immunitaire au sein du SNC, sont les premières cellules à intervenir. Suivant le type d'inflammation, ils peuvent recruter d'autres effecteurs de la réponse innée, comme les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), les cellules Natural Killer (NK) et les molécules de la cascade du complément.

1.3.1.1 Réaction astrocytaire

Par leur position stratégique à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral et les fortes interactions neurones-glie, les astrocytes répondent très rapidement aux variations de l'environnement du SNC. Ils produisent alors de nombreux médiateurs de la réponse immune et répondent en retour à un grand nombre de facteurs immuns par une prolifération cellulaire ou en synthétisant des molécules du CMH, des cytokines, des facteurs de croissance ou des molécules d'adhésion.

Les réponses innées dans le SNC sont très différentes de celles trouvées en périphérie. Un bon nombre d'études des réponses immunes du SNC ont été réalisées suite à l'action de divers agents proinflammatoires comme des endotoxines bactériennes (lipopolysaccharides, LPS, un composant de la capsule des bactéries Gram-négatives) (Andersson et al., 1992 ; Montero-Menei et al., 1994) ou des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF α (Anthony et al., 1997).

La principale réponse des astrocytes activés se traduit par une gliose réactionnelle qui reflète une hypertrophie des cellules, et dans une moindre mesure une prolifération qui peut être induite par une sécrétion locale de cytokines comme l'IL-1, l'IFN γ et le TNF α , ou de facteurs de croissance tels que l'EGF (epithelial growth factor), le PDGF (platelet growth factor), le FGF (fibrillary growth factor ; pour revue : Norenberg, 1994). Les astrocytes activés contiennent des quantités croissantes de macromolécules cytoplasmiques, en particulier la glial fibrillary acidic protein (GFAP), la vimentine, ou la protéine S-100.

Ils sécrètent à leur tour de nombreux facteurs dont des cytokines proinflammatoires (IL-1, TNF α) et le fragment C3 du complément (Levi-Strauss et Mallat, 1987). En cela, ils participent à l'entretien de la réponse inflammatoire, mais leur forte production de molécules anti-inflammatoires (TGF β , IFN α/β , prostaglandines E, apolipoprotéine) et de facteurs neurotrophiques

les caractérisent plus comme des régulateurs de l'inflammation en participant aux mécanismes de neuroprotection. On pourra par exemple noter, que les astrocytes en bord de lésion de SEP sont capables d'exprimer l'IL-10, dont un des rôles est l'inhibition de la sécrétion de cytokines par certains sous-types de cellules T (Cf. *Les cytokines et la polarisation Th1/Th2*) et les macrophages activés, leur suggérant un rôle dans le contrôle de l'inflammation en périphérie de la lésion (Cannella et Raine, 1995).

1.3.1.2 Activation microgliale

Malgré leur plus faible nombre, leur haut degré de différenciation et leur aspect de cellules quiescentes, les cellules microgliales sont les toutes premières cellules activées lors de lésions ou d'inflammation du SNC. Elles peuvent être activées par un grand nombre de stimuli immunologiques ou non-immunologiques, qui induisent différents niveaux d'activation, lesquels transforment ces cellules en phagocytes ou en cellules effectrices pleinement actives. La présence sur leur membrane de récepteurs à l'ATP (adénosine tri-phosphate ; Waltz et al., 1993 ; Langosch et al., 1994), à la calcitonin gene-related peptide (Priller et al., 1995), à l'acétylcholine et la noradrénaline (NA ; Whittemore, 1993) ainsi que de canaux potassiques, les rendent très sensibles aux infimes perturbations de leur microenvironnement. La morphologie de la microglie activée varie selon les pathologies. L'activation se manifeste par une rétraction de ses ramifications (Fig. 6) et un développement des capacités de phagocytose. Il apparaît que le type de lésion guide le type de réponse : une blessure entraînant une rupture de la barrière, permet une extravasation de facteurs sériques, laisse pénétrer les macrophages et induit une réponse mixte macrophage/microglie (Imamoto et Leblond, 1977). A l'inverse, une dégénérescence axonale rétrograde ne sollicitant pas de brèches de la BHE (comme une dégénérescence Wallérienne), active préférentiellement la microglie (Graeber et al., 1988). Ainsi l'induction des marqueurs macrophagiques est sous la dépendance de protéines plasmatiques, et notamment de la sialoadhésine présente dans le sérum. Une lésion de la BHE résulte, du reste, en une activation de la microglie avec une distribution spatiale qui suit l'étendue de la diffusion des molécules plasmatiques (Perry et al, 1992).

Migration, prolifération et surexpression de marqueurs immunologiques

In vitro, des expériences ont montré que le passage de la forme ramifiée à la forme amiboïde s'accompagnait d'une augmentation de l'expression des intégrines $\beta 1$ et LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1 ou CD11a; pour revue : Milner et Campbell, 2002). Ces molécules ont un rôle important dans le processus de migration des cellules microgliales depuis leur réservoir principal dans le corps calleux vers le site de lésion ou d'inflammation et dans leur capacité de phagocytose (Ullrich et al., 2001 ; Witting et al., 2000). Leur expression a été retrouvée dans de nombreux désordres du SNC dont la maladie d'Alzheimer (Akiyama et McGeer, 1990) et la SEP (Bo et al., 1996). La microglie a aussi la capacité de se diviser sous l'action de ses principaux mitogènes que sont tous les membres de la famille du colony-stimulating factor (CSF) : l'IL-3 ou multi-CSF, le granulocyte-macrophage-CSF et le macrophage-CSF, des molécules qui sont largement sécrétées lors de l'activation astrocytaire (Giulian et Ingeman, 1988).

La morphologie amiboïde et l'expression de ces intégrines paraissent être induites par des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et le $TNF\alpha$, ainsi que par le LPS, mais elles s'accompagnent aussi d'une augmentation du taux d'expression de certains antigènes déjà présents en faible quantité ou d'une expression *de novo* d'antigène. La microglie pour initier sa fonction de phagocyte, réexprime son récepteur scavenger (Bell et al., 1994 ; Husemann et al., 2002). D'autres récepteurs permettant la capture de l'antigène, le récepteur du complément CR3 (CD11b) et le marqueur CD4 sont aussi très fortement exprimés pendant l'inflammation (Matyszak et Perry, 1995 ; Yu et al., 1998 ; Kloss et al., 1999). Le marqueur ED-1, présent sur la membrane lysosomale et témoin de l'activité phagocytaire, est lui aussi très fortement exprimé.

Cependant un des marqueurs immunologiques les plus importants est la forte expression des molécules du CMH. En effet, *in vivo*, l'injection d' $IFN\gamma$ provoque l'activation des cellules microgliales avec expression des antigènes de CMH I et II (Grau et al., 1997). *In vivo*, en plus de son identification dans les cas de lésions de SEP, l'apparition de la molécule de CMH de classe II avait déjà été de nombreuses fois décrite dans les cas de dégénérescence rétrograde (Streit et al., 1989), de dégénérescence Wallérienne (Konno et al., 1989 ; Rao et Lund, 1989), de lésions excitotoxiques (Akiyama et al., 1988) et d'autres maladies neurologiques (McGeer et al., 1988). En

effet, dissociée en culture, la microglie peut fortement exprimer la molécule de CMH de classe II, pas seulement par action des cytokines pro-inflammatoires, mais aussi *via* les récepteurs de la réponse innée. CD14, normalement récepteur pour le LPS en est le prototype (Becher et al., 1996). On peut aussi noter que le CMH II peut être sur-régulé par un flux local d'ions, de neurotransmetteurs ou de prostaglandines. Neumann et son groupe (1996) ont montré qu'en bloquant l'activité neuronale par la tetrodotoxine, il augmentait l'expression des CMH de classe II sur la microglie environnante. En plus de ces molécules, la microglie peut aussi exprimer des molécules de costimulation comme B7 (De Simone et al., 1995 ; Walker et al., 1995). B7-2 apparaît constitutive sur la microglie du parenchyme (observée autant *in vivo* qu'*in vitro*), mais B7-1 n'est pas exprimé, sauf sous l'effet de l'IFN γ en culture (Williams et al., 1993). L'expression des ces molécules, qui n'a aucune répercussion sur la réponse innée, prendra toute son importance lors de l'infiltration lymphocytaire (*Cf. 13.2.2a Activation de la BHE et infiltration lymphocytaire*).

L'activation microgliale peut avoir des conséquences variées :

1/ Cytotoxicité de la microglie

Dans la plupart des cas d'inflammations, notamment dus à la présence de stimuli pro-inflammatoires (IFN γ , LPS), l'activation microgliale est associée à sa fonction cytotoxique et entraîne une production de substances neurotoxiques : radicaux oxygénés, NO, protéases, dérivés des acides arachidoniques, acides aminés excitateurs, acide quinolique (pour revue : Banati et al., 1993 ; Kreutzberg, 1996 ; Streit, 1999). Le LPS et l'IFN γ favorisent aussi le rôle pro-inflammatoire des cellules microgliales en inhibant leur production de TGF β 1 et d'IL10 et en favorisant leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels l'IL-1, le TNF α , l'IFN γ et l'IL-6 (Xiao et al., 1996). Les cellules microgliales apparaissent comme la principale source de cytokines dans le SNC (pour revue : Hanisch, 2002). Ces molécules interviennent probablement dans l'initiation et l'entretien de tous les types de réactions inflammatoires en stimulant, en particulier, la sécrétion de molécules d'adhésion cellulaire (Canella et Raine, 1995) mais aussi de chimiokines comme le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) qui induit une infiltration périvasculaire de monocytes circulants (Ransohoff et al., 1993 ; Calvo et al., 1996 ; Bell et al., 1996).

2/ Effets trophiques de la microglie activée :

La microglie étant très sensible à l'homéostasie du tissu nerveux et à l'activité neuronale (notamment à la NA et aux autres agonistes β -adrénergiques), elle peut exercer un effet trophique. Cela a été sous-entendu par la sécrétion, *in vitro*, de faibles quantités de β FGF (Shimojo et al., 1991), de NGF (nerve growth factor) après stimulation par le LPS (Mallat et al., 1989) ou de NT-3 (Elkabes et al., 1996). Ainsi l'effet de ces facteurs de croissance, et la fonction de nettoyeur de débris cellulaires peuvent permettre la régénération axonale et montrent que les composants du système immunitaire peuvent, dans certains cas, participer à la restauration neuronale (Lotan et Schwartz, 1994 ; Streit, 2002). L'activation microgliale, régulièrement observée après un traumatisme chirurgical, n'est donc pas obligatoirement néfaste. Il a même été observé, dans certaines conditions de dégénération neuronale, que la microglie activée pouvait sécréter des cytokines anti-inflammatoires (TGF β 1 ; IL-10) et participer ainsi au processus de réparation neuronale en réduisant la cicatrice astrocytaire (Herdegen et al., 1992).

1.3.1.3 Les PMN, le complément et les NK dans le SNC

- L'activation microgliale, les taux élevés de cytokines et de molécules d'adhésion sont les marqueurs de l'inflammation du CNS. Mais le recrutement des PMN et des macrophages, même s'il est plus faible qu'en périphérie, a aussi été démontré lors d'inflammations non spécifiques comme suite à une ischémie (Matsuo et al., 1994 ; Carlos et al., 1997), à une lésion excitotoxique (Bolton et Perry, 1998) ou à l'injection d'IL-1 (Anthony et al., 1997). Cette infiltration très rapide semble nécessiter une certaine perméabilité préalable de la BHE (Anthony et al., 1997 ; Bolton et Perry, 1998 ; Royo et al., 1999). Mais leur plus faible recrutement qu'en périphérie est surtout lié à la faible sécrétion de certaines chimiokines, comme le MIP-2 (macrophage inflammatory protein) et IL-8, par les cellules stromales du parenchyme cérébral depuis qu'un recrutement significatif des neutrophiles est obtenu par simple injection intracérébrale de ces chimiokines (Bell et al, 1996b; pour revue : Matyszak, 1998). Par la suite, tant les neutrophiles que les macrophages participent à l'évolution de l'inflammation en contribuant à la rupture de la BHE et aux dommages tissulaires. En

effet, l'inhibition de l'entrée de ces derniers abroge la destruction des tissus (Chopp et al., 1994 ; Zhang et al., 1995).

- L'activation microgliale, s'accompagne aussi du dépôt de composants du complément tels que C1q et du complexe d'attaque membranaire (C5b-9) qui justifie la présence du récepteur CR3 sur la microglie. Si le complexe d'attaque est impliqué dans l'activité cytolytique, les autres éléments du complément permettent surtout l'activation cellulaire (chimiotactisme) et la phagocytose des cellules invasives (Pour revue : Gasque et al., 2000, 2002). On peut noter que lors de l'inflammation, de nombreux composants du complément sont synthétisés dans le SNC, principalement par les astrocytes, mais aussi par les cellules épendymaires, les cellules endothéliales, la microglie et les neurones (pour revue : Barnum, 1995 ; Stahel et al., 1998 ; Nataf et al., 1999 ; Saadi et Platt, 1999 ; Morgan, 2000).
- D'autres cellules, les NK peuvent aussi infiltrer le parenchyme cérébral sans maturation préalable, comme sous l'action de l'IFN γ , mais surtout de l'IL-2 synthétisé par les lymphocytes ce qui en font des cellules très souvent liées à la réponse spécifique. Pourtant, elles sont capables de reconnaître et de tuer des cibles cellulaires sans restriction par le CMH. Elles permettent un réponse rapide, et précèdent souvent de plusieurs jours la réponse cellulaire spécifique. Leurs actions passent par la sécrétion de perforine ou par la liaison Fas/Fas-Ligand, mais elles peuvent aussi entraîner une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC : Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity), un mécanisme qu'elles partagent avec la microglie. Ce sont alors les anticorps naturels préexistants qui servent de ligand sur le récepteur Fc (CD16).

1.3.2 Immunité spécifique au sein du SNC

Nous avons vu que l'activation microgliale a été décrite dans tous les types d'inflammation du CNS, mais parfois certaines conditions pathologiques entraînent une réponse supplémentaire, spécifique de l'antigène, menée principalement par les LT qui pourront s'accumuler de façon importante. Cette réponse adaptative est directement corrélée avec l'état d'activation microgliale. La mobilisation des mécanismes de l'immunité spécifique est lente, et repose sur un événement de reconnaissance moléculaire complexe par des cellules présentatrices d'antigènes (APC).

Celles-ci expriment un peptide antigénique dans le contexte d'une molécule du CMH de classe I ou II, selon le cas. Un récepteur extrêmement polymorphe, présent sur les LT, et appelé récepteur T (TCR) est susceptible d'interagir avec ce complexe moléculaire et d'initier l'activation lymphocytaire (Germain, 1994).

1.3.2.1 Quelles cellules présentatrices dans le SNC ?

Il est important de différencier les APC capables d'initier une réponse primaire par la présentation antigénique aux cellules T naives, des APC qui stimuleront une réponse secondaire par la présentation d'antigène à des cellules T qui ont déjà été exposées à l'antigène. Il n'y a que les cellules dendritiques (CD) qui peuvent prétendre au premier rôle, alors que divers types cellulaires peuvent être capables de la seconde réponse (Steinman, 1991). En effet, l'activation des LT naïfs nécessite l'expression de molécules de co-stimulation qui ne sont pas présentes sur les cellules non hématopoïétiques. C'est ainsi que l'on peut définir les APC dites « professionnelles » qui expriment, outre les molécules de CMH, les molécules de costimulations nécessaires. (Banchereau et Steinman, 1998).

Les progéniteurs de CD sont originaires de la moelle osseuse, passent dans le sang et entrent dans les tissus non-lymphoïdes en tant que CD immatures (Austyn, 1996). Elles sont alors très efficaces dans le processus de capture des antigènes, mais ne sont pas capables de les présenter. Leur particularité est leur capacité à conserver l'antigène dans des compartiments spécialisés à faible taux d'acidité (Lutz et al., 1997) durant le trajet depuis le site d'inflammation jusqu'aux organes lymphoïdes les plus proches (Zinkernagel et Engertner, 1997). C'est l'inflammation tissulaire qui déclenche leur migration. Les signaux peuvent être des produits bactériens, des facteurs de croissance comme le GM-CSF ou des cytokines pro-inflammatoires tels que le $TNF\alpha$ ou l' $IL-1\beta$ (Cumberbatch et al., 1994 ; Roake et al., 1995 ; MacPherson et al., 1995 ; Ibrahim et al., 1995). Les CD acquièrent leur phénotype mature pendant le transit. Elles perdent leurs propriétés phagocytiques et expriment très fortement les molécules de CMH et de costimulation B7.1 et B7.2 (Inaba et al., 1994). Elles sont absentes du parenchyme cérébral, ce qui pourrait résulter de l'évolution et de la spécialisation du SNC (Lowenstein, 2002). Toutefois, il

existe un riche réseau de CD dans des sites stratégiques tels que les couches méningées (dure-mère, arachnoïde, pie-mère), dans le stroma, et sans doute dans la couche épithéliale des plexus choroïdes (Matyszak et Perry, 1996 ; Serot et al., 1997 ; Hanly et Petito, 1998 ; McMenamin, 1999). Ainsi, les CD se trouveraient en position stratégique pour être en contact avec les antigènes sortant du SNC à travers la barrière et pour pouvoir alors les acheminer jusqu'aux lieux de présentation, dans les ganglions cervicaux profonds ou, *via* le sang, dans la rate (Aloisi et al., 2000 ; Pashenkov et al., 2003).

Depuis peu, ces cellules ont été décrites, en conditions inflammatoires (infections bactériennes et EAE), comme s'accumulant dans les espaces périvasculaires et pourraient même infiltrer le parenchyme (Fischer et al., 2000 ; Serafini et al., 2000), suggérant que les CD recrutées depuis le sang peuvent jouer un rôle effecteur important dans la régulation locale des réponses T dans le SNC. Cependant, en l'absence de marqueurs spécifiques des CD, ces résultats restent à confirmer, d'autant que récemment certains auteurs ont estimé que certaines populations de CD pouvaient dériver d'une différenciation microgliale (Santambrogio et al., 2001 ; Fischer et Reichmann, 2001 ; Reichmann et al., 2002).

- S'il est connu depuis bien longtemps que les astrocytes sont capables de phagocytose, leur implication dans des processus inflammatoires reste très discutée, malgré les expériences de Fontana qui démontra *in vitro* sur des cultures d'astrocytes humains, une induction de molécules de CMH de classe II, fortement accrue en présence d'IFN γ , et corrélée avec une prolifération de cellules T antigène-spécifiques (Fontana et al., 1984). Malgré ces expériences, la détection du CMH II sur les astrocytes *in vivo* reste controversée et il paraît encore plus aléatoire de détecter l'expression *in vitro* des molécules B7 indispensables à la costimulation des lymphocytes (Antel et Prat, 2000). Ces résultats sont en accord avec l'idée que les astrocytes, par leur capacité à produire des médiateurs anti-inflammatoires (prostaglandine E₂, TGF β) qui contrecarrent l'activation des LT, ont plutôt un effet inhibiteur que stimulateur sur la réponse immune dans le CNS (pour revue : Xiao et Link, 1999 , Aloisi, 2000). Cependant, l'ajout d'un nombre limité de cellules microgliales à des cultures d'astrocytes enclenche la prolifération lymphocytaire, laissant supposer que les astrocytes ont quand même des effets coopératifs dans la réponse immune

(Williams et al., 1995). Il semble donc que les astrocytes ne soient pas capables d'initier une réponse immune, mais puissent activer les cellules T mémoires, c'est à dire déjà primées. En cela ils peuvent perpétuer un processus d'inflammation, mais restent incapables d'un programme complet d'activation des cellules T naïves (Sedgwick et al., 1991a ; Weber et al., 1994). Cependant, ils sont capables d'activer certaines populations de LT en culture s'ils leur présentent un superantigène, car dans le cas de cette catégorie de molécules antigéniques, la présentation ne nécessite pas de molécules de costimulation (Hassan-Zahraee et al., 2000).

- *In vitro*, les cultures de cellules endothéliales de la BHE et les oligodendrocytes paraissent encore moins efficaces dans la présentation antigénique que les astrocytes (Pryce et al., 1989; Wekerle, 1994 ; Selmaj, 1996). Il apparait en fait une "hiérarchie" dans l'expression des molécules de CMH de classe II (Vass et Lassmann, 1990). Ces molécules ne s'expriment sur les cellules endothéliales cérébrales et les cellules d'origine neuroectodermique comme les astrocytes ou les oligodendrocytes, qu'en présence de très fortes doses de cytokines (Sato et al., 1991; Kreutzberg, 1996). A l'inverse, les CMH de classe II peuvent être très rapidement induits dans toutes les cellules microgliales, par simple administration systémique de cytokines inflammatoires comme le TNF α ou l'IFN γ (Wekerle, 1986 ; Steiniger et Van der Meide, 1988) ou par injection intracrâniale (Vass et Lassmann, 1990). Il en est de même pour l'expression des molécules de costimulation ICAM-1, CD40, B7.2 et B7.1 (Aloisi, 2001 ; Nguyen et Benveniste, 2002). Ainsi, la microglie joue probablement un rôle essentiel dans la présentation antigénique. Ceci est conforté par le fait qu'*in vitro* la microglie purifiée peut induire une prolifération des cellules T (Frei et al., 1987 ; Cash et al., 1993 ; Matsumoto et al., 1992 ; Fischer et al., 1993 ; Williams et al., 1995 ; Becher et al., 1996 ; Prat et al., 2000). Mais à l'inverse, la microglie ne paraît pas capable de présenter des antigènes dérivés de la MBP à des cellules T CD4⁺ spécifiques de cet antigène, et une partie de ces cellules entrent alors en apoptose (Ford et al., 1995, 1996 ; Klyushnenkova et Vanguri, 1997). En réalité, nombre d'études sont difficiles à comparer, parce que la microglie est très fortement influençable par les conditions de culture (Carson et al., 1999b). Il apparait, par exemple, que la microglie CD45^{low} n'est pas capable d'agir comme APC dans les tests de prolifération de LT mais qu'elle peut induire une production de cytokines de type Th1 par ces

cellules (Carson et al., 1998, 1999b ; Juedes et Ruddle, 2001). En général, l'expression du niveau de CD45 est corrélée avec la capacité à stimuler la prolifération des cellules T. Ainsi, les réponses immunes sont plus facilement initiées dans les méninges, le plexus choroïde et les régions vasculaires (des régions du SNC riches en macrophages CD45^{hi}) plutôt que dans le parenchyme dans lequel la population myéloïde résidante, typiquement microgliale, est CD45^{low}. Dès lors, les macrophages périvasculaires et les macrophages infiltrants apparaissent comme les meilleurs candidats pour présenter l'antigène et restimuler les LT.

La plupart des études expérimentales se sont focalisées sur l'expression des molécules de CMH de classe II, essentiellement pour des raisons techniques. Mais des observations récentes ont montré qu'il peut exister une expression de classe I sur certains types de cellules du parenchyme nerveux, impliquant alors une réponse cellulaire de la part des lymphocytes CD8⁺ (Suzumura et al., 1986 ; Turnley et al., 1991 ; Jurewicz et al., 1998 ; Redwine et al., 2001). Ceux-ci pourraient jouer un rôle essentiel lors d'infections virales, du rejet de greffe ou de cellules tumorales (Cf. 1.3.3.4 *La réponse T cytotoxique*).

1.3.2.2 Mécanismes d'action des LT dans le SNC

a. Activation de la BHE, infiltration lymphocytaire et chimiokines

Nous avons vu précédemment que s'ils sont activés, les lymphocytes peuvent efficacement pénétrer dans le parenchyme nerveux. La production de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules peut modifier l'endothélium vasculaire de façon à favoriser l'invasion du SNC par les leucocytes effecteurs de l'inflammation (Pryce et al., 1997 ; Hickey, 1999).

Ce transit, appelé migration transendothéliale, fait intervenir quatre étapes successives (Fig. 7), bien distinctes, et fortement contrôlées par des glycoprotéines de surface ou molécules d'adhésion (Butcher, 1991 ; Lawrence et Springer, 1991 ; Shimizu et al., 1992 ; Sloan et al., 1992 ; McEver, 1994 ; Lee et Beneveniste, 1999).

- **1/ Le roulement :** L'interaction entre le leucocyte et la cellule endothéliale lors du roulement est faible et réversible : le lymphocyte ne « flotte » pas dans le torrent circulatoire, mais il roule sur l'endothélium poussé par le flux sanguin. Les principales sélectines impliquées sont la L-sélectine

(LAM-1), la E-sélectine (ELAM-1) et la P-sélectine (CD62). Cependant la E-selectine semble être plus impliquée dans l'adhésion des neutrophiles et des cellules CD4⁺ alors que la L-selectine paraît être spécifique de l'adressage des cellules T vers les ganglions lymphatiques.

Les sélectines peuvent être rapidement induites : la P-selectine apparaît dans les minutes, et la E-selectine dans les heures qui suivent une exposition aux cytokines (Granger et Kubes, 1994 ; Kerfoot et Kubes, 2002). Cependant le fait que des lymphocytes puissent traverser une barrière non activée suggère qu'il existe des selectines constitutives sur l'endothélium (Carrithers et al., 2000, *Cf. 1.2.1 Le trafic leucocytaire dans le SNC sain*).

- **2/ L'adhésion et l'activation**: Le leucocyte qui roule entre en contact avec les chimiokines qui sont produites par des cellules endothéliales elles-mêmes, ou par le foyer inflammatoire sous-jacent. Du fait de leur affinité pour l'héparane sulfate et les glycosaminoglycanes (GAG) qui tapissent le versant endoluminal de la cellule endothéliale, les chimiokines se concentrent de manière stable sur ce versant. Ce tapis de chimiokines déclenche une augmentation rapide de l'affinité des molécules d'adhésion leucocytaires pour leur ligand endothélial. Il en résulte une adhérence ferme du leucocyte sur l'endothélium. PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule, CD31), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), VLA-4 (very late antigen-4), LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, ou CD11a), Mac-1 (CD11b), et les ICAMs (intracellular adhesion molecules) sont les principales molécules impliquées dans ce processus (pour revue : Archelos et al., 1999 ; Stanimirovitch et Satoh, 2000). Ces molécules sont surexprimées lors de processus inflammatoires comme la SEP (Sobel et al., 1990 ; Dopp et al., 1994 ; Baron et al., 1993 ; Weller et al., 1996), et l'emploi d'anticorps dirigés contre ICAM-1 et VLA-4 limite l'adhésion et la transmigration leucocytaire dans l'EAE du rongeur (Yednock et al., 1992 ; Baron et al., 1993).

- **3/ La diapédèse** : le leucocyte passe à travers l'endothélium en dégradant localement la membrane basale. L'utilisation d'enzymes dégradant la membrane basale paraît être une étape cruciale de la pénétration leucocytaire depuis qu'il a été observé que l'administration exogène de polysaccharides sulphatés bloque le développement de l'EAE, par inhibition compétitive avec les enzymes des LT (Willenborg et Parish, 1988).

• **4/ La migration intraparenchymateuse dirigée par les chimiokines** : Une fois parvenu dans l'espace sous-endothélial, le leucocyte poursuit sa migration à travers le tissu, guidé par l'existence d'un gradient interstitiel de chimiokines qui lui permet de migrer par étapes successives jusqu'au site de production (Baggiolini et al., 1994). Dans le cerveau ces molécules sont sécrétées localement par les astrocytes, la microglie activée et les macrophages infiltrants (Tani et Ransohoff, 1994). Les chimiokines sont des petites protéines de 7 à 10 kD, caractérisées par des résidus cystéines très conservés reliés par des ponts disulfures intramoléculaires. Elles sont classiquement réparties en trois groupes : les chimiokines C-C (telles MIP-1a, RANTES et MCP-1, 2 et 3) lesquelles ont deux résidus cystéines adjacents, la famille C-X-C (comprenant l'IL-8, GRO, IP-10 et MIP-2) dont les deux cystéines sont séparées par un amino-acide, et la famille des chimiokines C (lymphotactine) qui n'ont qu'une cystéine NH₂-terminale. En général, les membres de la famille des chimiokines C-X-C sont chimioattractants et activateurs des neutrophiles, et ceux de la famille C-C attirent et activent les monocytes, les lymphocytes, les éosinophiles et les basophiles. La lymphotactine, comme son nom l'indique, attire plus spécifiquement les lymphocytes. Une chimiokine découverte plus récemment, la neurotactine ou fractalkine (Pan et al., 1997), a un profil unique de type C-X-X-X-C (trois amino-acides séparent les deux cystéines). Cette dernière attire les neutrophiles et son ARN messager (ARNm) est en majeure partie exprimé dans le cerveau. Elle est aussi produite par la microglie activée et les macrophages périvasculaires lors de l'EAE.

Ainsi, le développement d'un foyer inflammatoire, est relayé par une production de chimiokines. Leur expression par les cellules endothéliales peut aboutir à une rupture de la BHE, et au recrutement massif de nombreux autres leucocytes circulants.

b. La présentation antigénique

La présentation antigénique est la capacité d'une cellule à ingérer une protéine étrangère, à la dégrader partiellement, à exporter ses peptides à la surface en association avec les molécules du CMH, et à engager des liaisons avec un lymphocyte.

b1. Le complexe CMH/peptide :

Il existe deux classes de molécules de CMH : Les molécules de classe I présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes cytotoxiques (exprimant le co-récepteur CD8, Cf. 1.3.3.4 *La réponse T cytotoxique*), alors que les molécules de classe II présentent des peptides aux LT auxiliaires (ou CD4⁺).

- Les molécules de classe I présentent principalement des peptides dérivés de protéines endogènes (synthétisées par les cellules elles-mêmes), souvent localisées dans le cytosol (Germain et Margulies, 1993). Les molécules de classe II, au contraire, présentent aussi bien des protéines endogènes membranaires ou sécrétées que des protéines exogènes entrées dans les cellules présentatrices par internalisation. Cette spécificité de présentation repose, au moins en partie, sur le mécanisme même de production des peptides antigéniques et leur site intracellulaire d'association aux molécules de CMH. En effet, dans la première voie de présentation, les antigènes sont digérés par le protéasome dans le cytosol et les peptides ainsi engendrés sont transférés par les transporteurs TAP1/2 dans la lumière du réticulum où ils s'associent aux molécules du CMH de classe I néosynthétisées. Les molécules de classe I sont formées par l'association non covalente d'une chaîne légère non polymorphique, la β -2 microglobuline, et d'une chaîne lourde α polymorphique formée de 3 domaines extra-cellulaires α 1, α 2 et α 3. La structure tridimensionnelle de la molécule fait apparaître une cavité entre les domaines α 1 et α 2 dont le fond est un feuillet β plissé et les bords des hélices α . C'est dans cette zone que s'effectue l'interaction avec les peptides. Le domaine α 3 est quant à lui impliqué dans l'association avec la β 2-microglobuline et constitue le site de liaison au corécepteur CD8.

- Les chaînes α et β composant les molécules de classe II sont incapables de lier des peptides dans le réticulum endoplasmique en raison de leur association avec la chaîne invariante (Ii). C'est lors du transport vers la voie endocytaire que la protéine extracellulaire fixée à un récepteur spécifique ou captée par endocytose est clivée en peptides, induisant une dissociation et une dégradation de la chaîne Ii, et permet ainsi l'association des peptides antigéniques aux chaînes α et β . Leur organisation tridimensionnelle est semblable aux molécules de classe I sauf que la cavité de liaison du peptide est plus ouverte et permet de charger des peptides plus longs.

b2. Le récepteur T (TCR), son répertoire et le complexe TCR/CD3.

Les lymphocytes T interagissent avec les molécules des CMH de classe I ou II et leurs peptides antigéniques grâce à un récepteur hautement polymorphe : le TCR. La grande diversité des TCR trouvés de manière non pathologique sur les LT présents dans un organisme forme le répertoire. Le TCR est un complexe multiprotéique composé d'un hétérodimère clonotypique non covalent formé des deux chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. En raison du très faible nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$, de leur répartition très hétérogène (presqu'exclusivement épithéliale) et de leur reconnaissance antigénique très particulière (glycoprotines ou glycolipides présentés par les molécules CD1) nous nous intéresserons plus particulièrement aux LT $\alpha\beta$ dans ce manuscrit.

Chaque chaîne (α ou β) qui compose le TCR est constituée d'un domaine variable (V) du côté N-terminal, d'un domaine de diversité (D, sauf chaîne α), d'un domaine de jonction (J) et d'un domaine constant (C) du côté C-terminal. Un gène fonctionnel est le produit de réarrangements V(D)J et C (Alt et al., 1992). Ces domaines correspondent à des segments géniques initialement séparés sur l'ADN et réarrangés dans le thymus au cours de son développement. Pour la chaîne β du TCR, ces segments géniques correspondent, chez le rat, à 24 segments V β , répartis en 21 familles (les familles V β 3, V β 5 et V β 8 regroupent plusieurs gènes et le segment V β 3.1 n'est pas fonctionnel chez le rat de souche LEWIS), 12 segments J β , 2 segments D β et 2 segments C β pour la chaîne β (Williams et al., 1991). La proportion, dite variable de ces chaînes, présente trois boucles hypervariables CDR1, CDR2 et CDR3 (Complementary Determining Region) impliquées dans l'interaction avec le ligand (Fig. 8).

Si le TCR est responsable de la spécificité de reconnaissance de l'antigène, il est dépourvu de portion intracellulaire. Cependant, ce récepteur est associé à de nombreuses chaînes polypeptidiques (hétérodimères $\gamma\delta$, $\delta\epsilon$, et homodimère $\zeta\zeta$), formant le complexe CD3, qui est nécessaire à la transduction des signaux qui conduisent à l'activation des LT (Kanellopoulos et al., 1983). L'ensemble des signaux induits par la stimulation du complexe CD3/TCR constitue le signal 1. Brièvement, ce signal induit la phosphorylation des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-containing Activation Motifs) qui permettent à leur tour le recrutement de la tyrosine kinase ZAP-70 qui devient alors phosphorylée et active (Pour revue : Qian et Weiss, 1997). Il s'ensuit plusieurs

cascades d'événements biochimiques et en particulier une activation de la phospholipase C γ qui entraîne une augmentation du flux calcique intracytoplasmique et l'activation de protéines kinase C (PKC). Cette cascade de signalisation reste cependant insuffisante à elle seule pour induire l'activation des gènes spécifiques nécessaires à l'activation et la prolifération des LT. Un second signal est indispensable pour compléter l'activation et n'est permis que par l'interaction de nombreuses autres molécules entre la cellule présentatrice et le lymphocyte (Fig. 9).

b3. les corécepteurs et les molécules de costimulations

L'engagement d'un nombre minimum de TCR est nécessaire à la transcription des gènes de cytokines et à la prolifération T. Ce seuil dépend de la mise en jeu de structures de co-signalisation permettant, en plus de leur coopération indispensable à la signalisation intracellulaire du TCR, de renforcer l'interaction du TCR au complexe CMH/peptide par leur propriété d'adhésion (Linsley et al., 1990).

L'aggrégation des récepteurs T induit sur le LT l'expression du ligand de CD40 (CD154) qui interagit avec la molécule CD40 présente sur les cellules présentatrices. Dans le même temps la molécule CD28 interagit avec l'antigène B7 (B7.1 ou CD80, B7.2 ou CD86). L'interaction B7-CD28 induit un « second » signal qui, combiné au premier signal, accroît la transcription, *via* l'activation de facteurs de transcription comme NF κ b, NFAT ou le complexe AP-1 (hétérodimère Fos/Jun), et stabilise les ARNm de nombreux gènes comme l'IL2 (Fig. 9). D'autres interactions importantes, notamment pour l'adhésion des cellules, sont répertoriées sur la figure 10. L'expression ainsi induite se traduit par plusieurs changements phénotypiques et l'acquisition de mécanismes effecteurs spécifiques. Les LT activés expriment d'autres marqueurs d'activation comme la lectine CD69, ou le récepteur de l'IL2 (CD25). En réponse à l'IL-2, les cellules T se multiplient.

Cependant, les LT activés peuvent exprimer la molécule CTLA-4 (Cytotoxic lymphocyte-associated antigen-4, ou CD152), qui interagit également avec B7, mais avec une affinité cent fois supérieure à celle de CD28. Or, cette interaction CTLA-4/B7, à l'inverse de CD28/B7, bloque la prolifération des LT et provoque leur anergie (Linsley et al., 1992). Beaucoup de stratégies

d'immunosuppression sont basées sur le blocage de la costimulation, notamment en interférant avec la voie B7/CD28. L'une d'elle fait appel à la production d'une forme soluble de CTLA-4, qui, en masquant le récepteur B des APC, interdit toute interaction de ce récepteur avec la molécule CD28 des LT (Fig. 11 et *Cf. Perspectives*).

1.3.3.3 La polarisation Th1/Th2

Suivant le contexte dans lequel les LT CD4⁺ sont activés, ils se différencient en deux sous-populations distinctes, dites auxiliaires Th1 ou Th2, et sont soumis à une intense prolifération clonale. Les réponses dirigées par le sous-type Th1 sont des réponses d'hypersensibilité retardée (DTH) : de tels lymphocytes sont impliqués dans l'activation et la coopération avec les cellules T CD8⁺, les macrophages et les cellules NK, qui agissent directement contre la cible antigénique. La réponse anticorps est faible, de type IgG2a. A l'inverse les lymphocytes de sous type Th2 sont plutôt destinés à promouvoir de fortes réponses humorales, par l'activation des lymphocytes B, qui conduit à la sécrétion d'anticorps de type IgE et IgG1, ne fixe pas le complément.

Mosmann et Coffman (1989) ont été les premiers à identifier, *in vitro*, les profils cytokiniques qui caractérisent ces deux types de LT CD4⁺ : les cellules Th1 produisent notamment de l'IL-2, de l'IFN γ et la lymphotoxine α alors que les cellules Th2 produisent plus spécifiquement de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13. En plus d'être fonctionnellement distinctes, ces deux sous-populations s'inhibent mutuellement en limitant le développement et l'activité immune de l'autre (Street et Mosmann, 1991 ; Paul et Seder, 1994). En effet, l'IFN γ inhibe fortement les réponses de type Th2 et réciproquement, l'IL-10 bloque l'activation et l'expansion des lymphocytes Th1. *In vivo*, un grand nombre de facteurs affectent la polarisation Th1/Th2 à partir du stade naïf Th0. Ceci inclut le génotype de l'animal, la dose antigénique, le type d'APC présentant l'antigène aux cellules T auxiliaires, et le type de molécules de l'environnement (Reiner et Locksley, 1995 ; Guery et al., 1996 ; Murphy et al., 1996 ; Thompson, 1995 ; Saint-Vis et al., 1998 ; O'Garra, 1998). En règle générale, l'IL-12 favorise le développement d'une réponse de type Th1 alors que l'IL-4 oriente plutôt la différenciation de type Th2 (Fig. 12).

1.3.3.4 La réponse T cytotoxique

L'immunité spécifique cellulaire inclut, à part égale, le développement de LT cytotoxiques CD8⁺ (CTL) qui reconnaissent spécifiquement des peptides dérivés de protéines intracellulaires présentées sur le CMH de classe I. Ainsi, ces CTL assurent une surveillance dirigée contre les agents infectieux à tropisme intra-cellulaire. En dehors du SNC, les CMH I ont une expression quasi-ubiquitaire, mais dans le cerveau sain leur expression est quasi-inexistante, ce qui explique qu'il y a peu de cibles des CTL dans le cerveau à l'état normal. Les neurones sont particulièrement réfractaires à l'induction de l'expression de molécules de classe I par l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , et ne peuvent donc pas être détruits par les CTL, ce qui les rend sensibles aux infections virales persistantes (Joly et al., 1991). Cette absence d'inductibilité ne concerne cependant que les neurones fonctionnels et électriquement actifs. En effet, le blocage de cette activité par la tétrodothine restaure la possibilité qu'a l'IFN γ d'induire l'expression des molécules de classe I dans les neurones (Neumann et al., 1995, 1997). Quant aux trois autres types cellulaires qui constituent le parenchyme cérébral (oligodendrocytes, astrocytes et microglie), il n'a été observé d'expression des CMH de classe I qu'après une exposition à des doses importantes de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IFN γ (Vass et Lassmann, 1990 ; pour revue : Neumann, 2001).

Cependant lors d'inflammations sévères du SNC (SEP, ou dans une moindre mesure des phénomènes neurodégénératifs, par exemple liés à un infarctus), les CTL peuvent s'accumuler dans et autour des lésions, dans une proportion dix fois supérieure aux lymphocytes CD4⁺ (Gay et al., 1997 ; Babbe et al., 2000). En effet le recrutement et le l'adressage des CD8⁺ paraît facilité comparativement aux autres types lymphocytaires, mais les mécanismes moléculaires responsables de cette différence restent à éclaircir (Carson et al., 1999a).

Le développement des CTL s'effectue en deux phases : en premier lieu, il se produit un engagement et une prolifération limitée de CTL naïfs, mais spécifiques d'un antigène, qui expriment le récepteur de l'IL-2, mais ne sont pas capables d'action cytotoxique. Dans une seconde étape, ces cellules prolifèrent de façon extensive et se différencient en CTL. Ceux-ci possèdent une capacité de lyse spécifique de la cellule cible (Fig. 13). Cette seconde phase

requiert non seulement la reconnaissance de l'antigène mais encore des taux significatifs d'IL-2. En règle générale, la source d'IL-2 est autant autocrine que paracrine (sécrétion d'IL-2 par les CD4⁺ Th1), suggérant par là un mécanisme de coopération entre ces deux types cellulaires.

1.3.3.5 Un rôle secondaire pour les lymphocytes B dans l'inflammation du SNC ?

Il existe peu de données sur la présence et le rôle des lymphocytes B dans le SNC. Cependant, des études menées sur des rats immunisés avec un antigène étranger non pathogène, ont montré que des cellules B et des plasmocytes, spécifiques de cet antigène, pouvaient se retrouver dans le SNC (Knopf et al., 1994 ; 1998). A l'image des LT, les cellules B ne semblent pas avoir de difficulté pour franchir la BHE, mais ce phénomène reste sous la dépendance de son état d'activation (Postigo et al., 1994). Les molécules CD57 et CD65 présentes sur les cellules B activées interagissent avec la E et P-selectine présentes à la surface de l'endothélium. Il semble cependant, que dans le SNC, après rencontre de l'antigène pour lequel ils sont spécifiques, les cellules B ne sont capables de se différencier en plasmocytes qu'après une interaction initiale avec les cellules T (Griffin et al., 1992). Aussi leur présence reste relativement rare, sauf dans les maladies associées à une infiltration massive de LT, telle que la SEP (pour revue : Cross et al., 2001). Leurs rôles passent par la capture, le traitement, et la présentation de l'antigène, qui les impliquent comme de possibles APC (Davidson et Watts, 1989, Cheng et al., 1999). Ils peuvent en outre participer à la costimulation des LT et au recrutement d'autres cellules sur le site d'inflammation (Hall et al., 1999 ; Lou et al., 2000). A l'inverse, les cellules B peuvent inverser le processus inflammatoire en influençant la production de cytokines vers une balance Th2>Th1 (Saoudi et al., 1995 ; Stockinger et al., 1996) ou induire une anergie des cellules T CD8⁺ (Hollsberg et al., 1996).

Modèles de greffes appliquées à la maladie de Parkinson

Contrairement à beaucoup d'autres tissus, le système nerveux a une capacité limitée d'auto-réparation et les cellules hautement différenciées qui le composent ont perdu leur capacité de régénération. Bien qu'il existe des cellules souches neuronales dans le cerveau adulte, elles ont aussi une capacité limitée pour régénérer des neurones fonctionnels après une lésion. Ainsi, la transplantation neuronale apparaît particulièrement applicable lorsque la mort neuronale ne concerne que des populations homogènes sur le plan anatomique et neurochimique. C'est le cas de la maladie de Parkinson (MP) qui résulte de la perte sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire.

2.1 La maladie de Parkinson et ses principales thérapeutiques

2.1.1 Pathologie, causes

Cette affection neurodégénérative est caractérisée par des troubles moteurs, dus à la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire localisés dans le mésencéphale ventral (Fig. 14). Cette dégénérescence d'origine inconnue, provoque un déficit en dopamine dans les régions innervées par ces cellules, en particulier le striatum. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent lorsqu'environ 50% de ces neurones ont dégénérés, ce qui entraîne une déplétion d'environ 70 % de la dopamine dans le striatum (Dunnett et Björklund, 1999). Il en résulte des troubles moteurs très handicapants : tremblements, lenteur des mouvements (bradykinésie), rigidité et akinésie (absence de mouvements). Par la suite, des dégénérescences secondaires entraînent une détérioration des aires corticales motrices, et par conséquent, des troubles cognitifs. Avec une prévalence de 150 pour 100 000 individus et une incidence de 20 pour 100 000 dans tous les pays et pour toutes les races, la MP est la pathologie neurodégénérative la plus commune après la maladie d'Alzheimer (Schapira, 1999).

Ses causes ne sont pas connues, mais, la découverte en 1983 que la 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) injectée par erreur par voie intraveineuse par les consommateurs d'héroïne, provoquait des symptômes et une neurodégénération similaires à la MP, amena l'idée que des toxines environnementales pouvaient jouer un rôle dans le déclenchement de la pathologie (Langston et al., 1983). L'augmentation de l'incidence de la maladie dans les zones rurales exposées aux pesticides, s'accorde avec cette théorie (Semchuk et al., 1992). En effet, l'administration systémique d'un pesticide couramment employé, la roténone, induit des dégénérescences nigro-striées chez le rat (Betarbet et al., 2000). De plus, l'incidence de la maladie est plus forte chez les Afro-américains que chez les Africains suggérant encore une importance de l'environnement (Jendroska et al., 1994). Des formes familiales génétiques de MP (mutation du gène de l' α -synucléine, de la Parkine ou de l'ubiquitine) ont été décrites (Gasser, 1998 ; Kitada et al., 2000), laissant supposer que c'est sans doute une combinaison de facteurs tant génétiques qu'environnementaux, qui contribuent au développement de la pathologie (pour revue : Lotharius et Brundin, 2002 ; Broussolle et Thobois, 2002).

2.1.2 Les modèles animaux

Malgré une étiologie différente de la pathologie humaine, c'est sur la base de modèles animaux qu'en 1957, Carlsson mit en évidence le rôle du système dopaminergique dans le cerveau. Il s'agit d'animaux traités par des agents toxiques relativement spécifiques des neurones dopaminergiques, comme la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rat (pour revue : Sachs et Jonsson, 1975) ou le MPTP chez la souris ou le singe (Varastet et al., 1994). En plus d'être des outils pour les études pharmacologiques, ces modèles ont permis de vérifier la faisabilité de la technologie de la transplantation neuronale. Deux stratégies se dégagent de ces expérimentations. L'une vise à restaurer la dopamine manquante dans le striatum (Fig. 14, droite), l'autre, basée sur la neuroprotection des neurones restants, est essentiellement axée sur la plasticité des corps cellulaires des neurones dopaminergiques dans la substance noire.

2.3.1 Interventions thérapeutiques

2.1.3.1 Efficacité relative des traitements pharmacologiques

Il existe dans cette pathologie des traitements médicamenteux efficaces à base de lévodopa (L-Dopa), un précurseur de la dopamine qui peut franchir la BHE et rétablir la transmission dopaminergique déficiente. Cependant son efficacité décroît dans les 5 à 7 ans, entraînant des fluctuations cliniques de l'état des malades, essentiellement des dyskinésies (mouvements involontaires) qui handicapent lourdement les patients (Rascol et al., 2000 ; Lang et Lozano, 1998). La lévo-dopa peut également induire des effets secondaires très invalidants : ce sont des mouvements involontaires, appelés dyskinésies.

Des agonistes dopaminergiques, comme la bromocriptine ou le ropinirole, ainsi que des traitements qui inhibent les enzymes de la dégradation de la dopamine, augmentent les effets de la L-dopa et sont donc utilisés en complément.

2.1.3.2 Interventions chirurgicales

D'autres pistes thérapeutiques sont testées et comparées chez l'homme depuis une dizaine d'années. C'est le cas de la pallidectomie (lésions ponctuelles du pallidum par thermocoagulation), une opération pratiquée aux Etats-Unis mais abandonnée en Europe, dont l'effet réduit les symptômes parkinsoniens, notamment les tremblements (Fine et al., 2000 ; Krack et al., 2000). Plus récemment, l'équipe de Benabib, à Grenoble, a développé une nouvelle approche basée sur les stimulations électriques intracérébrales profondes des noyaux sous-thalamiques. Le courant de haute fréquence envoyé dans certains noyaux hyperactifs dans la MP induit une dépolarisation des neurones dont les effets symptomatiques se traduisent par une amélioration clinique et la réduction de la médication (Limousin et al., 1998). La lourdeur et le coût élevé de ces interventions font qu'elles ne sont pratiquées qu'en dernier recours, lorsque les traitements pharmacologiques n'ont plus effet. Elles ne semblent efficaces que dans les formes idiopathiques de la maladie, lorsque la dégénérescence est restreinte aux neurones dopaminergiques de la substance noire.

2.1.3.3 Stratégies de neuroprotection

De nouvelles approches cherchent à limiter le stress oxydatif qui pourrait être responsable de la destruction des neurones dopaminergiques de la substance noire. C'est le cas du tocopherol (vitamine E ; pour revue Fahn et Cohen, 1992). Mais une piste particulièrement prometteuse est celle des facteurs de croissances neurotrophiques. En effet les neurones dopaminergiques de la substance noire possèdent les récepteurs Ret et GDNFR1 qui leur permettent de répondre au glial derived neurotrophic factor (GDNF), un facteur neurotrophique naturellement produit au niveau du striatum. Un apport en GDNF, effectué au niveau de la substance noire, protège efficacement les neurones dopaminergiques contre diverses atteintes toxiques, notamment par la 6-OHDA ou la MPTP (Hoffer et al., 1994 ; Gash et al., 1996). L'apport de ce facteur aux patients pourrait donc contribuer à ralentir, sinon même arrêter le processus neurodégénératif et favoriser la réafférentation des territoires dénervés. D'autres facteurs pourraient être utilisés, comme le BDNF, un membre de la famille des neurotrophines, dont le récepteur TrkB est également exprimé par les neurones dopaminergique de la substance noire. Toutefois ces facteurs neurotrophiques doivent être apportés localement, parce qu'ils ne franchissent pas la BHE et que, dans le SNC, leur action n'est pas restreinte aux seuls neurones dopaminergiques. Plusieurs stratégies d'apport neurotrophiques ont été étudiées : elles passent par l'instillation *via* des pompes osmotiques (Yurek, 1998), par l'implantation répétée de microcapsules contenant le facteur neurotrophique (Gouhier et al., 2002 ; Menei et al., 2000) ou de cellules programmées pour le produire (pour revue : Zurn et al., 2001). Enfin, une voie prometteuse consiste à construire des virus recombinants capables d'exprimer le gène du facteur trophique suite à leur injection intracérébrale au niveau du corps cellulaire des cellules dopaminergiques dans la substance noire. De tels vecteurs sont actuellement dérivés de l'adénovirus, de lentivirus dont l'HIV, ou du virus associé à l'adénovirus (AAV) (pour revue : Bjorklund et al., 2000). Des progrès constants permettent d'atténuer leur cytotoxicités et d'augmenter leur capacité à promouvoir une expression prolongée du transgène. Des virus capables de provoquer une synthèse de GDNF ont montré leur intérêt dans des modèles animaux de MP (Bilang-Bleuel et al., 1997, Kordower et al., 2000, McGrath et al., 2002). De façon plus originale, notre équipe s'est affairée à une autre stratégie basée sur

l'expression ectopique du récepteur au NGF, TrkA, rendant les neurones dopaminergiques transduits sensibles à ce facteur présent au niveau de leur terminaison axonale dans le striatum. Les neurones transduits par l'AAV-TrkA sont alors significativement protégés d'une lésion à la 6-OHDA (*Cf. Addendum*).

2.1.3.4 Apport de dopamine par autogreffe de cellules non-neurales

Partant du principe qu'un apport en dopamine dans le striatum devrait réduire ou supprimer des symptômes parkinsoniens, des autogreffes de cellules médullo-surréaliennes ont été tentées chez l'animal dans les années 80 (Pour revue : Freed et al., 1990 ; Hansen et Gash, 1991). Cependant, chez l'homme, la survie de ces cellules dans le SNC était de courte durée ce qui interdisait toute intégration possible dans le réseau striatal (Barker et Dunnet, 1993). Le bénéfice de leur transplantation était faible, sinon nul, peut-être par manque de phénotype neuronal (pour revue : Björklund et Lindvall, 2000). Ce type d'intervention provoquait, en outre, une importante morbidité liée à la double intervention chirurgicale (abdominale, puis neurochirurgicale), et cette voie a été totalement abandonnée.

L'utilisation de virus amenant la tyrosine hydroxylase, première enzyme de la synthèse des catécholamines, ou la transplantation de cellules programmées pour exprimer cette enzyme, sont restées essentiellement du domaine de l'expérimentation animale (Date et al., 2000), même si des essais cliniques se sont engagés au Japon (Date et Ohmoto, 1999 ; Tseng et Aebischer, 2000).

La greffe de cellules de Sertoli est probablement une piste intéressante elle aussi, car elles exercent une forte immunosuppression locale et sont productrices de facteurs neurotrophiques (Widenfalk et al., 1997). Leur transplantation, seule ou combinée à des cellules chromaffines, a montré des améliorations significatives des symptômes chez le rat parkinsonien (Sanberg et al., 1996 , 1997). Il pourrait en aller de même des cellules de Müller, astrocytes particuliers trouvés dans la rétine, ou des corps carotidiens, qui outre leur capacité à produire des catécholamines, peuvent aussi constituer une source efficace de GDNF (Espejo et al., 1998 ; Luquin et al., 1999 ; Garcia et al., 2002).

2.2

Les cas d'allogreffes

2.2.1 Données expérimentales :

Il y a déjà un siècle, des allotransplantations de cortex dans le cortex étaient réalisées sur des modèles animaux. Depuis les années 90, un nombre considérable d'études ont prouvé que les allogreffes de tissus riches en cellules dopaminergiques, issus de mésencéphale ventral (MV) embryonnaire, pouvaient survivre, croître, développer des connections avec le tissu hôte, et contrebalancer les effets d'une lésion chez le rat rendu hémiparkinsonien par l'injection unilatérale de 6-OHDA (Björklund et Stenevi, 1979, Perlow et al., 1979).

Le SNC est un terrain peu propice à la croissance axonale, qui est en particulier insuffisante pour que des neurones dopaminergiques fœtaux implantés dans la substance noire réafférentent efficacement le striatum (pour revue : Isacson et Deacon, 1997). En revanche, placés directement dans le striatum, ces neurones immatures émettent des axones qui colonisent en partie cette structure, synthétisent et libèrent de la dopamine, et peuvent former avec les neurones du receveur des synapses dont la fonctionnalité a été démontrée (Mahalik et al., 1985 ; Wuerthele et al., 1981. Schmidt et al., 1982). Réciproquement, les neurones transplantés sont susceptibles de recevoir des afférences du striatum lui-même, même aussi du cortex frontal. Ainsi, une fraction des neurones mésencéphaliques fœtaux transplantés survivent de façon prolongée, et reconstituent, bien qu'en situation ectopique, une cytoarchitecture proche de la normale (Doucet et al. 1989).

A travers plusieurs épreuves comportementales, le caractère fonctionnel des implants a été démontré. C'est le cas de l'activité rotatoire, induite par l'amphétamine chez des rats ayant subi une destruction unilatérale de la substance noire par la 6-OHDA. Cette activité anormale, témoin de la dénervation dopaminergique, est supprimée, sinon même inversée quelques semaines après la greffe intrastriatale ipsilatérale de neurones mésencéphaliques (pour revue : Hudson et al., 1994 ; Herman et Abrous, 1994). Une autre information importante issue de ces études est que la survie prolongée de ces allogreffes est possible sans immunosuppression. Le greffon paraît 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. C'est ainsi qu'une greffe de peau du donneur peut provoquer une réaction de rejet de la part du receveur (Duan et al., 1997) ou plus simplement par immunisation du receveur (Freed et al., 1988 ; Poltorak et Freed, 1991 ; Hudson et al., 1994).

2.2.2 Application de l'allogreffe en clinique :

Au regard des ces données obtenues dans des modèles animaux, c'est tout logiquement que Lindvall et ses collaborateurs réalisent en Suède, à la fin des années 80, le premier essai clinique chez deux patients parkinsoniens dont le but primordial était d'étudier la survie des neurones dopaminergiques fœtaux transplantés dans le cerveau humain (Lindvall et al., 1989). Pour des raisons de méthodologie, ces premières données n'ont pas été concluantes quant à la survie du greffon, mais un an plus tard, la même équipe montre la première preuve de la survie des neurones dopaminergiques associée à des bénéfices cliniques substantiels (Lindvall et al., 1990). Depuis, de nombreux autres investigateurs ont montré que les allogreffes intrastriatales pouvaient induire des améliorations cliniques notoires chez le sujet parkinsonien. Après un délai de deux à trois mois, une majorité des patients présente une survie graduelle de la greffe et les expériences ont montré que jusqu'à 24 mois, ces patients passaient plus de temps en phase « on », et montraient une sévérité réduite de la rigidité et des bradykinésies en phase « off », la phase d'échappement à l'action médicamenteuse (Defer et al., 1996 ; Freeman et al., 1995 ; Hauser et al., 1999 ; Kordower 1995, 1998 ; Lindvall et al, 1992, 1994 ; Peschanski et al., 1994 ; Remy et al., 1995 ; Sawle et al., 1992). En une quinzaine d'années, c'est près de 350 patients atteints de Parkinson sévère qui ont été transplantés, dont une quinzaine en Suède et autant en France. Les patients reçoivent un traitement immunosuppresseur « d'appoint » pendant les 6 mois qui suivent l'opération et la survie du greffon est suivie régulièrement par des techniques d'imagerie cérébrale telles que l'IRM ou la tomographie par émission de positons (PET) mesurant la capture de la fluoro-dopa ($[^{18}\text{F}]$ -DOPA), une technique qui donne des indications sur l'importance de l'innervation dopaminergique *in vivo* (Langston et al., 1992 ; Brooks, 2000). Ces techniques d'imagerie ont permis de montrer la survie des neurones, la sécrétion dopaminergique et la réafférence corticale

10 ans après la transplantation (Piccini et al., 1999, 2000). Par ailleurs, l'évolution de l'état des patients après-greffe est suivie selon un protocole international, le CAPIT (core assessment program for intracerebral transplantation). Le bilan des études européennes paraît positif : sur les 30 patients européens greffés, l'un, en Suède, a vu ses symptômes disparaître et a pu se passer de L-dopa, et une dizaine d'entre eux ont vu certains de leurs symptômes moteurs s'atténuer, notamment la bradykinésie. En moyenne, l'augmentation de la restauration dopaminergique dans la zone malade est de 60%, 2 ans après greffe. D'une façon générale, la transplantation a permis de réduire les doses médicamenteuses de L-dopa.

2.2.3 Limitations de l'allogreffe neuronale :

Les études récentes conduites par Freed et ses collaborateurs, qui comparent, en double aveugle, les effets de la transplantation versus une opération placebo chez des patients parkinsoniens, montrent que les améliorations se retrouvent essentiellement chez le sujet jeune (<60 ans). En outre, certains de ces patients améliorés ont présenté des dyskinésies sévères et des dystonies faciales dans les deux ans qui suivent (Freed et al., 2001). Celles-ci sont peut-être liées à des problèmes techniques, résultant d'une réafférentation dopaminergique du striatum excessivement hétérogène. Le nombre limité d'embryons utilisés dans cette étude, le site d'implantation, et le peu de recul suite à la greffe (1 an) peuvent expliquer ces mauvais résultats (Olanow et al., 2001 ; Redmond et al., 2001 ; pour revue : Borlongan et Sanberg, 2002). Une évidente limitation de cette approche thérapeutique tient au fait que l'utilisation d'embryons issus d'interruption volontaire de grossesse pose de graves problèmes éthiques (Marshall, 2000). Il faut ajouter qu'il paraît aussi impossible de programmer les avortements à l'avance et qu'il est difficile de contrôler la présence d'agent pathogène dans le tissu. L'utilisation de produits chimiques abortifs et la tendance aux IVG précoces entraînent un déficit de source matérielle pour l'allogreffe neuronale. En outre, la transplantation bilatérale d'un patient parkinsonien requiert plusieurs fœtus. Ceci implique qu'indépendamment des difficultés d'ordre méthodologiques, il est illusoire d'envisager de parvenir à transplanter les 100.000 patients parkinsoniens actuels en routine.

2.3

La xénogreffe

Les problèmes liés à l'utilisation de cerveaux embryonnaires humains issus d'avortements ont conduit à chercher d'autres donneurs. Comme le proposait déjà Freeman et ses collaborateurs à la fin des années 80, une alternative intéressante est l'utilisation de tissu xénogénique tel que le porc (Freeman et al., 1988). Les problèmes éthiques s'en trouvent restreints, tandis que la disponibilité tissulaire est accrue. La viabilité et la pureté du matériel cellulaire peut-être facilement standardisée, la présence d'agents pathogènes facilement détectée et le donneur peut aussi être génétiquement modifié pour augmenter la survie du greffon.

2.3.1 Le porc comme donneur :

2.3.1.1 Xénogreffes concordantes ou discordantes

A l'instar de l'allotransplantation, la xénotransplantation est définie comme la transplantation entre espèces différentes. Mais une distinction peut-être faite entre des transplantations réalisées entre espèces relativement proches, appelées xénogreffes concordantes, et les transplantations entre espèces plus éloignées, appelées xénogreffes discordantes. Ces différences phylogéniques peuvent entraîner des variations immunologiques notamment au niveau de la réponse innée (anticorps et complément). En effet, des rejets violents et rapides, appelés rejets hyperaigus, font intervenir des anticorps déjà présents chez le receveur, plus communément appelés xénoanticorps naturels (XAN). Dans le cas de l'homme et des singes les plus proches, c'est essentiellement la présence sur l'organe du donneur d'un épitope sucré, le Gal $\alpha(1-3)$ Gal, qui entraîne cette réaction (Galili et al., 1988). De même, l'activation du complément est très étroitement régulée par au moins 5 protéines espèce-spécifiques présentes à la surface des cellules. Dès lors qu'il existe des différences d'espèce entre les composants effecteurs et régulateurs du complément, il n'y a plus d'inhibition et des dommages peuvent apparaître. Ainsi, la greffe de tissu porcine chez l'homme est considérée comme discordante.

Cependant, même si des espèces présentent toutes deux l'épitope Gal $\alpha(1-3)$ Gal, elles peuvent quand même être considérées comme discordantes par la présence naturelle d'anticorps contre d'autres antigènes. Ainsi une greffe de tissu neural embryonnaire murin chez le cobaye peut-être considérée comme discordante, alors que sa transplantation chez le rat est considérée concordante (Larsson et al., 1999b). Les modèles de greffes de tissus porcins chez le rongeur sont aussi considérés comme discordants, tout en se rappelant que son application chez l'homme ferait en plus intervenir d'autres XAN tels que l'épitope Gal $\alpha(1-3)$ Gal.

2.3.1.2 Propriété du tissu porcine

Le porc est considéré comme le donneur le plus adapté en xénotransplantation humaine pour plusieurs raisons : l'une est qu'il est déjà utilisé à une large échelle pour la consommation, rendant l'utilisation d'une petite fraction pour usage médical éthiquement plus justifiable que l'utilisation du singe par exemple. Il est aussi génétiquement assez proche de l'humain avec une très grande partie de son génome identique (Johansson et al., 1995 ; Rettenberger et al., 1995). Les organes du porc sont généralement d'une taille et de fonction physiologique comparables à l'humain, même si certaines différences existent (Breimer, 1999). Le porc a aussi une durée de vie relativement longue (25 ans en moyenne), ce qui peut avoir une importance au regard de l'espérance de vie de l'organe ou des cellules transplantées (pour revue : Pedersen et Widner, 2000).

2.3.1.3 Risques des xéno greffes neuronales : PERV et autres infections

En plus des risques encourus par la chirurgie nécessaire à la transplantation, par l'anesthésie et par les traitements immunosuppresseurs, il existe celui de la transmission de pathogènes du donneur vers le receveur. Les risques de la chirurgie ne sont pas plus élevés en xénotransplantation qu'en allotransplantation, mais les doses d'immunosuppresseurs utilisés augmentent le risque d'infections et de tumeurs. Le problème majeur provient de la transmission éventuelle de rétrovirus porcins endogènes (PERV) qui sont naturellement intégrés dans le génome et qui se répliquent à chaque division cellulaire (Coffin, 1982). S'ils sont passifs et sans danger pour l'espèce qui les porte, leur exposition dans un environnement différent pourrait les

rendre actifs et pathogènes (Fishman, 1998). Si la transmission de PERV a été démontrée *in vivo* par transfert dans la souris immunodéficiente (Van der Laan et al., 2000) et *in vitro* entre cellules porcines et humaines, aucune trace de PERV n'a été détectée chez la centaine de patients ayant reçu du tissu porcin (Paradis et al., 1999).

En outre, la transmission d'autres pathogènes tels que le prion ou des virus spécifiques d'espèces tels que les paramyxovirus ou parvovirus porcins reste faible. En effet, en dépit d'une immunosuppression plus forte à long terme, les risques de transmission de pathogènes en xénotransplantation restent limités. En effet le tissu donneur étant facilement disponible, la recherche d'agents pathogènes peut-être effectuée sans difficulté avant toute transplantation.

2.3.2 La protection du greffon

Que ce soit en allo ou en xénotransplantation, une difficulté essentielle reste le faible taux de survie des neurones greffés. Sachant qu'il n'existe qu'un petit nombre de cellules exprimant la TH au sein du MV foetal, de l'ordre de 10% chez le rongeur, il faut compter que seuls 5 à 10% d'entre eux survivent aux opérations de prélèvement, de dissociation, puis de transplantation, probablement à cause du manque de nutriments, au stress métabolique et au traumatisme induit par l'opération chirurgicale (Kordower et al., 1998 ; Brundin et al., 2000).

- Il est bien établi que certains facteurs neurotrophiques, notamment le GDNF, employés en prétraitement des tissus à transplanter ou produits à partir de vecteurs viraux ou par des cellules génétiquement modifiées (Wilby et al., 1999 ; Rosenblad et al., 2000), améliorent la survie des neurones. De tels facteurs co-administrés à la greffe pourraient permettre d'accroître leur survie et leur différenciation après implantation. Les résultats obtenus au niveau de greffes intrastriales exposées à une source de GDNF, de BDNF ou encore de FGF basique sont très prometteurs (Rosenblad et al., 1998, 1999a, 1999b ; Yurek, 1998 ; Hoglinger et al., 2001 ; Zurn et al., 2001).
- D'autres traitements pharmacochimiques visent à réduire le taux de mortalité des neurones implantés en bloquant l'apoptose des cellules du greffon par l'utilisation de divers antioxydants agissant sur les radicaux libres oxygénés. Les lazaroides (tirilazad mésylate : aminostéroïdes

dérivés de la méthylprednisolone) ont des effets positifs sur la survie des neurones chez le rat (Nakao et al., 1994 ; Karlsson et al., 2002). Plus récemment, l'équipe de Brundin a implanté des neurones provenant de souris transgéniques pour la superoxyde dismutase, dont la durée de vie s'est trouvée quadruplée (Nakao et al., 1995). Mais l'utilisation de vecteurs viraux codant pour cette enzyme n'a cependant pas donné de résultats significatifs de la survie neuronale (Barkats et al., 1997).

- Une autre stratégie passe par l'inhibition des enzymes clés de l'apoptose, les caspases. Les inhibiteurs de caspases, comme l'anti-Ice convertase ou l'Ac-YVAD-cmk, permettent d'accroître jusqu'à 40% la survie des neurones transplantés (Schierle et al., 1999 ; Hansson et al., 2000 ; Helt et al., 2001).

- Dans les dernières années, les immunosuppresseurs ont aussi été décrits comme ayant des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices en plus de leur effet immunosuppresseur (Castilho et al., 2000). Ainsi l'administration de ciclosporine A (CsA) seule augmente l'immunoréactivité de la TH dans le rat normal et le rat parkinsonien (Borlongan et al., 1999 ; Matsuura et al., 1997). Mais pour passer la BHE, les dosages de CsA doivent être élevés et délivrés de façon chronique. Malheureusement, l'injection répétée de CsA induit des effets secondaires importants comme une néphrotoxicité et des hallucinations. Pour s'affranchir des effets secondaires de ces molécules,

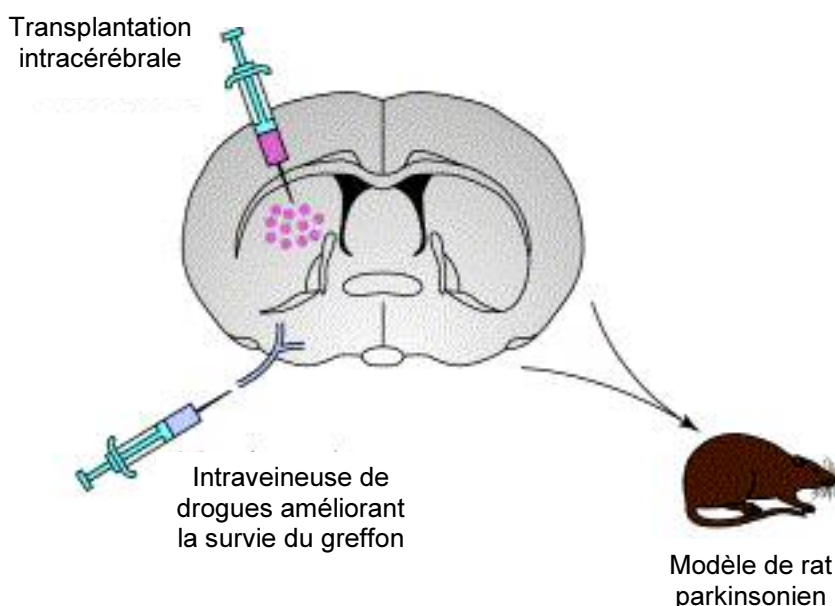


Fig. 15. L'injection d'agents protecteurs tels que des facteurs neurotrophiques ou des anti-apoptotiques simultanément à la transplantation accroît considérablement la survie du greffon dans les premiers jours. Tiré de Borlongan et Sanberg, 2002.

des analogues appelés neuroimmunophilines ont été développées et ont montré des résultats positifs dans des modèles parkinsoniens (Steiner et al., 1997 ; Costantini et al., 1998 ; Costantini et Isacson, 2000).

2.3.3 Effets restaurateurs de la xénogreffe neuronale

De nombreuses études ont montré que les xénogreffes neuronales intrastriatales pouvaient non seulement survivre, mais aussi réafférenter le striatum d'animaux receveurs immunodéprimés (Brundin et al., 1985 ; Inoue et al., 1985 ; Finsen et al., 1988 ; Honey et al., 1990 ; Sakai et al., 1991 ; Isacson et al., 1995 ; Pakzaban et al., 1995 ; Duan et al., 1996 ; Wood et al., 1996 ; Larsson et al., 2000). En outre, il a été démontré que la greffe était capable d'actions réparatrices remarquables dès 8 semaines après transplantation, c'est à dire qu'elle peut corriger le comportement rotatoire asymétrique induit par une lésion unilatérale de la substance noire du rongeur (Brundin et al., 1985 ; Huffaker et al., 1989 ; Hantraye et al., 1992 ; Galpern et al., 1996 ; Larsson et al., 2000). L'activité TH est décrite comme étant présente dans les cellules du donneur dès 4 semaines après leur transplantation et précède donc l'effet comportemental, sans doute corrélé à la production de dopamine (Clarke et al., 1988 ; Freeman et al., 1988). Des réafférentations notoires, associées à des effets restaurateurs, également associés à une large reconstruction de la cytoarchitecture normale, ont été démontrés dans d'autres modèles de pathologies neurodégénératives du rongeur, dont des modèles de chorée de Huntington ou de maladie d'Alzheimer (Deacon et al., 1999).

Cependant, les essais cliniques réalisés outre-Atlantique, tant chez des patients atteints de MP que de chorée de Huntington, n'ont pas révélé de récupérations fonctionnelles significatives en dépit de l'implantation d'un nombre élevé de cellules (Schumacher et al., 2000). L'examen post-mortem d'un patient a confirmé qu'après 7 mois, très peu de neurones porcins survivaient dans le striatum (Deacon et al., 1997 ; Fink et al., 2000). Malgré l'emploi d'immunosuppresseurs « généralistes », tout porte à croire que c'est un processus de rejet immunologique qui est responsable de cet échec.

2.3.4 Immunologie du rejet de xéno greffe

Malgré deux études montrant que les xéno greffes neuronales dans le SNC sont capables de survivre sur une période prolongée sans l'emploi d'immunosuppresseur (Björklund, et al., 1982 ; Daniloff et al., 1985), la plupart des études récentes, y compris les nôtres, indiquent que les xéno greffes neuronales provoquent, dans une très grande majorité des cas et en quelques semaines, une réaction immune de l'hôte menant à la destruction du greffon (Finsen et al., 1988, 1991 ; Duan et al., 1995 ; Wood et al. 1996 ; Larsson et al., 2000, 2001b).

2.3.4.1 Absence de rejet hyperaigu en xéno transplantation neuronale :

Basé sur la présence ou l'absence de XAN dans la circulation de l'hôte, nous avons vu que les xéno greffes discordantes vascularisées subissent un rejet hyperaigu dû à la reconnaissance par des anticorps circulants des xénoantigènes présents sur les cellules endothéliales du receveur (Holzknecht et Platt, 1995 ; Oriol et al., 1993), un phénomène qui s'accompagne de l'activation de la cascade du complément (Charreau et al., 1994 ; Dalmaso et Platt, 1993). Cependant les xéno greffes neuronales intracérébrales ne paraissent pas provoquer de rejet hyperaigu (Masson et al., 1986 ; Wood et al., 1996 ; Larsson et al., 1999b). Ceci est dû, en partie, au fait que les suspensions cellulaires de xéno neurones sont principalement vascularisées par les cellules endothéliales de l'hôte (Krum et Rosenstein, 1988 ; Broadwell et al., 1991). Malgré la présence de l'épitope α -Gal sur les cellules endothéliales et la microglie, et une certaine expression sur les neurones et les astrocytes du MV porcin embryonnaire (Sumitran et al., 1999b ; Harrower et al., 2002), il est suggéré que les transplants placés dans le parenchyme cérébral sont largement isolés de facteurs humoraux de l'immunité (XAN et complément) du fait de l'étanchéité de la BHE. L'utilisation du rat comme receveur dans notre modèle nous affranchit de la reconnaissance de l'épitope α -gal, puisqu'il est produit tant chez le donneur que le receveur. Pourtant, l'utilisation du tissu porcin dans les essais cliniques sur l'homme devra prendre en compte la présence de XAN, lorsque la barrière est momentanément ouverte par suite de l'opération chirurgicale.

2.3.4.2 Immunogénicité du greffon :

Le tissu cérébral embryonnaire est constitué de neurones, d'astrocytes, de cellules microgliales, de cellules endothéliales et de leurs précurseurs respectifs. Tous ces types cellulaires contiennent des protéines et des glycolipides qui peuvent être dégradés en antigènes et présentés par les APC de l'hôte. A l'inverse, les antigènes du CMH sont peu abondants dans le SNC adulte et en développement : nous avons vu que le CMH de classe I est présent sur les cellules endothéliales, les neurones électriquement inactifs, et passablement la microglie et les astrocytes, tandis que les molécules de classe II sont démontrées sur la microglie et dans certains cas, les astrocytes. Cependant les conditions de greffes et le traumatisme qui en découle peuvent influencer l'expression des CMH du donneur et en conséquence peuvent rendre la greffe plus immunogène, malgré la pauvreté des antigènes du CMH *in situ*. En effet, il existe une expression temporaire de CMH de classe I sur les neurones après leur implantation (Masson et al., 1986 ; Finsen et al., 1991 ; Duan et al., 1995), dont le masquage par des anticorps appropriés, ou l'utilisation de donneur KO en CMH I, paraît prolonger la survie d'une xéno greffe (Pakzaban et al., 1995 ; Dinsmore et al., 1996 ; Duan et al, 2001 ; Veng et al., 2002). Par ailleurs, le tissu foetal utilisé pour la préparation des donneurs contient des cellules non-neuronales, en particulier des cellules endothéliales ou microgliales. C'est en particulier le cas du MV d'embryons âgés de 25-28 jours. Si l'immunogénicité des cellules endothéliales embryonnaires porcines n'a pas été démontrée, elle est fort probable, puisque *in vitro*, les cellules endothéliales aortiques porcines (PAEC) expriment constitutivement les molécules des CMH de classe I et le récepteur B7, et elles peuvent être directement reconnues par les cellules T humaines et induire une prolifération des lymphocytes CD8⁺ (Murray et al., 1994). En outre, elles répondent à la présence de cytokines pro-inflammatoires par une expression accrue des molécules du CMH de classe II et peuvent alors induire une prolifération de lymphocytes CD4⁺ (Batten et al., 1996). Quant à la microglie issue des suspensions cellulaires utilisées pour la xéno greffe, elle peut induire, en culture, une réponse proliférative des T humains (Brevig et al, 1997, 1999). Ainsi, les différentes études des réponses T effectuées *in vitro*, ouvrent la possibilité que les cellules endothéliales et la microglie puissent être reconnues de façon directe, c'est à dire se comporter comme une APC du donneur capable

d'activer les lymphocytes de l'hôte. De plus, il a été observé des différences de cinétique de rejet de cellules xénogéniques. En effet, les cellules endothéliales bovines implantées dans le cerveau du rat, sont rejetées plus rapidement que des cellules chromaffines (Czech et al., 1997).

2.3.4.3 Rôle secondaire du complément et des immunoglobulines au moment du rejet :

Cette possibilité est confortée par le fait qu'*in vitro*, les facteurs du complément humain sont capables de provoquer une lyse de tissu neural porcin suite à leur liaison aux anticorps préformés (voie d'activation classique ; Sumitran et al., 1999b).

En revanche, ces facteurs n'occupent pas de rôle primordial dans le rejet d'une xélogreffe neuronale, puisque la survie de celle-ci n'est pas prolongée lorsqu'elle est effectuée dans le cerveau de souris déficientes en complément. C'est essentiellement l'activation microgliale qui est retardée (Larsson LC. et Widner H., données non publiées). De la même façon, l'injection de facteur de venin de cobra, connu pour dépler 95% des facteurs du complément, n'améliore pas la survie de xélogreffes neuronales porcines chez le rat (Barker et al., 2000). Cependant, il ne faut pas oublier que la microglie, les astrocytes et les neurones expriment tous les récepteurs du complément et que les facteurs du complément peuvent être également synthétisés par ces cellules lors de l'inflammation. Ainsi, si les facteurs du complément ne sont pas directement capables de lyser le tissu porcin *in vivo*, ils peuvent enclencher des réponses cellulaires en agissant comme chimioattractants et activateurs des cellules microgliales, par exemple. En effet, le complément peut avoir un effet sur le mécanisme de présentation antigénique aux cellules T (Arvieux et al., 1988) et sur la prolifération des cellules T en réponse à l'IL-2 (Erdei et al., 1984). Il est alors possible que le complément contribue à déclencher l'infiltration leucocytaire (Pratt et al., 1996) et il pourrait même accroître l'immunogénicité du greffon (Dempsey et al., 1996).

De la même façon, dès les premiers jours après transplantation, les immunoglobulines peuvent librement pénétrer le parenchyme cérébral, du fait de la rupture de la BHE. Des études ont montré que la BHE peut rester ouverte jusqu'à une à deux semaines après l'implantation de suspensions neuronales (Brundin et al., 1989). Pourtant l'absence de rejet dans les premières semaines suivant l'implantation, suggère que les anticorps n'exercent pas de rôle déterminant dans le

processus de rejet. Leur présence ne doit pas être négligée, puisqu'une étude utilisant des souris déficientes en immunoglobulines, montre que le rejet est retardé dans ce type de receveurs (Larsson et al., 1999a).

2.3.4.4 Les cellules NK en xénotransplantation :

Une étude *in vitro* a démontré que les cellules NK humaines n'étaient capables de lyser les cellules du MVI foetal porcin qu'en présence d'IL-2 et lorsque les XAN du sérum humain y étaient ajoutés (Sumitran et al., 1999b). Il est probable que la microglie et les cellules endothéliales, plus faiblement représentées dans le MV, soient responsable de cette lyse, car ces cellules portent l'épitope Gal $\alpha(1-3)$ Gal qui est reconnu par les NK humaines (Inverardi et al., 1997). Dans la plupart des rejets de xéno greffes de neurones, les NK ont été détectées, bien qu'elles soient moins nombreuses que les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺. Des études visant à dépléter les NK et les NK-T (déplétion par anticorps anti-NK1.1, un épitope présent sur les NK et les NK-T, ou souris transgéniques mutées pour la molécule CD1d1, nécessaire au développement des NK-T) n'ont pas donné de résultats significatifs quant à la survie du greffon porcin (Larsson et al., 2001a). Les NK n'apparaissent pas essentielles dans le rejet de xéno greffes cellulaires comme, du reste, dans les xéno greffes d'organes (Karlsson-Parra et al., 1996 ; Manilay et Sykes, 1998). Comme une complémentarité aux anticorps, il est aussi probable que la présence et la fonction des NK dans le rejet de xéno greffe soit essentiellement liées aux mécanismes effecteurs tels que l'ADCC.

2.3.4.5 Cas des lymphocytes $T_{\gamma\delta}$: La molécule CD1, présente sur les cellules NK, est aussi présente sur les lymphocytes $\gamma\delta$ et sa déplétion entraîne des greffes significativement plus larges, sans pour autant empêcher le rejet (Larsson et al., 2001a). Ces résultats suggèrent qu'une partie de la présentation des antigènes peut se faire *via* la molécule CD1 (impliquée dans la présentation des glycolipides très présents sur les cellules gliales dans les suspensions cellulaires), mais c'est probablement une autre voie de présentation, *via* les lymphocytes $\alpha\beta$, qui doit initialement être impliquée dans le processus de rejet.

2.3.4.6 Implication majeure des $LT_{\alpha\beta}$ dans le rejet de xénogreffes :

Si, *in vitro*, le tissu mésencéphalique porcin embryonnaire est décrit comme ayant la capacité d'induire une prolifération des cellules T humaines (Brevig et al., 1997), il est clairement établi que le rejet de ce type cellulaire placé en situation xénogénique implique aussi le recrutement de LT. En effet, en plus de l'observation d'un infiltrat massif de LT lors du rejet de xénogreffes neuronales intracérébrales chez l'animal (Finsen et al., 1988, 1991 ; Duan et al., 1995 ; Wood et al. 1996 ; Larsson et al., 2000, 2001b, et *Cf. Résultats 1 et 2*), il est démontré que ce rejet peut-être prévenu, ou fortement retardé, par le traitement du receveur avec des anticorps dirigés contre le TCR ou le récepteur à l'IL-2 (Honey et al., 1990 ; Wood et al., 1996 ; Okura et al., 1997 ; Honey et Shen, 1999). Il en va de même pour des immunosuppresseurs tels que la CsA ou plus récemment, le tacrolimus (ou FK506), connus pour inhiber les LT (Brundin et al., 1989 ; Pakzaban et al., 1995 ; Duan et al., 1996 ; Pedersen et al. 1995, 1997 ; Alemdar et al., 2001 ; Wennberg et al., 2001).

Dans le but de déterminer laquelle des sous-unités CD4 ou CD8 est impliquée dans le rejet de xénogreffes neuronales, des études ont été faites par déplétion spécifique d'une ou l'autre de ces sous-unités. Il a ainsi été mis en évidence que le type CD4 était largement impliqué dans le rejet, puisque sa déplétion entraîne une survie indéfinie du greffon, alors que la déplétion en CD8 n'induit qu'un retard dans le rejet et ne représente donc qu'un mécanisme secondaire (Honey et al., 1991 ; Wood et al., 1996 ; Duan et al., 2002). La participation du sous-type lymphocytaire CD4 avait déjà été soulignée dans le rejet de xénogreffes de peau ou d'îlots pancréatiques porcins (Friedman et al., 1999a, 1999b). C'est sur la base de ces informations, qu'il nous ai paru essentiel de comprendre quels sont les mécanismes qui mènent au recrutement et à l'activation de ces cellules.

Objectifs

- Dans la première partie de ce travail, nous avons cherché à comparer la cinétique de rejet de cellules fortement immunogènes, les PAEC, à des suspensions de tissu mésencéphalique foetal porcin, principalement constitué de neurones immatures. Nous avons également analysé les cinétiques d'infiltration associées au rejet, afin de déterminer s'il était basé sur une mobilisation lymphocytaire, ou bien mené par les seuls macrophages.
- Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons cherché à cerner le rôle des LT dans le rejet. Depuis qu'il a été observé que le rejet de xénogreffes neuronales pouvait être prévenu par un traitement visant à supprimer l'action des LT, il nous a paru essentiel de comprendre quels étaient les mécanismes moléculaires qui conduisent au recrutement de ces cellules dans le SNC. En effet, jusque là, c'est sur la base d'études immunohistochimiques que ces faits ont été observés. La nature et la cinétique d'expression de chimiokines et des cytokines de l'hôte suite à la xénogreffe neuronale sont peu documentées, de même que la spécificité moléculaire du TCR des lymphocytes infiltrant ce type de greffon. Ainsi, une grande partie de ce travail s'est basée sur l'utilisation de la PCR en temps réel sur des échantillons de striatum ayant reçu une xénogreffe de MV porcin foetal. Cette approche technique est connue pour fournir des mesures quantitatives fiables des ARN messagers y compris dans des extraits de tissus cérébraux (Baranzini et al., 2000 ; Wang et al., 2000). Aussi, nous avons d'abord cherché à justifier la présence de LT dans le cerveau des rats greffés, par la détection moléculaire des transcrits de la chaîne constante β du TCR ($C\beta$). Par la suite, c'est par l'analyse de la régulation de l'expression des transcrits de chimiokines et de lymphokines, que nous avons cherché à décrire la balance des cytokines produites par, ou permettant l'expansion des types de lymphocytes auxiliaires Th1 ou Th2, puisque cette polarisation paraît prédictive de l'évolution de la greffe (Xiao et Link, 1999 ; Aloisi et al., 2000).

- Dans une troisième partie, nous nous sommes particulièrement intéressés à la description du répertoire des LT infiltrant le greffon, qui passe par l'étude des différents réarrangements de la chaîne V β du TCR. L'apport d'un savoir technologique propre au laboratoire (TcLandscape®, Guillet et al., 2001), mêlant l'aspect qualitatif et quantitatif du répertoire T, peut nous aider à observer l'émergence d'un clone lymphocytaire particulier lors de l'infiltration du greffon. Ceci dans le but de nous aider à déterminer si la réponse cellulaire aux xénogreffes neuronales est la conséquence d'un unique antigène ou s'il s'agit d'une réponse multigénique. En outre, la comparaison du répertoire en lieu et place de la réaction inflammatoire, avec celui observé dans certains organes lymphoïdes secondaires, pourrait nous apporter une information supplémentaire quant à l'activation et l'origine des acteurs de l'immunité qui régissent ce type de rejet.

Matériels et Méthodes

1. Préparations cellulaires

Les cellules endothéliales aortiques porcines (PAEC) sont isolées à partir d'aorte de jeunes porcs (âgés de 30 jours) par digestion à la collagénase (1U/ml, Boehringer, Mannheim, Allemagne) et cultivées en boîtes de Pétri prétraitées avec de la gélatine 1% (Nunc, Roskilde, Danemark) dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 4.5 g/l de glucose, et additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF), 2 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (tous les composés proviennent de Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France). Les cellules sont utilisées aux passages 2 à 5. Après rincage par du PBS (tampon phosphate salin), elles sont détachées par traitement à la trypsine, lavées par centrifugation et ajustées à la concentration désirée dans du HBSS (Hank's balanced salt solution, Gibco BRL). Une analyse par cytofluorométrie en flux (FACS) permet de confirmer que ces cellules expriment à leur surface les antigènes du CMH de classe I et l'intégrine β -1 porcine, révélés par un marquage avec un anticorps spécifique monoclonal décrit plus bas.

Les neurones mésencéphaliques foetaux porcins sont obtenus à partir de truies domestiques (Large White) dont la gestation a été confirmée par ultrasons, 27 à 28 jours après insémination artificielle. Ils sont sacrifiés dans un abattoir accrédité (INRA Nouzilly), et les embryons sont recueillis dans du HBSS après hystérectomie. Le mésencéphale ventral (VM) est prélevé selon la méthode décrite par Huffacker et ses collaborateurs (1989), et sont placés dans un milieu d'hibernation à 4°C comme décrit (Kawamoto et Barett, 1986 ; Frodl et al., 1995), pour une durée de 5 à 7 jours. En effet, l'hibernation ne peut se faire que pour un temps limité, autour d'une semaine, avant que le taux de survie ne commence à décroître (Petersen, 2000).

La préparation des neurones est adaptée à partir de procédures précédemment publiées (Galpern et al., 1996 ; Larsson et al., 1999b) : les morceaux sont incubés dans 5 ml d'HBSS additionné de trypsine 0.1% (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 20 minutes à 37°C. Puis, la réaction est stoppée par l'addition de SVF à 10% final. Les tissus sont lavés avec précaution 3 fois

dans du HBSS additionné de DNase 0.01% (Sigma), puis incubés 10 minutes à 37°C dans le même milieu. Les cellules sont alors dissociées par trituration à l'aide d'une pipette Pasteur, et centrifugées à 750 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans du HBSS avec DNase, et un aliquot de cellules est utilisé pour la numération. De telles préparations cellulaires sont décrites comme contenant très peu d'astrocytes et de cellules microgliales (Brevig et al., 1999). La viabilité est contrôlée par exclusion d'éosine. Les suspensions neuronales sont ajustées à la concentration de 2×10^5 cellules/ μ l.

2. Animaux et procédures chirurgicales

Des rats mâles syngéniques LEW.1A d'environ 250 g sont utilisés comme receveur. Ils sont fournis par Charles River (Rouen, France), conservés et manipulés dans une animalerie confinée en accord avec les normes françaises. Les rats sont anesthésiés par 2 injections intrapéritonéale successives de Rompun 2% (0.2 ml /250 g), et 10 minutes plus tard, d'Imalgen 500 (0.4 ml/250g). Les animaux sont placés dans un cadre stéréotaxique (Stoeling, Wood Dale, IL, USA) et après le prélèvement d'une petite section carrée de l'os recouvrant les coordonnées désirées, les rats sont transplantés avec une suspension cellulaire de neurones foetaux porcins (PNEU), ou de cellules endothéliales aortiques porcines (PAEC). Des injections intrastriales sont réalisées de façon bilatérale dans 2 sites, aux coordonnées suivantes, en relation avec le bregma et la surface de la pie-mère : antérieur: +0.7 mm ; latéral, \pm 2.8 mm ; ventral, -5.4 et -5.0 mm ; barre d'incision à -3.3 mm.

Les cellules sont injectées avec une seringue Hamilton de 10 μ l, montée sur un microinjecteur automatique (Phymep, Paris, France). Chaque site reçoit 1 μ l de suspension cellulaire sur une période d'une minute. Après un délai de 5 minutes, la seringue est lentement retirée, les fragments d'os sont replacés sur le crâne, et les incisions dans la peau sont recousues. Les animaux reçoivent un total de 4×10^5 cellules (PAEC ou PNEU) par hémisphère, selon les expériences. Aux temps désirés, les rats sont sacrifiés par inhalation de CO₂, et les cerveaux sont prélevés chirurgicalement. Pour les analyses immunohistologiques, les hémisphères droits sont congelés dans de l'isopentane à environ -35°C, et conservés à -80°C. Les hémisphères gauches sont

rapidement disséqués au niveau du striatum puis sont directement congelés dans de l'azote liquide, pour les expérimentations de biologie moléculaire. La même procédure est effectuée pour l'isolement de la rate et des ganglions lymphatiques cervicaux profonds (DCLN).

Le sang est prélevé par ponction cardiaque (environ 10ml par rat) et recueilli dans des tubes héparinés. Les lymphocytes du sang périphérique (PBL) sont purifiés sur gradient de Ficoll : 10 ml de sang dilués dans 10 ml de PBS sont déposés sur 10 ml de Ficoll (Amersham Biosources, Suède) et centrifugés 20 minutes (1800 tours par minute, 20°C, sans frein). L'anneau contenant les PBL est recueilli et lavé deux fois avec du PBS, puis les cellules sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante avec 6 ml de solution de lyse des globules rouges (solution hypotonique : NH_4Cl 10,36g/L, KHCO_3 1,25g/L, Na_2EDTA 46,5mg/L, pH=7,2), lavées et filtrées au travers d'une toile de nylon de 100 μm de maille (Polylabo, Paris, France).

3. Immunohistochimie

Des sections de 14 μm obtenues avec un cryostat Leica sont montées par 2,3 ou 4 sur des lames pour microscope, et conservées à -80°C pour un usage ultérieur. Chaque neuvième section est marquée au cresyl-violet (Chroma, Köngen, Allemagne) afin de localiser le greffon. Les sections adjacentes sont laissées 10 minutes à température ambiante, puis fixées pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde 4% refroidi dans du PBS à pH 7.4. Après 3 lavages de 5 minutes dans le même tampon, les peroxydases endogènes sont saturées avec de l' H_2O_2 à 0.3% dans du PBS, à température ambiante. Après 3 nouveaux lavages dans du PBS, les lames sont exposées pendant environ 30 minutes à 10% de sérum de chèvre dans du PBS contenant 4% d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma). Pour les marquages intracellulaires tels que iNOS, GFAP ou NF-70, le tampon contient également 0.1% de Triton X100. Tous les anticorps (tableau 3) sont dilués dans du PBS contenant 4% de BSA. Du Triton est ajouté dans les 3 cas mentionnés précédemment. L'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée durant la nuit à 4°C. L'incubation avec l'anticorps secondaire est réalisée pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages dans du PBS, les coupes sont exposées à un complexe avidine biotine peroxydase (excepté pour la GFAP)

pendant 1 heure à température ambiante (Vectastain ABC kit, Vector), et révélées avec le substrat VIP (Vector's very intense purple).

Après 5 minutes dans de l'eau distillée, les lames sont contre-colorées avec de l'hématoxyline, et après un nouveau lavage, incubées dans du carbonate de lithium. Les préparations sont à nouveau lavées dans de l'eau, et déshydratées pendant 2 minutes dans des bains successifs d'éthanol (70, 80, 95%), plongées dans du xylène pendant 10 minutes et montées dans du liquide Eukkit (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France). La mort cellulaire est attestée par marquage de l'ADN fragmenté à l'aide d'une terminale déoxynucleotidyle transférase et de nucléotides marqués à la digoxigénine. Le matériel incorporé est révélé par un anticorps anti-digoxigénine conjugué à la peroxydase, en accord avec les instructions du fabricant (Apoptag Plus Kit of Oncor, Gaithersburg, MD, USA). Un marquage VIP est ensuite réalisé comme décrit plus haut.

4. Extraction d'ARN et rétrotranscription (RT)

Selon les expériences, les ARN totaux ont été extraits selon deux techniques qui ont montré une qualité d'ARN et des rendements équivalents. Les fragments de cerveaux entourant les striata, les rates ou les DCLN, sont placés dans des tubes contenant soit du chlorure de lithium/Urée (3 ml pour 100 mg de tissu, Auffray et Rougeon, 1980), soit directement dans du TriZol® (Life Technologies, 1 ml pour 100 mg de tissu) pour homogénéisation par broyage mécanique et ultrasons (Ultra Turrax, IKA®-WERKE, Allemagne). Ils sont alors précipités dans la glace sur la nuit (Méthode LiCl) ou à température ambiante pendant 15 minutes (Méthode Trizol®). Après séparation par addition de phénol/chloroforme, la phase aqueuse contenant les ARN totaux est récupérée (sauf cas du Trizol® car ce réactif contient déjà du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine permettant d'isoler les ARN en une seule étape selon la méthode de Chomczynski et Sacchi, 1987). Les ARNm sont précipités dans l'isopropanol, récupérés par centrifugation, puis le culot est lavé à l'éthanol. Après séchage, l'ARN est resuspendu dans de l'eau pour préparation injectable et la concentration est évaluée par la mesure de l'absorbance à 260 nm, puis ajustée à 1µg/µl. L'intégrité de l'ARN et l'absence d'ADN génomique sont vérifiées par fractionnement des échantillons par électrophorèse sur gels dénaturants, qui, après marquage au bromure d'éthidium

et analyse au densitomètre, nous donne le rapport des quantités d'ARN ribosomiaux 28S sur 18S qui reflètent la qualité des ARN totaux (L'intensité de la bande de 28S devant être deux fois supérieure à celle de 18S).

Les ARNm sont rétrotranscrits en utilisant un première amorce désoxyribonucléique d'oligo dT (18-25 mers, à 10 mM en concentration finale) qui s'hybride avec la queue polyadénosylée des ARNm. Dix microgrammes d'ARN sont ajoutés à 1µl d'oligo-dT, à du dithiothréitol à 8 mM en concentration finale, et avec des dNTP (désoxynucléotides-triphosphates) à 0.5 mM en concentration finale, dans un volume final de 17µl, et chauffé pendant 10 minutes à 70°C pour permettre la dénaturation des acides nucléiques. Dans l'étape suivante, 1µl de RNAsine (40U/ml) et 1µl d'enzyme reverse transcriptase (Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase, 200U/ml) sont ajoutés aux échantillons dans un volume final de 25µl de 50 mM Tris, pH 8.3, 3 mM MgCl₂, 125 mM KCl. Après 1 heure d'incubation à 42°C (synthèse des acides désoxyribonucléiques), on ajoute de 5 (échantillons sanguins, DCLN) à 75µl (striata, rates) d'eau pour préparation injectables, puis l'ADN complémentaire (ADNc) est conservé à -80°C.

5. Analyse quantitative par PCR en temps réel (TaqMan®)

La PCR quantitative TaqMan® permet la détection directe des produits de PCR par la mesure de l'augmentation progressive de la fluorescence émise par l'attache du fluorochrome, le SYBER Green, au cours de la synthèse des doubles brins d'ADN.

Autant que possible, les amorces oligonucléotidiques sont choisies de manière à s'hybrider à l'ADN à une température de 60°C (T_m :66°C) et permettent d'amplifier des fragments compris entre 100 et 300 pb. Elles sont présentées dans le tableau 4 (les amorces Vβ font actuellement l'objet d'un brevet et ne sont disponible que sur demande à TcLand, <http://www.TcLand.fr>). Pour calibrer la PCR quantitative, des standards sont synthétisés dans des conditions de PCR classiques (40 cycles de 15 secondes à 95°C suivie d'une minute à 60°C), dans un Thermocycleur (model 9700 ; Perkin-Elmer, Foster City, CA). Les pools d'ADNc sont obtenus à partir d'échantillons riches en ARNm correspondants à ces gènes. Dans notre cas nous avons utilisé des ARN extraits de rates de rats rejetant une allogreffe cardiaque. L'amplification d'une unique

bande d'ADN de la taille moléculaire attendue pour chaque paire d'amorce est vérifiée sur gel d'agarose (1.5%) en conditions dénaturantes après marquage par le bromure d'éthidium. Les fragments sont découpés sur le gel et purifiés avec un kit d'extraction (Gel extraction Kit, Qiagen, Allemagne). La concentration des fragments est déterminée par densitométrie à 260 nm et ajustée selon leur masse moléculaire respective. Ces standards sont ensuite dilués afin d'obtenir une gamme de 10^7 à 10^2 copies par puits en plaque 96 puits à faible absorbance (Applied Biosystems, Foster City, CA). Une quantité constante de 10 μ l, équivalente à 200 ng d'ARN ayant subi une rétrotranscription, ou le volume identique de copies de standard, a été amplifié avec 15 μ l d'une mixture comprenant 0.5 U d'AmpliTaq Gold polymérase, chacun des 4 dNTPs (0.2 mM), dont le dUTP est remplacé par un dTTP marqué au SYBER Green, chacune des amorces (300 nM) et du chlorure de magnésium (3 mM final) dans un tampon Tris du fournisseur (TaqMan PCR Core Reagent, Applied Biosystems). L'amplification est réalisée dans un séquenceur ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystem) comme décrit précédemment (Gagne et al., 2000). La réaction commence par une étape de 10 minutes à 50°C pour enlever tous les résidus uracyl incorporés dans les ADN complémentaires avec 1 unité de Uracyl-N-glycosylase (AmpErase reagent). Ceci est suivi par une incubation de 10 minutes à 95°C permettant la dénaturation de l'ADNc et l'activation de l'AmpliTaq Gold, puis ensuite 40 cycles, chacun constitués de 15 secondes à 95°C et d'1 minute à 60°C. A la fin de chaque expérience, les produits d'amplifications sont fractionnés sur gel afin de vérifier qu'il n'apparaît qu'une bande unique de la taille désirée. Chaque échantillon est analysé en dupliquât. Pour l'analyse quantitative, la détection directe des produits de PCR est réalisée par la mesure de l'augmentation progressive de la fluorescence émise par l'attache du fluorochrome SYBER Green à l'ADN double brin (Fig. 16A). Le nombre de copies est obtenu par relation entre la fluorescence mesurée à la valeur seuil (Ct) dans les échantillons par rapport à la courbe étalon définie par les standards (Fig. 16B). Les données sont directement collectées par compensation spectrale et analysées avec le logiciel adéquat (ABI Prism 7700 Sequence Detector software). Pour minimiser les variations expérimentales d'un échantillon à l'autre (par exemple, les différences de rendements d'extraction, d'intégrité de l'ARN et d'efficacité de la RT), le nombre de copies de chaque transcrite est normalisé

par rapport au nombre de copies de transcrits d'un gène de ménage, l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT). Il a aussi été vérifié que le nombre de copies de transcrits d'HPRT était du même ordre pour tous les points, c'est à dire dans le cas des striata, le nombre de copies d'ARNm d'HPRT se situe autour de 400 à 500 000 copies (pour 1µl issu de la réaction de RT), mais peut varier entre 100 000 et 800 000 copies dans certains échantillons. Des contrôles ont montré que le nombre de copies de transcrits d'HPRT était non significatif quand l'étape de RT était omise (pas de contamination d'ADN génomique). Les analyses statistiques présentées dans la section Résultats sont réalisées *via* des tests non-paramétrés de Mann-Withney.

6. Analyse du répertoire du TCR β

L'analyse du répertoire du TCR permet d'évaluer la diversité d'une population de lymphocytes T au cours d'une réponse immunitaire. Cette analyse est basée sur l'étude des longueurs de la région hypervariable CDR3 de la chaîne β du TCR, dans une population de LT donnée. Un pool de cellules T au repos est caractérisé par une répartition gaussienne des différentes longueurs du CDR3 utilisant chaque gène V β (expansions polyclonales). En revanche, la mobilisation de clones T spécifiques de peptides antigéniques s'accompagne de l'usage préférentiel de certaines formes moléculaires du TCR β et donc de certaines longueurs de CDR3 (expansions oligo- ou monoclonales) (Rock et al., 1994). Ceci se traduit par une rupture de la distribution gaussienne des longueurs de CDR3. Pour examiner ce phénomène, la méthode utilisée au laboratoire combine l'analyse qualitative des perturbations du répertoire au niveau de la région CDR3 de la chaîne β du TCR grâce aux logiciels Immunoscope® (Pannetier et al., 1995 ; Gorochov et al., 1998) et l'analyse quantitative de l'expression transcriptionnelle de chaque gène V β par la technique de PCR quantitative en temps réel précédemment décrite. Cette approche nous permet d'avoir une vision plus réelle de la globalité du répertoire puisqu'elle associe les perturbations qualitatives à un nombre de copies de transcrits. La combinaison de ces deux techniques a été brevetée par le laboratoire sous le nom de TcLandscape®.

L'amplification par PCR des différentes régions CDR3 nécessite 2 amorces oligonucléotidiques, l'une spécifique de chacun des gènes V β , l'autre spécifique de la région constante C β (Fig. 17).

Nous possédons pour le rat 21 amorces qui correspondent à 21 gènes V β différents, sachant que les gènes V β 3, V β 5 et V β 8 regroupent plusieurs gènes de structures proches et que le segment V β 3.1 n'est pas fonctionnel chez le rat de souche LEWIS. La phase d'amplification est réalisée dans un mélange final de 50 μ l, comprenant 10 μ M de chaque amorce V β (5 μ l), auxquels sont ajoutés 45 μ l d'un mélange réactionnel composé de 1.5 ml de MgCl₂, 2.5 ml de chacun des dNTP, 30U/mL de Taq Polymérase, 0.5 μ M d'amorce C β et 10 d'ADNc dans un tampon de PCR (200 mM Tris HCl, pH 8.4 et 500 mM KCl). Après dénaturation à 94°C, l'amplification jusqu'à saturation se fait en 40 cycles (30 secondes à 95°C, 45 secondes à 60°C, 45 secondes à 72°C) dans un thermocycleur.

Les produits amplifiés sont ensuite soumis à une étape d'incorporation du fluorochrome (3 cycles, 30 secondes à 95°, 45 secondes à 61°C, 45 secondes à 72°C) effectuée avec une seconde amorce C β marquée en 5' par un fluorophore. Les produits d'amplification fluorescents sont séparés en fonction de leur longueur par migration sur gel d'acrylamide. Le profil de migration est analysé par un séquenceur d'ADN couplé au logiciel Immunoscope®. On obtient ainsi une image de la distribution des longueurs CDR3 pour chaque couple d'amorces. On peut observer 7 à 11 pics d'amplification, c'est à dire 7 à 11 tailles de CDR3, séparés chacun de trois nucléotides, correspondant au nombre d'acides aminés formant la région CDR3. On appelle par « répertoire restreint », un répertoire dans lequel certaines familles V β ne sont pas représentées. A l'inverse, un « répertoire non restreint » est composé de la totalité des gènes V β . Lorsque toutes les tailles du CDR3 sont représentées pour un gène V β donnée, on observe un profil gaussien (loi normale), caractéristique d'une réponse polyclonale. A l'inverse si certaines longueurs CDR3 sont préférentielles, le profil perd son caractère gaussien et l'expansion est dite monoclonale ou oligoclonale. Si cette expansion est retrouvée dans plusieurs échantillons, l'expansion est dite publique, alors que les variations du répertoire qui ne se trouvent que dans un échantillon constitue la réponse privée.

L'analyse logicielle permet d'obtenir une meilleure visualisation des altérations du profil des longueurs CDR3 et surtout permet de regrouper l'ensemble des gènes V β d'un échantillon sur la même figure. Ce programme compare la distribution des longueurs CDR3 dans un échantillon

donné à celle obtenue dans un cas de référence (profil gaussien, non altéré). Dans le cas de l'analyse de l'infiltration striatale, il n'existe pas de référence gaussienne dû à l'absence de lymphocyte dans le cerveau normal. La référence utilisée a été une moyenne effectuée sur des échantillons de sang de la même souche de rat normaux. Chaque longueur CDR3 analysée par le logiciel Immunoscope est traduite en probabilité de distribution, en prenant en compte l'aire sous la courbe de chaque pic. Pour chacune d'entre elles, la différence de valeur absolue entre l'échantillon et le profil de référence permet d'obtenir le pourcentage d'altération de l'échantillon par rapport à un profil gaussien (Fig. 18).

7. Combinaison des analyses qualitatives et quantitatives : le TcLandscape®

La quantification de l'expression des transcrits $V\beta$ est réalisée par PCR quantitative basée sur l'utilisation de la technologie TaqMan® (décrite plus haut). C'est le logiciel Matlab® qui permet de traiter les données qui sont retransmises en images suffisamment claires et informatives. Ainsi, les valeurs des pourcentages d'altération de la longueur des CDR3 combinées aux données issues de la PCR nous permettent d'obtenir une représentation dans laquelle la hauteur des pics illustre la quantité de transcrits correspondants, alors que les pourcentages d'altérations sont figurés par un code couleur (population 1, Fig.19). L'information quantitative permet d'évaluer la représentativité d'une expansion oligoclonale dans une population donnée et visualise des modifications quantitatives du répertoire qui ne sont pas associées à des altérations de la distribution gaussienne de la région CDR3 (Guillet et al., 2001). Par exemple, un profil Immunoscope n'est pas suffisant pour observer des cellules T activées par un superantigène amené par la voie d'alloréconnaissance directe (Sebille et al., 2001), puisque celui-ci mobilise toutes les tailles de CDR3 d'un gène $V\beta$ (population 2, Fig. 19). A l'inverse, certains gènes $V\beta$ ne sont que faiblement représentés au niveau quantitatif et pourraient de ce fait, ne pas avoir un rôle prépondérant dans la réponse immune (population 3, Fig.19).

Résultats

- **Partie 1 :**

Résultats personnels non publiés et extraits de : « **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 JP and Brachet P. *Xenotransplantation* 8, 136-48, **2001**.

- **Partie 2 :**

Extraits de : « **Temporal Analysis of Cytokine Gene Expression During Infiltration of Porcine Neuronal Grafts Implanted Into the Rat Brain** »

Benoît Melchior, Séverine Rémy, Véronique Nerrière-Daguin, Jean-Marie Heslan, Jean-Paul Soullillou, and Philippe Brachet. *Journal of Neuroscience Research* 68 :284-292, **2002**.

- **Partie 3 :**

Analyse du repertoire des lymphocytes T infiltrants et périphériques au cours du rejet de xéno greffes neuronales.

Melchior B., Nérière-Daguin V., Brouard S., Degauque N., Guillet M., Soullillou J-P. and Brachet P. Manuscrit en préparation.

- **Addendum :**

« **Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependant neuroprotection** ».

Benoît Melchior*, Nérière-Daguin V.*, David-A. Laplaud, Séverine Rémy, Sandrine Wiertelowski, Isabelle Neveu, Philippe Naveilhan, Susan O. Meakin and Philippe Brachet. *Experimental Neurology*, sous presse. (* co-auteurs).

Partie 1

Description immunohistochimique et cinétique d'infiltration dans deux cas de xénotransplantation de cellules porcines implantées dans le striatum du rat

1.1 Xéno greffes d'endothélium aortique porcine dans le striatum du rat

Quatre cent mille cellules endothéliales issues d'aorte de porcelets (PAEC), âgés d'une trentaine de jours, ont été implantées dans le striatum du rat Lewis.1A comme il a été décrit dans la section « Matériels et Méthodes ».

- Une heure après leur transplantation dans le striatum du rat Lewis 1A, les PAEC forment une mosaïque de cellules avec un large noyau, mis en évidence par une coloration au crésyl-violet (Fig. 20A). Ces cellules sont très intensément marquées par l'anticorps anti- $\beta 1$ intégrine spécifique de l'endothélium porcine. Il n'y a pas, ou très peu, de cellules leucocytaires infiltrantes.
- Après un jour, le marquage des coupes au crésyl-violet révèle de nombreuses cellules avec un noyau condensé, qui ont perdu leur forme régulière (Fig. 20B), mais dont le marquage $\beta 1$ intégrine reste intense (Fig. 20C). En plus d'un marquage de l'ADN fragmenté révélant la présence de nombreuses cellules en apoptose (non montré), la greffe apparaît infiltrée par de nombreuses cellules OX42⁺ (Fig. 20D). A l'inverse, les cellules ED1⁺ sont localisées en périphérie de la greffe. L'immunoréactivité iNOS est très intense dans certaines régions du transplant, autant qu'en périphérie. Il est intéressant de noter qu'il n'y a que quelques cellules OX8⁺ dans le parenchyme, et aucune dans le voisinage de la greffe, ainsi qu'aucun marquage R7.3 lymphocytaire (non montré).
- La situation après 3 jours évolue peu. Le greffon fortement infiltré par des cellules OX-42⁺, le devient par des macrophages révélés par l'antigène ED1.
- Après 7 jours, le greffon révélé par le marquage $\beta 1$ -intégrine est restreint à certaines parties du site d'implantation (Fig. 20E). La réaction gliale est intense (marquage GFAP, Fig. 20F). Après 11

jours, le marquage β 1-intégrine devient rare et le site d'implantation est caractérisé par un marquage macrophagique fort et diffus (principalement ED-1, Fig. 20G) ainsi qu'un marquage OX8 (Fig. 20H). Tout marquage porcine a généralement disparu après 15 jours et la cicatrice contient alors quelques lymphocytes R7.3 positifs, et des cellules NK. De tels profils d'infiltration sont parfois plus retardés dans le temps, puisque la présence de cellules exprimant la β 1-intégrine a été parfois retrouvée jusqu'à 21 jours après l'implantation.

1.2 Xénogreffes neuronales porcines implantées dans le striatum du rat

Quatre cent mille cellules issues de mésencéphales ventraux de fœtus porcins âgés de 28 jours ont été implantées dans le striatum de rat Lewis.1A dans des conditions comparables à celles des PAEC décrites ci-dessus.

- Une heure après leur implantation, le marquage au crésyl-violet révèle une greffe homogène dans, et autour de laquelle, il n'y a pas (ou très occasionnellement) de cellules appartenant à la lignée macrophagique ou lymphocytaire (marquage OX42 et R7.3 absent). Quelques cellules apoptotiques peuvent se retrouver éparpillées dans le transplant.
- Au bout d'un jour, le marquage au crésyl-violet met en évidence l'hétérogénéité du transplant (Fig. 21A), une situation réminiscente aux greffes de cellules endothéliales. Les cellules apoptotiques restent éparpillées dans la greffe, et le marquage OX42 laisse apparaître une infiltration par endroits (Fig. 21B). Comme dans le cas des greffes d'endothélium, il y a quelques cellules OX8⁺ dans le parenchyme, alors qu'aucune immunoréactivité contre le récepteur lymphocytaire, ni le récepteur des cellules NK n'est détecté.
- Après trois jours, le marquage ED1 et OX42 devient principalement restreint à la périphérie de la greffe (Fig. 21C), contrairement à la situation pour les PAEC. Les cellules apoptotiques sont rares. Le marquage des noyaux de neurones porcins du greffon avec l'anticorps NeuN devient abondant et quelques neurites sont révélées par l'anticorps anti-NF-70, marquant les neurofilaments porcins.
- Dans les 2 semaines qui suivent, le profil d'infiltration est le même. L'immunoréactivité ED1 et OX42 est fortement réduite (Fig. 21D). La greffe est totalement dénuée de marquage R7.3 ou

NFKR-P1. Les noyaux NeuN⁺ sont abondants (Fig. 21E), et la greffe contient un vaste réseau de neurites marquées par l'anti-NF-70 porcin (Fig. 21F).

- Un changement apparemment brutal vient rompre l'apparente ignorance du greffon dans la troisième semaine post-transplantation. Le marquage au crésyl-violet révèle un élargissement du site inflammatoire, avec des cellules contenant des noyaux de tailles et de formes très différentes (Fig. 21G). Les structures vasculaires sont fortement élargies et chargées de paquets denses de cellules. Le site d'implantation est très fortement infiltré par des cellules ED-1⁺ (Fig. 21H), alors que le marquage OX42 est plus diffus. Il y a surtout une forte infiltration de cellules R7.3⁺ (Fig. 21I) ainsi que des cellules OX8⁺. Cependant les marquages NF-70 et NeuN restent encore fréquents. Ainsi, en dépit d'un fort infiltrat, des neurones greffés sont encore présents à ce moment. Le processus de rejet apparaît effectif au cours de la 4^{ème} ou 5^{ème} semaine. A ce temps, tout marqueur porcin a disparu et il demeure une cicatrice de cellules gliales et macrophagiques.

1.3 Les PAEC expriment de fortes quantités d'IL-8 au moment de leur implantation

Une première étape dans l'analyse moléculaire du rejet de xéno-greffes a consisté à suivre la survie du greffon par l'analyse par RT-PCR de l'expression des transcrits d'ARNm de gènes spécifiquement porcins. De nombreux gènes de ménage ont été examinés du fait de leur niveau de transcription élevé et constant dans les cellules, mais des similitudes trop élevées de séquences ne nous ont pas permis de définir des amorces spécifiques dans les gènes de l'HPRT, de la β -actine ou de la GAPDH. En revanche, des amorces spécifiques ont été trouvées dans le gène de la Cytochrome C Oxydase II porcine (COIIp), un marqueur de l'ADN mitochondrial. La difficulté était de trouver des amorces répondant aux critères de longueurs et de température de fusion, nécessaires à leur utilisation en PCR quantitative en temps réel. Les résultats de la figure 22 sont exprimés sous forme d'un rapport du nombre de transcrits de la COIIp au nombre de transcrits d'HPRT, mis en évidence avec des amorces de rat compatibles avec le porc. Nous observons une diminution du nombre de transcrits de COIIp au cours du temps dans les cerveaux greffés avec des PAEC, jusqu'à disparition après 7 jours. Ces résultats sont corrélés avec la disparition du greffon observée en immunohistochimie, cependant cette technique de traçage a été

abandonnée car elle ne donnait pas de résultats cohérents dans le cas des greffes de MV fœtal porcin.

De la même façon, il a été difficile d'identifier des amorces spécifiquement porcines de gènes régulés lors de l'activation cellulaire. Cependant, nous avons réussi à isoler des séquences oligonucléotidiques spécifiques pour l'IL-8 porcine. Les résultats, exprimés en ratio sur le nombre de transcrits d'HPRT, montrent que les PAEC sécrètent de fortes quantités d'IL-8 dès la première heure qui suit leur implantation et durant les 24 heures suivantes (Fig. 23). L'expression de l'IL-8 s'éteint ensuite, un fait qui reflète peut-être une baisse d'activité métabolique et la disparition progressive des cellules. Cette expression n'a pas été retrouvée dans les rats ayant simplement subi l'opération chirurgicale, ni dans le cas des xénogreffes de neurones porcins.

Une investigation plus poussée a montré que c'était le passage des PAEC à la trypsine et les deux à trois heures d'attente sur glace avant greffe, plutôt que le fait pour les PAEC d'être implantées dans le SNC du rat, qui induisaient cette expression. Une expression comparable a été induite dans des PAEC en culture après traitement de 4 à 24 heures avec une dose de TNF α humain de 100 Unités/ml (Données non présentées).

1.4 Discussion 1

- **Le rejet d'endothélium porcin est rapide et implique le recrutement de macrophages**

Les réponses cellulaires induites dans le cerveau du rat après la transplantation de cellules endothéliales aortiques et des neurones fœtaux porcins diffèrent fortement. Le rejet des premières est notable dès le troisième jour et s'achève généralement dans les 7 à 11 jours post-transplantation, comme le démontre la disparition de cellules exprimant la β 1-intégrine porcine. Cette perte est accompagnée d'un marquage intense de l'ADN fragmenté, un processus qui met en évidence les cellules apoptotiques. Les cellules endothéliales transplantées sont rapidement et intensément infiltrées par des cellules OX42⁺. Les cellules OX8⁺, quant à elles, sont détectées dans les 3 jours qui suivent la transplantation. A ce moment, les cellules lymphocytaires portant le TCR $\alpha\beta$ ne sont qu'exceptionnelles.

Ce profil d'infiltrat suggère que les mécanismes menant au rejet des PAEC sont médiés par des cellules OX42 et ED1⁺, comme par exemple des macrophages ou des polymorphonucléaires alors que le rôle des lymphocytes T ou des NK paraît minimal. La participation majeure des macrophages s'accorde avec les observations de Czech et ses collaborateurs (Czech et al., 1997), qui n'avaient pas pu prévenir le rejet de cellules endothéliales bovines greffées dans le cerveau du rat avec un traitement par la CsA. Une participation similaire des macrophages a été rapportée par Wennberg et ses collaborateurs (1997) après l'implantation de xénogreffes d'îlots pancréatiques sous la capsule rénale. Ils avaient observé que le rejet se faisait en présence d'une large majorité de cellules ED1 et ED2, alors que l'infiltration d'allogreffe mobilisait des cellules TCR $\alpha\beta$ ⁺. Dans cette étude aussi, la CsA n'as pas prévenu le rejet, tandis qu'elle avait un effet protecteur dans le cas d'allogreffes. De même, Brouard et ses collaborateurs (1998) ont observé que les cellules T constituaient une population minoritaire et tardive dans le processus de rejet d'une xénogreffe vascularisée chez laquelle les cellules endothéliales constituent la source de xénoantigènes. Il semble donc que des mécanismes comparables de rejet, basés sur la mobilisation de macrophages, puissent opérer tant dans les tissus périphériques que dans le SNC. Ceci n'exclut pas des spécificités régionales, comme par le fait que nous n'ayons pas retrouvé de mobilisation des cellules ED2⁺ dans le cas des PAEC rejetées dans le cerveau.

Quinze jours après implantation, alors que les PAEC ont disparu, les neurones foetaux ne montrent aucun signe de rejet. Une première explication de cette différence est que l'endothélium, contrairement aux neurones, est caractérisé par une expression constitutive d'antigènes de surface tels que les molécules du CMH de classe I. La forte immunogénicité de l'endothélium est d'autant plus importante que les neurones transplantés sont d'origine foetale alors que les PAEC sont dérivés d'animaux postnataux et ont été amplifiés *in vitro*. De plus, les PAEC ont la possibilité de sécréter plusieurs types de facteurs de croissance macrophagique mais aussi de chimiokines après l'activation par de nombreux stimuli pro-inflammatoires (Cushing et al., 1990 ; Rollins et al., 1990 ; Sica et al., 1990 ; Selvan et al. 1998 ; Krishnaswamy et al., 1999). Les macrophages eux-mêmes peuvent produire des chimiokines capable d'amplifier leur propre recrutement (Cushing et Fogelman, 1992 ; Gourmala et al., 1999 ; Boddeke et al., 1999 ; Janabi et al., 1999). Il semble

donc qu'un dialogue entre PAEC et macrophages contribue à maintenir un contexte pro-inflammatoire marqué. La rapide production d'IL-8 après récolte de ces cellules montre que cet état d'activation peut résulter de la situation non-physiologique des cellules endothéliales périphériques, d'abord cultivées *in vitro*, puis récoltées et transplantées à une forte densité dans le parenchyme cérébral. Cependant, un tel stress n'est sans doute pas suffisant pour induire une réponse apoptotique massive, car l'allogreffe de cellules endothéliales cardiaques de rat n'est pas suivie d'une telle mort (résultats non publiés), en accord avec les résultats de Quinero et ses collaborateurs (1997), qui ont décrit une survie à long terme de greffes intrastriales d'une lignée endothéliale d'origine centrale. Ainsi, la part des macrophages infiltrants paraît déterminante dans le processus de rejet.

Une question reste en suspens dans cette étude : la nature des cellules OX8⁺ infiltrantes qui sont retrouvées tant dans les greffes d'endothélium que de neurones. Ces cellules ont une forme irrégulière et le marquage est souvent diffus. Elles apparaissent très tôt, et sont plus nombreuses que les cellules TCR $\alpha\beta$ ⁺. Il est possible que ces cellules OX8⁺ ne soient pas des lymphocytes CD8⁺ suppresseurs/cytotoxiques, mais plutôt une sous-population de macrophages/microglie, car des phagocytes CD8⁺ ont déjà été décrits lors de l'élimination de pathogènes parasitaires (Hirji et al., 1998).

- **Les xéngreffes de neurones mésencéphaliques fœtaux porcins sont rejetées après 3 à 4 semaines en présence d'un infiltrat mixte.**

Le profil d'infiltration et de rejet de l'endothélium contraste fortement avec le rejet de neurones. Pendant le premier jour, les neurones sont infiltrés principalement par des cellules OX42⁺, et la greffe contient de nombreuses cellules apoptotiques dont le nombre diminue fortement par la suite. Ceci peut s'expliquer par la manipulation du tissu fœtal et par le trauma chirurgical connu pour provoquer la mort de nombreux neurones. Cependant, contrairement aux PAEC, l'infiltration macrophagique décroît par la suite. Après 14 jours, le nombre de cellules ED1 et OX42 infiltrantes est minimal, alors que les lymphocytes TCR $\alpha\beta$ restent exceptionnels. La greffe est riche en noyaux NeuN⁺ et en protéines de neurofilaments porcins, deux critères qui démontrent la bonne maturation et la différenciation des neurones implantés. Cependant à trois semaines, apparaît une

seconde vague d'infiltration leucocytaire. Le volume de la greffe augmente, alors que les vaisseaux sanguins voisins s'élargissent et contiennent une accumulation de cellules de phénotypes macrophagique et lymphocytaire. Le greffon est infiltré par des LT, en plus des macrophages.

Les neurones sont connus pour produire des facteurs chimioattractants et des facteurs de croissance de la lignée macrophagique (Dobbertin et al., 1997 ; Nishiyori et al., 1998 ; Wang et al., 1999). De plus, il a été observé que les allogreffes neuronales sont naturellement colonisées par les cellules microgliales de l'hôte (Pennell et Streit, 1997 ; Rostaing-Rigattieri, 1997). Une telle infiltration « normale » peut prendre place dans le cas de xénogreffes, comme le montre la présence des quelques cellules ED1⁺, même deux semaines après transplantation, quand l'inflammation est minimale. Cependant, bien que les macrophages de l'hôte qui colonisent les allogreffes gardent un phénotype de cellules ramifiées (Pennell et Streit, 1997 ; Rostaing-Rigattieri, 1997), ces cellules paraissent garder un phénotype activé dans le cas des xénogreffes neuronales, car les cellules ED1 présentent une morphologie de cellules rondes, plutôt que ramifiée. Cette observation vient en accord avec les données de Duan et ses collaborateurs (1995) obtenues dans un modèle souris-rat. La libération de xénoantigènes est probablement accrue par le phénomène temporaire de mort neuronale consécutif à l'implantation du greffon. Ces xénoantigènes peuvent peut-être enclencher une réponse immunitaire *in situ*, ou après migration de phagocytes dans les tissus lymphoïdes (Randolph et al., 1999). Il est aussi possible que la mobilisation leucocytaire soit induite par les cellules endothéliales de l'hôte, car elles sont connues pour jouer un rôle majeur dans la maturation des APC (Randolph et al., 1999). Les cellules endothéliales de l'hôte ont la capacité d'envahir la xénogreffe neuronale (Geny et al., 1994) et bien que ce procédé soit lent, il peut être initié en absence d'immunosuppression. Une telle réponse peut être amplifiée par le drainage de ces antigènes vers des structures comme les ganglions cervicaux profonds (Widner et al., 1988). Cependant, les neurones porcins peuvent eux-mêmes contribuer à l'infiltration massive de leucocytes par la sécrétion de chimiokines en réaction à la présence continue de macrophages/cellules microgliales de l'hôte se maintenant dans un état activé.

Partie 2

Cinétique d'expression des gènes de cytokines au cours du rejet de xénogreffes

2.1 Cinétique d'infiltration lymphocytaire.

Deux groupes de rats LEW.1A ont été greffés avec des neurones mésencéphaliques fœtaux porcins ou ont simplement subi la lésion due à l'opération, comme il est décrit dans la section « Matériels et Méthodes ». Les animaux ont été sacrifiés à différents temps, sur une durée de 4 semaines. Les aires striatales englobant le transplant ou les tissus équivalents, incluant le tracé de l'aiguille des rats contrôles, ont été disséquées et récupérées pour l'extraction d'ARN. Les aliquots ont été soumis à une rétrotranscription et analysés par PCR en temps réel pour la présence de transcrits codant pour la région constante C β du TCR. Le nombre de copies de transcrit de C β trouvés à chaque point est ajusté par rapport au nombre de copies d'ARN messagers codant pour le gène de ménage HPRT. Les résultats sont présentés figure 24 et montrent que les transcrits de C β restent très faibles pendant une durée de 24 jours pour tous les animaux analysés jusqu'à ce point. Il apparaît une expression soudaine des transcrits C β au 28^{ème} jour suivant la transplantation, dans les 7 animaux transplantés sur 8 qui ont été analysés. L'ampleur de la déviation standard reflète les variations qui existent entre les différents animaux, car ces variations sont reproductibles d'une rétrotranscription sur l'autre, et elles reflètent probablement les différents

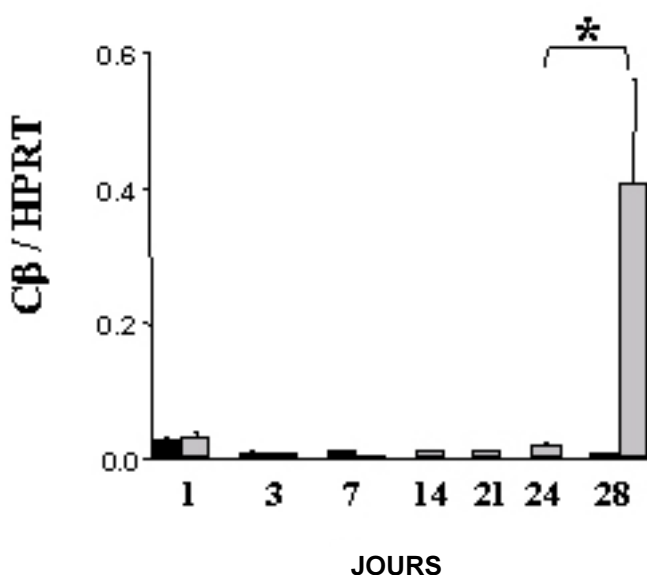


Fig. 24. Cinétique d'expression de la chaîne C β du TCR dans les cerveaux de rats transplantés avec des neurones mésencéphaliques fœtaux porcins (barres grises) ou dans le groupe contrôle (barres noires) Les résultats représentent un ratio du nombre de copies de C β sur le nombre de copies d'HPRT, en fonction du temps. * $p < 0.05$.

degrés d'infiltration de la greffe par les cellules de l'hôte. Le nombre de transcrits de $C\beta$ reste pratiquement indécélable pour tous les points du groupe contrôle. Le marquage au crésyl-violet du cerveau antérieur d'un rat de la même série, sacrifié au cours de la quatrième semaine, confirme que la greffe fait l'objet d'une infiltration massive (Fig. 25A). Le marquage avec les anticorps monoclonaux OX42 et R7.3 montrent que l'infiltrat est constitué de macrophages et de lymphocytes $TCR\alpha\beta^+$ (Fig. 25B et 25C). La présence des lymphocytes est confirmée par le marquage avec l'anticorps OX39, lequel réagit avec CD25, le récepteur de la chaîne α de l'IL-2 (Fig. 25D). A ce moment, il y a une gliose réactionnelle très forte (Fig 25E), mais les neurites exprimants la protéine de 70 kD des neurofilaments porcins restent détectables dans de nombreux endroits du greffon, indiquant que le processus de rejet n'est pas achevé dans cet animal (Fig. 25F).

2.2 Cinétique d'expression des lymphokines.

Les résultats présentés (Fig. 26A) indiquent que les taux de transcrits d'IL-1 α restent très faibles jusqu'à la quatrième semaine. Une accumulation brutale de ces transcrits apparaît dans les cerveaux qui ont été implantés avec les neurones porcins. Le profil d'expression des gènes du TNF α (Fig. 26B) et de l'IL-6 (Fig. 26C) est similaire à celui de l'IL-1 α , avec une hausse très prononcée au 28^{ème} jour, dans les cerveaux exposés aux cellules xénogéniques. Les cinétiques d'expression de l'IL-2 et de l'IFN γ (Fig. 26D et 26E) montrent aussi une soudaine augmentation au 28^{ème} jour.

Cependant, on peut noter que les taux de transcrits d'IL-2 sont presque 10 fois moins abondants que ceux de l'IFN γ . A l'inverse, le niveau d'expression des ARN messagers du TGF β reste relativement constant pendant toute la durée de l'expérience, avec un doublement à jour 28 dans les animaux greffés. Cependant cette tendance n'est pas statistiquement significative (Fig. 26F). Les transcrits de l'IL-4 et de l'IL-10 restent très faibles ou n'ont pas été décelés. Ceux codant pour l'IL-13 sont plus abondants, mais leurs niveaux d'expression ne varient pas de façon significative pendant la durée de l'expérience (Fig. 26G). Les ARN de la sous-unité p40 de l'IL-12 sont aussi

constants, malgré une tendance à l'augmentation au dernier point, et dans le groupe des transplants neuronaux (Jour 28, Fig. 26H).

2.3 Expression des chimiokines MCP-1 et RANTES.

Les transcrits de MCP-1 sont connus pour s'accumuler rapidement après une lésion cérébrale. Un tel pic a été observé tant dans le groupe contrôle que pour les animaux transplantés, au premier jour suivant l'opération (Fig. 27B). Les transcrits de RANTES ne sont, quant à eux, pratiquement pas détectables à ce moment (Fig. 27A). Une augmentation importante apparaît au 28^{ème} jour, tant pour MCP-1 que pour RANTES, en réponse à la xénogreffe.

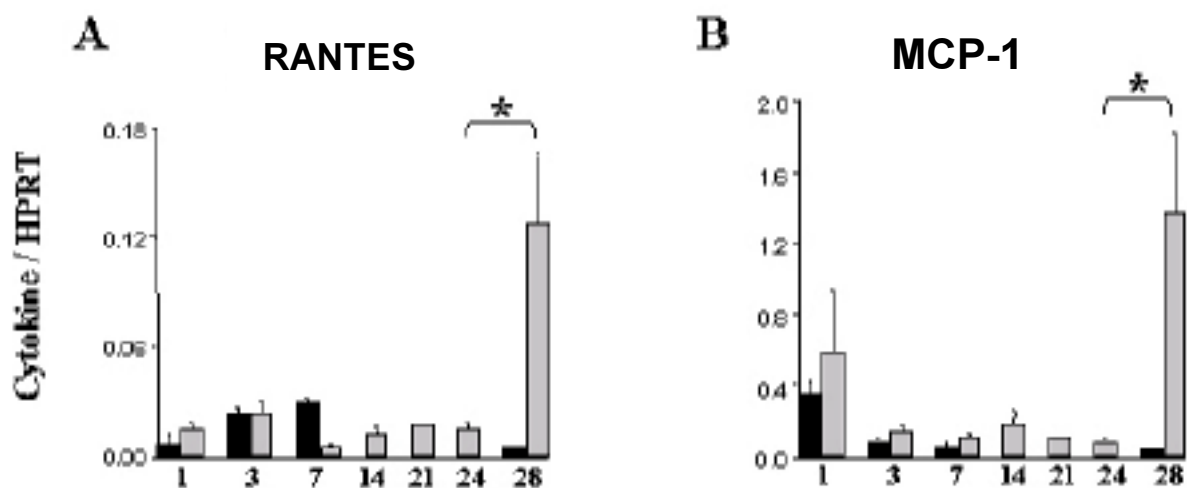


Fig. 27. Cinétique d'expression des transcrits des gènes des chimiokines RANTES et MCP-1 dans les cerveaux transplantés avec des neurones fœtaux porcins (barres grises) ou seulement lésés (barres noires). Les résultats sont représentés par un ratio du nombre de copies de transcrits de chaque chimiokine sur le nombre de copies d'HPRT, en fonction du temps (jours). * $p < 0.05$

2.4 Discussion

L'évaluation temporelle de l'infiltration lymphocytaire par la mesure des transcrits codant pour la portion constante de la chaîne β du TCR, montre que les cellules $\text{TCR}\alpha\beta^+$ s'accumulent soudainement, dans le cerveau des rats greffés, à la fin de la quatrième semaine qui suit leur implantation (n=7) par comparaison avec la situation trouvée au 24^{ème} jour (n=3). Ceci supporte le concept que nous avons précédemment établi : l'infiltration de xéno greffes neuronales intrastriales est un phénomène tardif mais soudain (*Cf Résultats 1*). Le recrutement des LT est étroitement corrélé avec la forte augmentation des transcrits de MCP-1 et de RANTES, lesquels apparaissent au même moment. Il a été rapporté que ces chimiokines pouvaient être synthétisées par les leucocytes infiltrants le SNC, mais aussi par les astrocytes activés *in vitro* et *in vivo*, dans les modèles d'EAE ou lors des lésions de SEP (Glabinski et al., 1997 ; Kennedy et al., 1998 ; Oh et al., 1999 ; Baranzini et al., 2000 ; Boven et al., 2000 ; Hua et Lee, 2000 ; Juedes et al. 2000). Ces chimiokines sont aussi produites par les cellules endothéliales activées (Marfaing-Koka et al., 1995 ; Ebnet et al., 1996). MCP-1 exerce un chimiotactisme sur les macrophages mais induit aussi la transmigration des cellules T CD4^+ , avec une préférence pour les cellules de type Th1 (Siveke et Hamann, 1998). RANTES est typiquement actif sur les cellules T effectrices incluant les Th1, mais pas les Th2 (Kawai et al., 1999). Ainsi, le trafic et l'adressage, tant des macrophages que des lymphocytes dans le parenchyme cérébral semblent être activement soutenus par une production *in situ* concomitante de chimiokines, dont l'origine cellulaire exacte reste à déterminer.

Par delà son expression significative au 28^{ème} jour suivant la transplantation, une plus faible et temporaire accumulation des transcrits de MCP-1 est observée dans les 24 heures suivant l'intervention chirurgicale. Cette réponse précoce a déjà été rapportée dans d'autres modèles de lésions cérébrales (Glabinski et al., 1996 ; McTigue et al., 1998) et contribue probablement à l'infiltration précoce des macrophages dans les aires de trauma, un phénomène que nous avons décrit comme décroissant après plusieurs semaines (*Cf. Résultats 1*). A l'inverse, l'expression précoce de RANTES n'est pas significative dans les temps précoces.

Parmi les lymphokines pro-inflammatoires, une accumulation brutale des transcrits d'IL-1 α , de TNF α et d'IL-6 apparaît au 28^{ème} jour après transplantation. Ainsi, le profil d'expression de ces

lymphokines est très similaire à celui de MCP-1 et RANTES, et leur soudaine augmentation accompagne l'infiltration massive de la greffe.

L'accumulation des ARNm de l'IFN γ et de l'IL-2 de façon concomitante avec ceux de RANTES, suggère que la greffe est infiltrée de lymphocytes T CD4⁺ appartenant au sous-type Th1. A l'inverse les transcrits d'IL-4 n'ont pas été décelés, en accord avec les données obtenues au cours du rejet de xénogreffes cardiaques dans le rat Lewis1A (Brouard et al., 1998). En outre, la pauvreté des transcrits de lymphokines de type Th2, tel que l'IL-10 et l'IL-13, supporte le concept que le rejet de xénogreffes discordantes de neurones dans le cerveau du rat Lewis 1A est mené par des cellules à polarité Th1. Il est important de noter que la présence de transcrits de cytokines Th1 (IFN γ et d'IL-2) a également été rapportée lors de rejet de xénogreffes concordantes de neurones, dans des systèmes souris sur rat ou rat sur souris (Kogure et al., 1998 ; Vine et al., 1999).

Les transcrits d'IL-12 codant pour la sous-unité p40 restent relativement rares, même s'ils ont tendance à s'accumuler au 28^{ème} jour. Cette interleukine hétérodimérique a une origine microgliale/macrophagique, et permet la différenciation des cellules Th0 en Th1 (Cf. 1.3.2.3 Les cytokines et la polarisation Th1/Th2), même s'il semble que cette orientation n'est pas strictement dépendante de cette interleukine (Noble et al., 2001). Le rôle de l'IL-12 paraît ainsi moins marqué pendant l'infiltration des xénogreffes neuronales dans le rat Lewis 1A que lors d'une induction d'EAE dans le rat Lewis (Issazadeh et al., 1995). Cette différence peut être due à l'action inhibitrice des astrocytes activés (Aloisi et al. 1997 ; Xiao et Link, 1999) révélés par la forte immunoréactivité GFAP qui accompagnait le rejet des neurones. Le TGF β 1 que les astrocytes activés sont susceptibles de produire, est l'un des effecteurs capable de provoquer une désactivation des APC résidentes et infiltrantes (Hailer et al., 1998). Inversement, les astrocytes peuvent aussi contribuer à la baisse de fonctionnalité des cellules T (Xiao et al., 1998). On peut aussi imaginer la présence dans le pool de lymphocytes infiltrants, de LT régulateurs connus pour sécréter du TGF β et inhiber l'activité des cellules cytotoxiques (pour revue : Wood et Sakaguchi, 2003). Néanmoins, nos données indiquent que de tels signaux inhibiteurs sont outrepassés quand l'infiltration de la xénogreffe prend soudainement place. Cette infiltration mobilise tant les macrophages que les

lymphocytes dans un environnement pro-inflammatoire. Ainsi, des stimuli tels que l'IFN γ sont en faveur d'une restimulation des LT déjà primés par les APC résidentes et/ou infiltrantes, alors que la prolifération des LT est soutenue par la production locale d'IL-2. Après quoi, les mécanismes de cytotoxicités médiés par les LT et/ou la réponse d'hypersensibilité retardée provoqués par les LT en association avec les macrophages/microglie contribuent aux processus de mort des neurones greffés (Korsgren, 1997).

On peut supposer que la présentation aux LT et le développement de la réponse Th1 sont initiés en dehors du système nerveux central, comme par exemple dans les organes lymphoïdes secondaires par lesquels transite le fluide intra-parenchymateux. Les antigènes peuvent être relargués des neurones mourant après leur implantation (Nikkah et al., 1994 ; Zawada et al., 1998 ; Emgard et al., 1999), et leur présentation peut alors s'effectuer après drainage vers les ganglions cervicaux profonds (Widner et al., 1988) par un mécanisme de reconnaissance indirecte *via* les APC de l'hôte. Cependant, nous ne pouvons exclure que les xénogreffes de neurones mésencéphaliques fœtaux puissent contenir des cellules très immunogènes telles que des cellules microgliales et/ou des cellules endothéliales porcines (Geny et al., 1994, 1995 ; Brevig et al., 1999, 2001). Celles-ci pourraient agir à travers un mécanisme de reconnaissance direct menant à une infiltration du greffon. Ceci pourrait expliquer le début de la réaction immune. Il reste toutefois à éclaircir pourquoi cette infiltration ne se produit que 4 semaines après implantation des neurones.

Partie 3

Analyse du répertoire des lymphocytes T infiltrants et périphériques au cours du rejet de xénogreffes neuronales.

La caractérisation de la réponse immune s'effectue par l'étude du répertoire lymphocytaire T, et plus précisément par une analyse des niveaux d'expression des différents réarrangements de la région V de la chaîne β du TCR. Ceci pourrait permettre de repérer l'émergence de populations lymphocytaires particulières, probablement impliquées dans le processus de rejet. En effet, la stimulation antigénique par les APC provoque une sélection positive des LT qui peut-être décelée par le profil d'altération de la structure moléculaire de la région CDR3 du TCR. Ces altérations sont décelables en examinant la longueur de la région CDR3 dans les différents transcrits incluant chacun des allèles $V\beta$ du TCR (logiciel Immunsocope®, Pannetier et al., 1995 ; Gorochov et al., 1998) comme décrit dans la section « Matériels et Méthodes ». L'étude quantitative par TaqMan® apporte une information sur l'importance relative d'une population T sélectivement activée. La combinaison de ces 2 études constitue le TcLandscape®, récemment breveté au laboratoire (Guillet et al., 2001).

3.1 Choix des échantillons :

Deux séries de rats LEW.1A (A et B) ont été transplantées de manière bilatérale, avec 400.000 neurones foetaux par coté, issus, pour chacune des séries, d'un pool d'embryons issus de deux truies. Le processus de rejet étant relativement variable dans le temps, et sachant qu'aucun test comportemental n'est disponible pour évaluer la survie du transplant, des sacrifices ont été réalisés 21, 28 et 35 jours après transplantations. L'hémisphère droit est récupéré pour la révélation immunohistochimique afin d'évaluer l'état de rejet de la xénogreffe neuronale selon des critères préalablement établis : importante présence de macrophages, formation de structures apparentées à une néovascularisation et surtout apparition d'un infiltrat lymphocytaire massif dans

et autour du greffon (Cf. résultats 1 et 2). Les ARN des striata de l'hémisphère gauche des rats répondant à ces critères sont rétrotranscrits et l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel permet d'évaluer le nombre de transcrits incluant la segment constant β du TCR ($C\beta$) dans chacun des échantillons. Les greffes en cours de rejet sont moléculairement définies par la présence d'un taux élevé de transcrits $C\beta$ (ratio de transcrits $C\beta/HPRT > 0.1$; Cf. résultats 2). Dans la majorité des cas, l'analyse immunohistochimique a montré qu'un fort infiltrat de cellules $R7.3^+$ était présent dans l'autre hémisphère, correspondant du reste, à un ratio de transcrits $C\beta / HPRT < 0.1$. Dans le cas contraire, les échantillons ont été écartés. Huit rats ont été inclus dans l'analyse.

3.2 Etudes qualitatives et quantitatives des variations du segment β du TCR dans la greffe

La figure 28 (série A et B) représente la distribution des longueurs des régions du CDR3 des 8 rats sélectionnés pour leur forte accumulation de transcrits de $C\beta$ au niveau du greffon. Pratiquement tous les transcrits incluant chacun des gènes $V\beta$ ont été retrouvés en quantité variable, dans les striata infiltrés. Les lymphocytes infiltrant ces striata possèdent des teneurs élevées de transcrits mobilisant notamment les gènes $V\beta4$ et $V\beta8.2$. Néanmoins, la distribution des longueurs des régions du CDR3 de ces transcrits reste gaussienne (la couleur verte signal une telle répartition). Toutefois, la hauteur atteinte sur l'axe Y témoigne de l'abondance des transcrits de ces familles en termes quantitatifs.

Pourtant, l'analyse des altérations des longueurs du segment CDR3 des LT infiltrant le greffon montre que les profils gaussiens de nombreuses familles $V\beta$ sont altérés (couleur rouge). Ces altérations se retrouvent dans tous les striata infiltrés. Certaines familles $V\beta$ présentent jusqu'à 55% d'altérations par rapport à la moyenne des altérations obtenues dans un groupe contrôle qui constitue notre référence gaussienne (moyenne des altérations sur des cellules T purifiées à partir des ganglions et de rates de rats naïfs). Cependant, nous n'avons pas observé d'accumulation significative d'une famille particulière qui soit toujours altérée (pas systématiquement les mêmes pics rouges). La comparaison des profils immunoscope® obtenus avec chaque animal, n'a pas révélé la sélection d'une population particulière, à une exception près (voir plus bas). C'est à dire que, d'une façon générale, les familles $V\beta$ altérées ne sont pas toujours les mêmes, et lorsque

c'est le cas, les longueurs de CDR3 sélectionnées diffèrent d'un animal à l'autre. Cette absence de similitude tant dans la sélection d'un allèle V β que dans la longueur de la région CDR3 sélectionnée se retrouve au sein d'une même série d'animaux transplantés, ayant reçu la même combinaison de cellules du donneur. La synthèse des altérations et leur amplitude, rapportée dans la figure 29, montre qu'une grande majorité des familles V β présente des taux d'altérations supérieurs à 15% (cases grises). Les altérations de toutes les familles V β présentes pour chacun des échantillons de striatum infiltré varient entre 17.39% et 20.71% ($19\% \pm 1.08$). Seule, la famille V β 20 paraît systématiquement altérée dans tous les striata, quelque soit la série : $35,48\% \pm 8.11$ (n=8). Après analyse des différentes longueurs de CDR3, le fort pourcentage d'altération de la famille V β 20 paraît provenir, en partie, de la sélection d'une longueur particulière du CDR3 : la longueur de 101 aa (Fig. 30, flèches). Cette longueur de CDR3 est significativement plus représentée dans les striata infiltrés que dans les échantillons de référence ($p < 0.0005$, n=9). L'altération de cette longueur est retrouvée dans les 2 séries, et il n'est donc pas spécifique du donneur. Elle a aussi été retrouvée dans une troisième série d'animaux greffés avec d'autres donneurs porcins, ainsi que lors d'expériences d'immunisation du receveur avec des extraits de mésencéphales ventraux porcins (Données non montrées). Cette population de LT exprimant ce V β 20 n'est pas retrouvée dans la rate ou le sang de ces mêmes animaux (Fig. 30 : Rat #774 rate, et Fig. 31).

3.3 Etude du répertoire en périphérie :

Un analyse comparative des altérations des longueurs de la région CDR3 a été réalisée sur les DCLN, la rate et les lymphocytes du sang (PBL) des 5 animaux rejetants de la série B (Fig. 31). A quelques très rares exceptions (essentiellement la famille V β 1 apparemment absente), toutes les familles V β ont pu être détectées dans les DCLN, la rate et le sang des animaux transplantés. Le profil des altérations des longueurs de la région CDR3 dans les DCLN est plus modéré que dans les striata et les moyennes des altérations pour toutes les familles varient selon les rats : 2 rats ont des DCLN avec des profils altérés supérieurs à 15%. Le pourcentage moyen d'altération des longueurs de CDR3 pour l'ensemble des familles est inférieur à celui observé dans les striata

(13.80 % \pm 0.50 contre 19.31 % \pm 1.91). Toutefois, il apparaît que s'il y a moins de familles concernées, les altérations des longueurs des CDR3 sont dans certains cas très fortes (73% pour la famille V β 11 des DCLN du rat #768). A l'inverse, les longueurs de CDR3 des LT des DCLN du rat #769, dont les LT du striatum présentent de nombreuses altérations, ne sont que faiblement altérées. De façon plus générale, le profil d'altération des DCLN ne se superpose pas à celui du striatum d'un même rat. La même analyse des variations des longueurs des régions du CDR3 dans la rate et le sang n'a pas montré d'altérations significatives. L'ensemble des familles V β de tous les rats présente des profils gaussiens, ou très proches. La figure 32 représente les moyennes des altérations des longueurs des régions du CDR3 du TCR selon leur localisation tissulaire. Les moyennes d'altérations des longueurs des régions du CDR3 de toutes les familles V β exprimées par les lymphocytes infiltrants le striatum, sont significativement plus élevées que les altérations trouvées dans les lymphocytes hébergés dans la rate ou présent dans le sang périphérique. Les altérations trouvées dans les LT hébergés dans les DCLN sont elles aussi statistiquement plus marquées, même si les profils moléculaires diffèrent de ceux trouvés dans les lymphocytes striataux.

3.4 Discussion 3

Cas de la sélection de la longueur de 101 aa du CDR3 du V β 20 :

L'altération systématique de la longueur de 101 aa du gène du V β 20 dans les striata fera l'objet d'une analyse plus poussée par PCR, pour déterminer si elle mobilise un même allèle J β (le rat en compte 12 différents). L'usage d'un allèle J β identique chez les 8 animaux serait alors très suggestif d'une sélection monoclonale.

Variabilité du répertoire des lymphocytes T infiltrants :

Nous avons démontré que le répertoire de la région variable de la chaîne β du TCR lymphocytaires infiltrant une xénogreffe neuronale est large. Il mobilise l'ensemble des familles V β , dont les longueurs des régions CDR3 peuvent être très fortement altérées. Par rapport au profil gaussien trouvé dans le répertoire périphérique de rats naïfs, la variabilité de la distribution des

longueurs de la région CDR3 est significativement perturbée dans les striata de tous les rats impliqués dans le processus de rejet. Pourtant, le profil de ces perturbations est propre à chaque rat, même s'ils reçoivent la même combinaison de cellules du donneur. Seul un allèle mobilisant le gène V β 20, et codant pour une séquence de 101 aa, paraît mobilisé de façon systématique.

Cette variabilité confirme l'hypothèse de Duan et coll. (2001), qui ont suggéré, qu'outre les peptides issus des antigènes du CMH du donneur, d'autres xénoantigènes du donneur peuvent être reconnus par les lymphocytes de l'hôte. On peut ajouter que la mort cellulaire qui accompagne la manipulation des neuroblastes et leur implantation est également susceptible de libérer dans le cerveau de l'hôte de nombreux xénoantigènes intracellulaires. L'absence de populations quantitativement sur-représentées pourrait aussi provenir du fait que les LT spécifiques qui reconnaissent leur cible dans le SNC diminuent fortement le niveau d'expression de leur TCR (Lanzavecchia et al., 1999). Ainsi, l'infiltrat observé est peut être le reflet d'une seconde vague d'infiltration qui masque l'événement primaire.

L'augmentation de plusieurs familles de transcrits incluant certains gènes V β se fait de façon gaussienne (Exemple : V β 4 rat #329 ou V β 8.2 rat #769 Fig. 28). L'interprétation de ce phénomène pose plusieurs questions. La première est d'ordre technique. Le rejet s'accompagne d'une néovascularisation ou d'un fort remodelage de la vasculature du cerveau de l'hôte (et peut être du tissu donneur) et par conséquent, l'amplification de certaines familles peut correspondre à des LT s'accumulant en abondance dans les capillaires cérébraux plutôt que dans le parenchyme. Seule une PCR effectuée sur une cellule T isolée et localisée au sein du greffon pourrait répondre à cette question. Une telle technique a été récemment appliquée aux LT présents dans les lésions de SEP (Babbe et al., 2000). Cependant l'accumulation gaussienne de toutes les longueurs d'une famille V β peut être à l'origine de phénomènes d'ordre immunologique : l'existence dans la xénogreffe de superantigènes, dont la présentation ne nécessite pas la spécificité du CDR3, mais aussi la possible présentation directe qui ne semble pas aboutir à une altération de la région CDR3 (Sebille et al., 2001).

Par ailleurs, la présence parmi les LT infiltrants d'un répertoire varié, représenté par des familles dont les longueurs de CDR3 sont gaussiennes ou altérées, suggère un phénomène de

recrutement massif de lymphocytes tant spécifiques qu'aspécifiques. En effet, de nombreuses études évoquent le principe de recrutement de LT « by-stander » dans le SNC (effet de voisinage). Les lymphocytes spécifiques pour un antigène, comme les cellules T activées mais non réactives vis à vis de composants du SNC, peuvent pénétrer dans le parenchyme (Hickey et al, 1991 ; Cross et al., 1991 ; Lannes-Viera et al., 1995 ; Steinman, 1996). Des données récentes dans les modèles d'EAE indiquent que les LT activés, mais non spécifiques, peuvent franchir la BHE en large nombre (Bauer et al., 1998 ; Krakowski et Owens, 2000 ; Brabb et al., 2000). Ainsi, en accord avec ces données, le recrutement sur le site inflammatoire de populations de LT utilisant certains gènes V β , peut refléter des événements qui ne sont pas directement liés au processus de reconnaissance des xénoantigènes. Toutefois, ils contribuent de façon aspécifique au rejet en participant au processus de DTH (Lehmann et al., 1998). On notera pourtant que de telles cellules pourraient ne conserver qu'un phénotype immature, car elles n'exprimeraient pas de transcrits spécifiant les cytokines inflammatoires (Krakowski et Owens, 2000). Nous savons que les cellules T peuvent pénétrer dans le parenchyme, grâce à la simple présence de molécules d'adhésion nouvellement formées et la production locale de chimiokines (Owens et al., 1994 ; Flugel et al., 2001), un environnement pro-inflammatoire qui est présent lors du rejet de xéno greffes neuronales (Cf. *Résultats 2*). Ainsi, l'entrée des cellules T « by-stander » serait facilitée par la pénétration préalable des cellules T spécifiques de l'inflammation (Skundric et al., 1994).

Si la présence de nombreuses altérations au sein des différentes familles V β reflète la multiplicité des antigènes, elle n'exclut pas non plus un phénomène « d'épitope spreading » déjà décrit au cours de la progression d'EAE ou d'encéphalite virale (Lehmann et al., 1992 ; Barten et al., 1995 ; McRae et al., 1995 ; Miller et al., 1995 ; Lin et al., 1998). Ce phénomène correspond à une accumulation de mutations notamment dans les gènes V β des lymphocytes infiltrants. De telles mutations modifient le spectre de reconnaissance du TCR et peuvent favoriser l'expansion de certains lymphocytes. Cette évolution du répertoire soulève le problème de la présentation locale des antigènes dans le SNC. Il se pourrait, en effet, que dans un contexte pro-inflammatoire, des cellules, issues par exemple de la microglie, puissent se comporter comme des APC, et provoquer

l'expansion de populations éventuellement différentes par leur spécificité de celles qui infiltrent le greffon.

Un lien loco-régional avec le système immun périphérique

Si la voie de présentation directe a été évoquée dans le processus de rejet de xénogreffes neuronales, elle n'est probablement pas la plus importante du rejet (Duan et al., 2001, 2002). En effet, contrairement aux alloantigènes, le processus de reconnaissance des xénoantigènes s'effectue principalement par la voie indirecte. Ceci serait dû à la faible fréquence de cellules T du receveur qui peuvent répondre à une présentation antigéniques dans le contexte de CMH xénogéniques. De nombreuses études évoquent le drainage des antigènes depuis le SNC vers les organes lymphoïdes secondaires (Bradbury et al., 1981 ; Yamada et al., 1991 ; Cserr et Knopf, 1992 ; Kida et al., 1995). Il n'est pas clair pour l'instant si l'antigène est drainé à l'état soluble, ou traité par des APC, par exemple résidentes dans les tissus avoisinant le parenchyme (pour revue : Aloisi et al., 2000 ; Pashenkov et al., 2003). Cependant, il semble que selon le site d'implantation des antigènes dans le SNC, certains sites lymphoïdes soient privilégiés. Ainsi, l'administration d'antigènes dans le LCR ou la xénotransplantation intraventriculaire, impliquent la rate et les ganglions du cou (Hochwald et al., 1988 ; Widner et al., 1988), alors que l'injection dans le parenchyme cérébral privilégie les ganglions lymphatiques cervicaux profonds (Bradbury et al., 1981 ; Harling-Berg et al., 1989 ; Knopf et al., 1998 ; Ni et al., 2000). Dans le présent travail, nous mettons en évidence la présence d'un répertoire dont la distribution gaussienne des longueurs de CDR3 est très altérée dans les LT des DCLN, de façon simultanée à l'infiltration lymphocytaire de la greffe intrastriatale. A l'inverse, le profil de la distribution des longueurs du CDR3 des LT du sang et de la rate demeure gaussien. Le rôle des DCLN est mis en évidence dans de nombreux désordres du CNS, notamment dans la SEP (DeVos et al., 2002) ou l'EAE (Phillipps et al., 1997) et dans le cadre de tumeurs cérébrales (Okamoto et al., 1999). Une lymphadénectomie cervicale est décrite comme réduisant la sévérité de l'EAE (Phillipps et al., 1997), ou augmente le délai d'infiltration des LT, qui proviennent alors de la rate (Okamoto et al., 1999). Il est possible d'induire un phénomène de tolérance suite à l'injection intracérébrale d'un xénoantigène, comme l'ovalbumine. Ce phénomène implique aussi les DCLN. Une réponse immune est rapidement

enclenchée contre ce xénoantigène, permettant un phénomène de DTH en cas de rappel, et provoque l'émergence d'anticorps. De telles réponses sont absentes après ablation des ganglions ou après transfert de tolérance par les LT issus de ces mêmes ganglions. A l'inverse, une splénectomie n'altère pas ces phénomènes (Wenkel et al., 2000).

Pourtant, notre étude montre que le profil du répertoire lymphocytaire observé dans les DCLN ne se superpose pas à celui retrouvé dans l'infiltrat du greffon. Une activation séquentielle dans le temps pourrait expliquer ce phénomène : le profil de l'infiltrat lymphocytaire observé dans les striata correspondrait peut-être à une stimulation antérieure des LT dans les DCLN. D'autre part, nous avons vu précédemment qu'un large répertoire, spécifique ou non, peut être mobilisé sur le site inflammatoire. Si le recrutement de T aspécifiques et une dispersion épitopique existent, il est fort probable que l'environnement particulier du SNC et notamment les cytokines présentes puisse faire évoluer la structure moléculaire du TCR des lymphocytes issus de la périphérie (Launois et al., 1997). Récemment, Weissert et coll. ont observé dans un modèle d'EAE induite par l'administration de MOG, que la réponse immune dans les tissus lymphoïdes est différente de celle observée dans les lésions. Ils suggèrent que si plusieurs LT spécifiques d'un peptide peuvent être observés au cours d'une EAE, c'est essentiellement la réponse sur le site inflammatoire qui doit primer (Weissert et al., 2001).

Ces données et nos résultats antérieurs suggèrent que le recrutement lymphocytaire est large, varié et mené dans un contexte proinflammatoire. La présence d'IL-2 et de son récepteur, suggèrent encore une amplification locale de la réponse lymphocytaire. Malgré les données récentes de Juedes et Ruddle (2001) qui suggèrent que dans le SNC, les LT produiraient préférentiellement des cytokines sans qu'ils prolifèrent, une amplification pourrait néanmoins se faire au sein de nouvelles structures, apparentées à une néogénèse de tissu lymphoïde riche en chimiokines (Prineas, 1979 ; Raine et al., 1990 ; Colombo et al., 2000 ; Pashenkov et al., 2003). Ainsi, la réponse aux xéngreffes neuronales sensibilise les organes lymphoïdes locaux, mais ne paraît pas impliquer le reste du système immunitaire, démontrant à nouveau une caractéristique propre du SNC.

Nous avons vu que le rejet de xénogreffes neuronales se produit suite à une infiltration lymphocytaire massive du greffon dans un contexte proinflammatoire de type Th1. Nous avons observé une assez grande variété d'usage des longueurs du V β du CDR3 de ces lymphocytes. Cependant, la réponse immune n'est observable que dans les régions proches de la greffe.

▪ **Limiter localement les réactions inflammatoires :**

Le rejet de xénogreffe est largement médié par des LT. Pourtant, le taux de survie des xénogreffes neuronales sous monothérapie de CsA n'est que de 60 à 70% (Pakzaban et Isacson, 1994). Ce chiffre peut être augmenté par l'ajout combiné d'autres immunosuppresseurs. Des cocktails à fortes doses de plusieurs immunosuppresseurs (multi-thérapie : CsA, tacrolimus, mycophenolate mofetil, méthylprednisolone, azathioprine), additionnés ou non d'anticorps monoclonaux dirigés contre le complément ont montré leur efficacité dans la survie d'une xénogreffe murine ou porcine implantée respectivement chez le rat ou le primate (Wennberg et al., 2001 ; Cicchetti et al., 2003). Toutefois, des traitements immunosuppresseurs à fortes doses risquent d'entraîner des effets indésirables en clinique, et des recherches ultérieures sont nécessaires pour déterminer si certaines combinaisons d'immunosuppresseurs (par exemple CsA + rapamycine) peuvent induire un état de tolérance, comme c'est le cas pour l'allogreffe de tissus périphériques (Pour revue : Li et al., 2000).

Une voie complémentaire consiste à limiter l'immunogénicité des cellules du donneur. La destruction des cellules exprimants de forts taux de l'épitope Gal α 1-3 Gal revient à éliminer les cellules microgliales ou endothéliales présentes dans les suspensions de neurones foetaux porcins. Un tel traitement peut-être effectué avant transplantation, en exposant les suspensions cellulaires à des anticorps naturels dirigés contre l'épitope Gal α 1-3 Gal et/ou le complément. De tels traitements ne font que ralentir le processus de rejet après implantation dans le cerveau du rat (Brevig et al., 2001). Le rejet de telles cellules par le cerveau humain est donc très probable. On

peut donc estimer que les stratégies d'immunosuppression devront, à l'avenir, cibler plus particulièrement les composants lymphocytaires au niveau du greffon. Une perspective envisageable est la manipulation des composants cellulaires des xéno greffes porcines pour accroître leur potentiel immunosuppresseur. Une voie de blocage spécifique de l'activation des LT est celle des molécules de costimulation. L'interaction CD28/B7 est particulièrement intéressante car elle est la voie de costimulation majeure de l'activation des cellules T CD4⁺, et son inhibition provoque leur anergie (Tan et al., 1993). Un tel blocage peut-être effectué grâce à la molécule chimérique soluble CTLA4-Ig. La partie CTLA4, en se liant au récepteur B7 des APC, empêche toute interaction entre ce récepteur et la molécule CD28 exprimée par les LT. La partie Ig stabilise la protéine chimérique. On sait que l'administration systémique de cette molécule favorise la survie de xéno greffes d'îlots pancréatiques (Lehnert et al., 2001) ou d'une xéno greffe neuronale (Larsson et al., 2002).

Cependant, la production de la molécule CTLA4-Ig dans le tissu qui fait l'objet d'un processus de rejet paraît plus efficace qu'une application systémique. C'est le cas d'allogreffes cardiaques, mais aussi de l'EAE. Dans l'un et l'autre cas, l'emploi de vecteurs adénoviraux produisant la molécule chimérique a une action immunosuppressive s'ils sont injectés dans le cœur ou dans le cerveau, respectivement, plutôt que dans la circulation ou un tissu non relevant (Croxford et al., 1998 ; Guillot et al., 2000 ; Li et al., 2001).

Dans des expériences préliminaires de notre équipe (C. Martin et D. Laplaud, résultats non publiés), nous avons cherché à modifier génétiquement des cellules avant greffe dans le cerveau, à l'aide de vecteurs adénoviraux codants pour la molécule CTLA4-Ig. Nous n'avons malheureusement pas obtenu de résultats probants, peut-être à cause du caractère immunogène propre de l'adénovirus. Pour s'affranchir de cette complication et des difficultés de transfection des neurones, une nouvelle stratégie est en cours de développement. Elle consiste à générer des porcs transgéniques exprimant la molécule de fusion CTLA4-Ig sous le contrôle du promoteur de l'énolase neurone spécifique. Les résultats actuels sont encourageants puisqu'il semble que le transgène puisse s'exprimer dans le cerveau fœtal dès l'âge de 28 jour, et l'intérêt de cette approche sera connue dans les mois à venir.

- **Les nouvelles sources cellulaires :**

De nouvelles possibilités d'apport de cellules productrices de dopamine sont en plein développement, comme le recours aux cellules souches, éventuellement génétiquement modifiées. En effet, la culture de cellules souches neurales humaines est possible à partir de cerveau fœtal ou de certaines aires du cerveau adulte. Elles prolifèrent *in vitro* en présence de FGF-2 ou d'EGF (pour revue : Taupin et Gage, 2002 ; Isacson et al., 2001). De ce fait, ces sources cellulaires paraissent disponibles en quantités importantes. Cependant, elles restent des cellules immatures, dont le processus de différenciation en cellules dopaminergiques reste encore difficilement maîtrisable. De nombreuses études sont actuellement en cours pour induire le phénotype dopaminergique, par ajout de différentes cytokines, par modification de la pression partielle d'oxygène ou par modification génétique par apport de gènes régulateurs tels que nurr1 (Potter et al., 1999, Van der Kooy et Weiss, 2000 ; Studer et al., 2000). Des études récentes montrent qu'une fraction plus ou moins importante de cellules peuvent se différencier en neurones fonctionnels après implantation dans le cerveau de rats hémiparkinsoniens (Bjorklund et al., 2002 ; Kim et al., 2002). Cependant l'utilisation de ces cellules est à double tranchant : le fait de pouvoir disposer de quantités illimitées de cellules implique qu'elles ont un potentiel tumorigène non négligeable. Les multiples propriétés des cellules souches restent encore à contrôler avant leurs applications en clinique.

- **Mieux comprendre les réactions inflammatoire dans le SNC.**

La microglie est la clé des interactions immunologiques. Ces cellules encore mal connues, exercent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du cerveau. Leurs propriétés complexes, que nous avons brièvement examinées dans l'Introduction de ce travail, font que ces cellules, quiescentes dans un cerveau sain, sont capables de différents degrés d'activation, leur permettant d'exercer leurs actions neuroprotectrices face à des agressions directes. Leur interaction avec les LT reste très mal connue, puisque des résultats apparemment contradictoires

les présentent tantôt comme éléments atténuateurs, tantôt comme des APC capables d'activation secondaire des LT, sinon même primaire. Quels sont les événements qui dirige la microglie vers une réponse neuroprotectrice ou inflammatoire ? Quel phénomène détermine une réaction immune innée ou spécifique ? Dans l'espoir de mieux comprendre les mécanismes qui potentialisent préférentiellement une réponse spécifique vis à vis d'une réponse innée et/ou neuroprotectrice, une grande attention doit être portée aux mécanismes d'activation microgliale et aux mécanismes de présentation antigénique qui peuvent en découler. Parmi les principaux signaux microgliaux activés lors de l'inflammation, se trouvent le récepteur TREM-2 dont le degré d'expression pourrait jouer un rôle dans l'orientation de la réponse immune (Schmidt et al., 2002). Cette hypothèse constituera la base de mon stage post-doctoral chez le Dr M.J. Carson (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Une meilleure compréhension de la physiologie de ces cellules permettra probablement de définir de nouvelles stratégies d'immunosuppression utilisables en xénotransplantation dans le SNC.

Akiyama H. and McGeer P. L. (1990) Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J Neuroimmunol.* 30, 81-93.

Akiyama H., Itagaki S., and McGeer P. L. (1988) Major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia following epidural kainic acid lesions. *J Neurosci Res.* 20, 147-157.

Albright A. V., Shieh J. T., Itoh T., Lee B., Pleasure D., O'Connor M. J., Doms R. W., and Gonzalez-Scarano F. (1999) Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J Virol.* 73, 205-213.

- Alemdar A. Y., Baker K. A., Sadi D., McAlister V. C., and Mendez I. (2001) Liposomal tacrolimus administered systemically and within the donor cell suspension improves xenograft survival in hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol.* 172, 416-424.
- Allt G. and Lawrenson J. G. (2001) Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs.* 169, 1-11.
- Aloisi F., Penna G., Cerase J., Menendez Iglesias B., and Adorini L. (1997) IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol.* 159, 1604-1612.
- Aloisi F., Ria F., and Adorini L. (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today.* 21, 141-147.
- Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia.* 36, 165-179.
- Aloisi F., Ambrosini E., Columba-Cabezas S., Magliozzi R., and Serafini B. (2001) Intracerebral regulation of immune responses. *Ann Med.* 33, 510-515.
- Alt F. W., Oltz E. M., Young F., Gorman J., Taccioli G., and Chen J. (1992) VDJ recombination. *Immunol Today.* 13, 306-314.
- Andersson P. B., Perry V. H., and Gordon S. (1992) The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience.* 48, 169-186.
- Andjelkovic A. V. and Pachter J. S. (1998) Central nervous system endothelium in neuroinflammatory, neuroinfectious, and neurodegenerative disease. *J Neurosci Res.* 51, 423-430.
- Angelov D. N., Neiss W. F., Streppel M., Walther M., Guntinas-Lichius O., and Stennert E. (1996) ED2-positive perivascular cells act as neuronophages during delayed neuronal loss in the facial nucleus of the rat. *Glia.* 16, 129-139.
- Antel J. and Prat A. (2000) Antigen and superantigen presentation in the human CNS. *J Neuroimmunol.* 107, 118-123.
- Anthony D. C., Bolton S. J., Fearn S., and Perry V. H. (1997) Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. *Brain.* 120 (Pt 3), 435-444.
- Archelos J. J., Previtali S. C., and Hartung H. P. (1999) The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.* 22, 30-38.
- Arvieux J., Yssel H., and Colomb M. G. (1988) Antigen-bound C3b and C4b enhance antigen-presenting cell function in activation of human T-cell clones. *Immunology.* 65, 229-235.

- Arvin B., Neville L. F., Barone F. C., and Feuerstein G. Z. (1996) The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev.* 20, 445-452.
- Auffray C. and Rougeon F. (1980) Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur J Biochem.* 107, 303-314.
- Austyn J. M. (1996) New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med.* 183, 1287-1292.
- Babbe H., Roers A., Waisman A., Lassmann H., Goebels N., Hohlfeld R., Friese M., Schroder R., Deckert M., Schmidt S., Ravid R., and Rajewsky K. (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 192, 393-404.
- Baggiolini M., Dewald B., and Moser B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 55, 97-179.
- Balabanov R. and Dore-Duffy P. (1998) Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res.* 53, 637-644.
- Banati R. B., Gehrman J., Schubert P., and Kreutzberg G. W. (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia.* 7, 111-118.
- Banchereau J. and Steinman R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, 245-252.
- Baranzini S. E., Elfstrom C., Chang S. Y., Butunoi C., Murray R., Higuchi R., and Oksenberg J. R. (2000) Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol.* 165, 6576-6582.
- Barclay A. N., Wright G. J., Brooke G., and Brown M. H. (2002) CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 23, 285-290.
- Barkats M., Nakao N., Grasbon-Frodl E. M., Bilanz-Bleuel A., Revah F., Mallet J., and Brundin P. (1997) Intraatrial grafts of embryonic mesencephalic rat neurons genetically modified using an adenovirus encoding human Cu/Zn superoxide dismutase. *Neuroscience.* 78, 703-713.
- Barker C. F. and Billingham R. E. (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol.* 25, 1-54.
- Barker R. and Dunnett S. (1993) The biology and behaviour of intracerebral adrenal transplants in animals and man. *Rev Neurosci.* 4, 113-146.
- Barker R. A., Ratcliffe E., McLaughlin M., Richards A., and Dunnett S. B. (2000) A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 20, 3415-3424.

- Barnum S. R. (1995) Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med.* 6, 132-146.
- Baron J. L., Madri J. A., Ruddle N. H., Hashim G., and Janeway C. A., Jr. (1993) Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med.* 177, 57-68.
- Barten D. M., Clark R. B., and Ruddle N. H. (1995) Presence of T cells with activated and memory phenotypes in inflammatory spinal cord lesions. *J Immunol.* 155, 5409-5418.
- Bauer J., Bradl M., Hickley W. F., Forss-Petter S., Breitschopf H., Linington C., Wekerle H., and Lassmann H. (1998) T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol.* 153, 715-724.
- Becher B., Fedorowicz V., and Antel J. P. (1996) Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *J Neurosci Res.* 45, 375-381.
- Bechmann I., Mor G., Nilsen J., Eliza M., Nitsch R., and Naftolin F. (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia.* 27, 62-74.
- Bechmann I. and Nitsch R. (2001) Plasticity following lesion: help and harm from the immune system. *Restor Neurol Neurosci.* 19, 189-198.
- Bell M. D., Lopez-Gonzalez R., Lawson L., Hughes D., Fraser I., Gordon S., and Perry V. H. (1994) Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J Neurocytol.* 23, 605-613.
- Bell M. D., Taub D. D., and Perry V. H. (1996) Overriding the brain's intrinsic resistance to leukocyte recruitment with intraparenchymal injections of recombinant chemokines. *Neuroscience.* 74, 283-292.
- Benveniste E. N. (1997) Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol.* 69, 31-75.
- Benveniste E. N. (1998) Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 259-275.
- Betarbet R., Sherer T. B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A. V., and Greenamyre J. T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3, 1301-1306.
- Bilang-Bleuel A., Revah F., Colin P., Locquet I., Robert J. J., Mallet J., and Horellou P. (1997) 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.* 94, 8818-8823.
- Bjorklund A. and Stenevi U. (1979) Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 177, 555-560.
- Bjorklund A., Stenevi U., Dunnett S. B., and Gage F. H. (1982) Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Nature.* 298, 652-654.
- Bjorklund A., Kirik D., Rosenblad C., Georgievska B., Lundberg C., and Mandel R. J. (2000) 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.* 886, 82-98.
- Bjorklund A. and Lindvall O. (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci.* 3, 537-544.
- Bjorklund L. M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I. Y., McNaught K. S., Brownell A. L., Jenkins B. G., Wahlestedt C., Kim K. S., and Isacson O. (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 2344-2349.
- Blalock J. E. (1992) Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. *Chem Immunol.* 52, 1-24.
- Bo L., Peterson J. W., Mork S., Hoffman P. A., Gallatin W. M., Ransohoff R. M., and Trapp B. D. (1996) Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55, 1060-1072.
- Boddeke E. W., Meigel I., Frenz S., Gourmala N. G., Harrison J. K., Buttini M., Spleiss O., and Gebicke-Harter P. (1999) Cultured rat microglia express functional beta-chemokine receptors. *J Neuroimmunol.* 98, 176-184.
- Bolton S. J., Anthony D. C., and Perry V. H. (1998) Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience.* 86, 1245-1257.
- Bolton S. J. and Perry V. H. (1998) Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. *Exp Neurol.* 154, 231-240.
- Borlongan C. V. and Sanberg P. R. (2002) Neural transplantation for treatment of Parkinson's disease. *Drug Discov Today.* 7, 674-682.

- Borlongan C. V., Stahl C. E., Fujisaki T., Sanberg P. R., and Watanabe S. (1999) Cyclosporine A-induced hyperactivity in rats: is it mediated by immunosuppression, neurotrophism, or both? *Cell Transplant.* 8, 153-159.
- Boulton M., Flessner M., Armstrong D., Hay J., and Johnston M. (1998) Determination of volumetric cerebrospinal fluid absorption into extracranial lymphatics in sheep. *Am J Physiol.* 274, R88-96.
- Boven L. A., Montagne L., Nottet H. S., and De Groot C. J. (2000) Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin Exp Immunol.* 122, 257-263.
- Brabb T., von Dassow P., Ordonez N., Schnabel B., Duke B., and Goverman J. (2000) In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity. *J Exp Med.* 192, 871-880.
- Bradbury M. W., Cserr H. F., and Westrop R. J. (1981) Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am J Physiol.* 240, F329-336.
- Breimer M. E. (1999) Physiologic incompatibilities in discordant xenotransplantation. *Transplant Proc.* 31, 905-908.
- Brevig T., Pedersen E. B., Kristensen T., and Zimmer J. (1997) Proliferative response of human T lymphocytes to porcine fetal brain cells. *Cell Transplant.* 6, 571-577.
- Brevig T., Kristensen T., and Zimmer J. (1999) Expression of major histocompatibility complex antigens and induction of human T-lymphocyte proliferation by astrocytes and macrophages from porcine fetal brain. *Exp Neurol.* 159, 474-483.
- Brevig T., Meyer M., Kristensen T., Zimmer J., and Holgersson J. (2001) Xenotransplantation for brain repair: reduction of porcine donor tissue immunogenicity by treatment with anti-Gal antibodies and complement. *Transplantation.* 72, 190-196.
- Broadwell R. D., Charlton H. M., Ebert P. S., Hickey W. F., Shirazi Y., Villegas J., and Wolf A. L. (1991) Allografts of CNS tissue possess a blood-brain barrier. II. Angiogenesis in solid tissue and cell suspension grafts. *Exp Neurol.* 112, 1-28.
- Brooks D. J., Piccini P., Turjanski N., and Samuel M. (2000) Neuroimaging of dyskinesia. *Ann Neurol.* 47, S154-158; discussion S158-159.
- Brouard S., Blancho G., Moreau A., Heslan J. M., Cuturi M. C., and Souillou J. P. (1998) Long-term survival of hamster-to-rat cardiac xenografts in the absence of a Th2 shift. *Transplantation.* 65, 1555-1563.

- Broussolle E. and Thobois S. (2002) Génétique et facteurs environnementaux de la maladie de Parkinson. *Rev Neurol (Paris)*. 158, 7S11-23.
- Brundin P., Nilsson O. G., Gage F. H., and Bjorklund A. (1985) Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Exp Brain Res*. 60, 204-208.
- Brundin P., Widner H., Nilsson O. G., Strecker R. E., and Bjorklund A. (1989) Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res*. 75, 195-207.
- Brundin P., Karlsson J., Emgard M., Schierle G. S., Hansson O., Petersen A., and Castilho R. F. (2000) Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant*. 9, 179-195.
- Butcher E. C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 67, 1033-1036.
- Calvo C. F., Yoshimura T., Gelman M., and Mallat M. (1996) Production of monocyte chemotactic protein-1 by rat brain macrophages. *Eur J Neurosci*. 8, 1725-1734.
- Cannella B. and Raine C. S. (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 37, 424-435.
- Carlos T. M., Clark R. S., Francica-Higgins D., Schiding J. K., and Kochanek P. M. (1997) Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol*. 61, 279-285.
- Carrithers M. D., Visintin I., Kang S. J., and Janeway C. A., Jr. (2000) Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain*. 123 (Pt 6), 1092-1101.
- Carson M. J., Reilly C. R., Sutcliffe J. G., and Lo D. (1998) Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia*. 22, 72-85.
- Carson M. J., Reilly C. R., Sutcliffe J. G., and Lo D. (1999a) Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am J Pathol*. 154, 481-494.
- Carson M. J., Sutcliffe J. G., and Campbell I. L. (1999b) Microglia stimulate naive T-cell differentiation without stimulating T-cell proliferation. *J Neurosci Res*. 55, 127-134.
- Cash E., Zhang Y., and Rott O. (1993) Microglia present myelin antigens to T cells after phagocytosis of oligodendrocytes. *Cell Immunol*. 147, 129-138.

- Castilho R. F., Hansson O., and Brundin P. (2000) FK506 and cyclosporin A enhance the survival of cultured and grafted rat embryonic dopamine neurons. *Exp Neurol.* 164, 94-101.
- Catania A., Delgado R., Airaghi L., Cutuli M., Garofalo L., Carlin A., Demitri M. T., and Lipton J. M. (1999) alpha-MSH in systemic inflammation. Central and peripheral actions. *Ann N Y Acad Sci.* 885, 183-187.
- Charreau B., Cassard A., Tesson L., Le Mauff B., Navenot J. M., Blanchard D., Lublin D., Souillou J. P., and Anegon I. (1994) Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation.* 58, 1222-1229.
- Chen J. J., Sun Y., and Nabel G. J. (1998) Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science.* 282, 1714-1717.
- Cheng P. C., Steele C. R., Gu L., Song W., and Pierce S. K. (1999) MHC class II antigen processing in B cells: accelerated intracellular targeting of antigens. *J Immunol.* 162, 7171-7180.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159.
- Chopp M., Zhang R. L., Chen H., Li Y., Jiang N., and Rusche J. R. (1994) Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 25, 869-875; discussion 875-866.
- Christie R. H., Freeman M., and Hyman B. T. (1996) Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 148, 399-403.
- Cicchetti F., Fodor W., Deacon T. W., Van Horne C., Rollins S., Burton W., Costantini L. C., and Isacson O. (2003) Immune parameters relevant to neural xenograft survival in the primate brain. *Xenotransplantation.* 10, 41-49.
- Clark R. K., Lee E. V., White R. F., Jonak Z. L., Feuerstein G. Z., and Barone F. C. (1994) Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. *Brain Res Bull.* 35, 387-392.
- Clarke D. J., Brundin P., Strecker R. E., Nilsson O. G., Bjorklund A., and Lindvall O. (1988) Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: ultrastructural evidence for synapse formation using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Exp Brain Res.* 73, 115-126.

- Coffin J. (1982) Endogenous retroviruses. RNA Tumour Viruses. In: R.A. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin (Eds), 1109-1203.
- Colombo M., Dono M., Gazzola P., Roncella S., Valetto A., Chiorazzi N., Mancardi G. L., and Ferrarini M. (2000) Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Immunol.* 164, 2782-2789.
- Costantini L. C., Chaturvedi P., Armistead D. M., McCaffrey P. G., Deacon T. W., and Isacson O. (1998) A novel immunophilin ligand: distinct branching effects on dopaminergic neurons in culture and neurotrophic actions after oral administration in an animal model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 5, 97-106.
- Costantini L. C. and Isacson O. (2000) Neuroimmunophilin ligand enhances neurite outgrowth and effect of fetal dopamine transplants. *Neuroscience.* 100, 515-520.
- Coutinho G. C., Durieu-Trautmann O., Strosberg A. D., and Couraud P. O. (1991) Catecholamines stimulate the IFN-gamma-induced class II MHC expression on bovine brain capillary endothelial cells. *J Immunol.* 147, 2525-2529.
- Cross A. H., Cannella B., Brosnan C. F., and Raine C. S. (1991) Hypothesis: antigen-specific T cells prime central nervous system endothelium for recruitment of nonspecific inflammatory cells to effect autoimmune demyelination. *J Neuroimmunol.* 33, 237-244.
- Cross A. H., Trotter J. L., and Lyons J. (2001) B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 112, 1-14.
- Croxford J. L., O'Neil J. K., Ali R. R., Browne K., Byrnes A. P., Dallman M. J., Wood M. J., Fedlmann M., and Baker D. (1998) Local gene therapy with CTLA4-immunoglobulin fusion protein in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 28, 3904-3916.

- Cserr H. F. and Knopf P. M. (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today*. 13, 507-512.
- Cumberbatch M., Fielding I., and Kimber I. (1994) Modulation of epidermal Langerhans' cell frequency by tumour necrosis factor-alpha. *Immunology*. 81, 395-401.
- Cushing S. D., Berliner J. A., Valente A. J., Territo M. C., Navab M., Parhami F., Gerrity R., Schwartz C. J., and Fogelman A. M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87, 5134-5138.
- Cushing S. D. and Fogelman A. M. (1992) Monocytes may amplify their recruitment into inflammatory lesions by inducing monocyte chemotactic protein. *Arterioscler Thromb*. 12, 78-82.
- Czech K. A., Ryan J. W., Sagen J., and Pappas G. D. (1997) The influence of xenotransplant immunogenicity and immunosuppression on host MHC expression in the rat CNS. *Exp Neurol*. 147, 66-83.
- Dalmaso A. P. and Platt J. L. (1993) Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor. *Transplantation*. 56, 1171-1176.
- Daniloff J. K., Low W. C., Bodony R. P., and Wells J. (1985) Cross-species neural transplants of embryonic septal nuclei to the hippocampal formation of adult rats. *Exp Brain Res*. 59, 73-82.
- Date I. and Ohmoto T. (1999) Neural transplantation for Parkinson's disease. *Cell Mol Neurobiol*. 19, 67-78.
- Date I., Shingo T., Yoshida H., Fujiwara K., Kobayashi K., and Ohmoto T. (2000) Grafting of encapsulated dopamine-secreting cells in Parkinson's disease: long-term primate study. *Cell Transplant*. 9, 705-709.
- Davidson H. W. and Watts C. (1989) Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes. *J Cell Biol*. 109, 85-92.
- De Saint-Vis B., Fugier-Vivier I., Massacrier C., Gaillard C., Vanbervliet B., Ait-Yahia S., Banchereau J., Liu Y. J., Lebecque S., and Caux C. (1998) The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol*. 160, 1666-1676.
- De Simone R., Giampaolo A., Giometto B., Gallo P., Levi G., Peschle C., and Aloisi F. (1995) The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 54, 175-187.

- De Vos A. F., van Meurs M., Brok H. P., Boven L. A., Hintzen R. Q., van der Valk P., Ravid R., Rensing S., Boon L., t Hart B. A., and Laman J. D. (2002) Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 169, 5415-5423.
- Deacon T., Schumacher J., Dinsmore J., Thomas C., Palmer P., Kott S., Edge A., Penney D., Kassissieh S., Dempsey P., and Isacson O. (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med.* 3, 350-353.
- Deacon T., Whatley B., LeBlanc C., Lin L., and Isacson O. (1999) Pig fetal septal neurons implanted into the hippocampus of aged or cholinergic deafferented rats grow axons and form cross-species synapses in appropriate target regions. *Cell Transplant.* 8, 111-129.
- Defer G. L., Geny C., Ricolfi F., Fenelon G., Monfort J. C., Remy P., Villafane G., Jeny R., Samson Y., Keravel Y., Gaston A., Degos J. D., Peschanski M., Cesaro P., and Nguyen J. P. (1996) Long-term outcome of unilaterally transplanted parkinsonian patients. I. Clinical approach. *Brain.* 119 (Pt 1), 41-50.
- Delgado M., Leceta J., and Ganea D. (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promote in vivo generation of memory Th2 cells. *Faseb J.* 16, 1844-1846.
- Dempsey P. W., Allison M. E., Akkaraju S., Goodnow C. C., and Fearon D. T. (1996) C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science.* 271, 348-350.
- Denis-Donini S., Glowinski J., and Prochiantz A. (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature.* 307, 641-643.
- Dobbertin A., Schmid P., Gelman M., Glowinski J., and Mallat M. (1997) Neurons promote macrophage proliferation by producing transforming growth factor-beta2. *J Neurosci.* 17, 5305-5315.
- Dopp J. M., Breneman S. M., and Olschowka J. A. (1994) Expression of ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and leukosialin in the mouse central nervous system during the induction and remission stages of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 54, 129-144.
- Doucet G., Murata Y., Brundin P., Bosler O., Mons N., Geffard M., Ouimet C. C., and Bjorklund A. (1989) Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol.* 106, 1-19.
- Dowling P., Shang G., Raval S., Menonna J., Cook S., and Husar W. (1996) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 184, 1513-1518.

- D'Souza S. D., Bonetti B., Balasingam V., Cashman N. R., Barker P. A., Troutt A. B., Raine C. S., and Antel J. P. (1996) Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med.* 184, 2361-2370.
- Duan W. M., Widner H., and Brundin P. (1995) Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngeneic, allogeneic or xenogeneic embryonic neuronal tissue in rats. *Exp Brain Res.* 104, 227-242.
- Duan W. M., Brundin P., Grasbon-Frodl E. M., and Widner H. (1996) Methylprednisolone prevents rejection of intrastriatal grafts of xenogeneic embryonic neural tissue in adult rats. *Brain Res.* 712, 199-212.
- Duan W. M., Cameron R. M., Brundin P., and Widner H. (1997) Rat intrastriatal neural allografts challenged with skin allografts at different time points. *Exp Neurol.* 148, 334-347.
- Duan W. M., Westerman M., Flores T., and Low W. C. (2001) Survival of intrastriatal xenografts of ventral mesencephalic dopamine neurons from MHC-deficient mice to adult rats. *Exp Neurol.* 167, 108-117.
- Duan W. M., Westerman M. A., Wong G., and Low W. C. (2002) Rat nigral xenografts survive in the brain of MHC class II-, but not class I-deficient mice. *Neuroscience.* 115, 495-504.
- Dunnett S. B. and Bjorklund A. (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature.* 399, A32-39.
- Dusart I. and Schwab M. E. (1994) Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 6, 712-724.
- Ebnet K., Simon M. M., and Shaw S. (1996) Regulation of chemokine gene expression in human endothelial cells by proinflammatory cytokines and *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci.* 797, 107-117.
- Edan G., Miller D., Clanet M., Confavreux C., Lyon-Caen O., Lubetzki C., Brochet B., Berry I., Rolland Y., Froment J. C., Cabanis E., Iba-Zizen M. T., Gandon J. M., Lai H. M., Moseley I., and Sabouraud O. (1997) Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 62, 112-118.
- Elkabes S., DiCicco-Bloom E. M., and Black I. B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci.* 16, 2508-2521.
- Emgard M., Karlsson J., Hansson O., and Brundin P. (1999) Patterns of cell death and dopaminergic neuron survival in intrastriatal nigral grafts. *Exp Neurol.* 160, 279-288.

- Erdei A., Spaeth E., Alsenz J., Rude E., Schulz T., Gergely J., and Dierich M. P. (1984) Role of C3b receptors in the enhancement of interleukin-2-dependent T-cell proliferation. *Mol Immunol.* 21, 1215-1221.
- Espejo E. F., Montoro R. J., Armengol J. A., and Lopez-Barneo J. (1998) Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron.* 20, 197-206.
- Fabry Z., Raine C. S., and Hart M. N. (1994) Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today.* 15, 218-224.
- Fabry Z., Topham D. J., Fee D., Herlein J., Carlino J. A., Hart M. N., and Sriram S. (1995) TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *J Immunol.* 155, 325-332.
- Fahn S. and Cohen G. (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* 32, 804-812.
- Ferguson T. A., Fletcher S., Herndon J., and Griffith T. S. (1995) Neuropeptides modulate immune deviation induced via the anterior chamber of the eye. *J Immunol.* 155, 1746-1756.
- Fine J., Duff J., Chen R., Chir B., Hutchison W., Lozano A. M., and Lang A. E. (2000) Long-term follow-up of unilateral pallidotomy in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 342, 1708-1714.
- Fink J. S., Schumacher J. M., Ellias S. L., Palmer E. P., Saint-Hilaire M., Shannon K., Penn R., Starr P., VanHorne C., Kott H. S., Dempsey P. K., Fischman A. J., Raineri R., Manhart C., Dinsmore J., and Isacson O. (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant.* 9, 273-278.
- Finsen B., Poulsen P. H., and Zimmer J. (1988) Xenografting of fetal mouse hippocampal tissue to the brain of adult rats: effects of cyclosporin A treatment. *Exp Brain Res.* 70, 117-133.
- Finsen B. R., Sorensen T., Castellano B., Pedersen E. B., and Zimmer J. (1991) Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol.* 32, 159-183.
- Fischer H. G., Nitzgen B., Germann T., Degitz K., Daubener W., and Hadding U. (1993) Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independent antigen presentation function. *J Neuroimmunol.* 42, 87-95.

- Fischer H. G., Bonifas U., and Reichmann G. (2000) Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 164, 4826-4834.
- Fischer H. G. and Reichmann G. (2001) Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol.* 166, 2717-2726.
- Fishman J. A. (1998) Infection and xenotransplantation. Developing strategies to minimize risk. *Ann N Y Acad Sci.* 862, 52-66.
- Flugel A., Schwaiger F. W., Neumann H., Medana I., Willem M., Wekerle H., Kreutzberg G. W., and Graeber M. B. (2000) Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol.* 10, 353-364.
- Flugel A., Berkowicz T., Ritter T., Labeur M., Jenne D. E., Li Z., Ellwart J. W., Willem M., Lassmann H., and Wekerle H. (2001) Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 14, 547-560.
- Fontana A., Fierz W., and Wekerle H. (1984) Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature.* 307, 273-276.
- Ford A. L., Goodsall A. L., Hickey W. F., and Sedgwick J. D. (1995) 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.* 154, 4309-4321.
- Ford A. L., Foulcher E., Lemckert F. A., and Sedgwick J. D. (1996) Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med.* 184, 1737-1745.
- Foussat A., Galanaud P., and Emilie D. (2000) Les chimiokines et la longue marche des leucocytes. *Médecine/Sciences.* 16, 757-766.
- Freed W. J., Dymecki J., Poltorak M., and Rodgers C. R. (1988) Intraventricular brain allografts and xenografts: studies of survival and rejection with and without systemic sensitization. *Prog Brain Res.* 78, 233-241.
- Freed C. R., Greene P. E., Breeze R. E., Tsai W. Y., DuMouchel W., Kao R., Dillon S., Winfield H., Culver S., Trojanowski J. Q., Eidelberg D., and Fahn S. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 344, 710-719.
- Freed W. J., Poltorak M., and Becker J. B. (1990) Intracerebral adrenal medulla grafts: a review. *Exp Neurol.* 110, 139-166.

- Freeman T. B., Wojak J. C., Brandeis L., Michel J. P., Pearson J., and Flamm E. S. (1988) Cross-species intracerebral grafting of embryonic swine dopaminergic neurons. *Prog Brain Res.* 78, 473-477.
- Freeman T. B., Olanow C. W., Hauser R. A., Nauert G. M., Smith D. A., Borlongan C. V., Sanberg P. R., Holt D. A., Kordower J. H., Vingerhoets F. J., and et al. (1995) Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 38, 379-388.
- Frei K., Siepl C., Groscurth P., Bodmer S., Schwerdel C., and Fontana A. (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol.* 17, 1271-1278.
- Friedman T., Shimizu A., Smith R. N., Colvin R. B., Seebach J. D., Sachs D. H., and Iacomini J. (1999a) Human CD4+ T cells mediate rejection of porcine xenografts. *J Immunol.* 162, 5256-5262.
- Friedman T., Smith R. N., Colvin R. B., and Iacomini J. (1999b) A critical role for human CD4+ T-cells in rejection of porcine islet cell xenografts. *Diabetes.* 48, 2340-2348.
- Frodl E. M., Sauer H., Lindvall O., and Brundin P. (1995) Effects of hibernation or cryopreservation on the survival and integration of striatal grafts placed in the ibotenate-lesioned rat caudate-putamen. *Cell Transplant.* 4, 571-577.
- Frohman E. M., Vayuvegula B., van den Noort S., and Gupta S. (1988) Norepinephrine inhibits gamma-interferon-induced MHC class II (Ia) antigen expression on cultured brain astrocytes. *J Neuroimmunol.* 17, 89-101.
- Gagne K., Brouard S., Giral M., Sebille F., Moreau A., Guillet M., Bignon J. D., Imbert B. M., Cuturi M. C., and Souillou J. P. (2000) Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol.* 164, 1553-1563.
- Galili U., Shohet S. B., Kobrin E., Stults C. L., and Macher B. A. (1988) Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem.* 263, 17755-17762.
- Galpern W. R., Burns L. H., Deacon T. W., Dinsmore J., and Isacson O. (1996) Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp Neurol.* 140, 1-13.
- Garcia M., Forster V., Hicks D., and Vecino E. (2002) Effects of muller glia on cell survival and neurogenesis in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 3735-3743.

- Gash D. M., Zhang Z., Ovadia A., Cass W. A., Yi A., Simmerman L., Russell D., Martin D., Lapchak P. A., Collins F., Hoffer B. J., and Gerhardt G. A. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*. 380, 252-255.
- Gasque P., Dean Y. D., McGreal E. P., VanBeek J., and Morgan B. P. (2000) Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*. 49, 171-186.
- Gasque P., Neal J. W., Singhrao S. K., McGreal E. P., Dean Y. D., Van B. J., and Morgan B. P. (2002) Roles of the complement system in human neurodegenerative disorders: pro-inflammatory and tissue remodeling activities. *Mol Neurobiol*. 25, 1-17.
- Gasser T. (1998) Genetics of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 44, S53-57.
- Gay F. W., Drye T. J., Dick G. W., and Esiri M. M. (1997) The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain*. 120 (Pt 8), 1461-1483.
- Gehrmann J., Matsumoto Y., and Kreutzberg G. W. (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 20, 269-287.
- Gendelman H. E., Genis P., Jett M., Zhai Q. H., and Nottet H. S. (1994) An experimental model system for HIV-1-induced brain injury. *Adv Neuroimmunol*. 4, 189-193.
- Geny C., Naimi-Sadaoui S., Belkadi A. E., Jeny R., Kammoun M., and Peschanski M. (1995) Microglial chimaerism in human xenografts to the rat brain. *Brain Res Bull*. 38, 383-391.
- Geny C., Naimi-Sadaoui S., Jeny R., Belkadi A. M., Juliano S. L., and Peschanski M. (1994) Long-term delayed vascularization of human neural transplants to the rat brain. *J Neurosci*. 14, 7553-7562.
- Germain R. N. and Margulies D. H. (1993) The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol*. 11, 403-450.
- Germain R. N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 76, 287-299.
- Giulian D. and Ingeman J. E. (1988) Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci*. 8, 4707-4717.
- Glabinski A. R., Balasingam V., Tani M., Kunkel S. L., Strieter R. M., Yong V. W., and Ransohoff R. M. (1996) Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol*. 156, 4363-4368.

- Glabinski A. R., Tani M., Strieter R. M., Tuohy V. K., and Ransohoff R. M. (1997) Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 150, 617-630.
- Gloor S. M., Wachtel M., Bolliger M. F., Ishihara H., Landmann R., and Frei K. (2001) Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev.* 36, 258-264.
- Gold R., Schmied M., Tontsch U., Hartung H. P., Wekerle H., Toyka K. V., and Lassmann H. (1996) Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo. *Brain.* 119 (Pt 2), 651-659.
- Goldstein G. W. and Betz A. L. (1986) The blood-brain barrier. *Sci Am.* 255, 74-83.
- Gordon L. B., Knopf P. M., and Cserr H. F. (1992) Ovalbumin is more immunogenic when introduced into brain or cerebrospinal fluid than into extracerebral sites. *J Neuroimmunol.* 40, 81-87.
- Gordon L. B., Nolan S. C., Ksander B. R., Knopf P. M., and Harling-Berg C. J. (1998) Normal cerebrospinal fluid suppresses the in vitro development of cytotoxic T cells: role of the brain microenvironment in CNS immune regulation. *J Neuroimmunol.* 88, 77-84.
- Gorochov G., Neumann A. U., Kereveur A., Parizot C., Li T., Katlama C., Karmochkine M., Raguin G., Autran B., and Debre P. (1998) Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med.* 4, 215-221.
- Gouhier C., Chalon S., Aubert-Pouessel A., Venier-Julienne M. C., Jollivet C., Benoit J. P., and Guilloteau D. (2002) Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivered by microspheres in a rodent model of Parkinson's disease. *Synapse.* 44, 124-131.
- Gourmala N. G., Limonta S., Bochelen D., Sauter A., and Boddeke H. W. (1999) Localization of macrophage inflammatory protein: macrophage inflammatory protein-1 expression in rat brain after peripheral administration of lipopolysaccharide and focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 88, 1255-1266.
- Graeber M. B., Streit W. J., and Kreutzberg G. W. (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res.* 21, 18-24.
- Graeber M. B., Streit W. J., and Kreutzberg G. W. (1989) Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res.* 22, 103-106.

- Granger D. N. and Kubes P. (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 55, 662-675.
- Grau V., Herbst B., van der Meide P. H., and Steiniger B. (1997) Activation of microglial and endothelial cells in the rat brain after treatment with interferon-gamma in vivo. *Glia.* 19, 181-189.
- Green D. R. and Ferguson T. A. (2001) The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 917-924.
- Griffin D. E., Levine B., Tyor W. R., and Irani D. N. (1992) The immune response in viral encephalitis. *Semin Immunol.* 4, 111-119.
- Griffith T. S. and Ferguson T. A. (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today.* 18, 240-244.
- Guery J. C., Galbiati F., Smiroldo S., and Adorini L. (1996) Selective development of T helper (Th)2 cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and beta(2)-microglobulin-deficient BALB/c mice. *J Exp Med.* 183, 485-497.
- Guillet M., Sebille F., and Soullillou J. (2001) TCR usage in naive and committed alloreactive cells: implications for the understanding of TCR biases in transplantation. *Curr Opin Immunol.* 13, 566-571.
- Guillot C., Mathieu P., Coathalem H., Le Mauff B., Castro M. G., Tesson L., Usal C., Laumonier T., Brouard S., Soullillou J. P., Lowenstein P. R., Cuturi M. C., and Anegón I. (2000) Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4lg expression. *J Immunol.* 164, 5258-5268.
- Hailer N. P., Heppner F. L., Haas D., and Nitsch R. (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol.* 8, 459-474.
- Hall L. R., Lass J. H., Diaconu E., Strine E. R., and Pearlman E. (1999) An essential role for antibody in neutrophil and eosinophil recruitment to the cornea: B cell-deficient (microMT) mice fail to develop Th2-dependent, helminth-mediated keratitis. *J Immunol.* 163, 4970-4975.
- Hammarberg H., Lidman O., Lundberg C., Eltayeb S. Y., Gielen A. W., Muhallab S., Svenningsson A., Linda H., van Der Meide P. H., Cullheim S., Olsson T., and Piehl F. (2000) Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci.* 20, 5283-5291.
- Hanisch U. K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40, 140-155.

- Hanly A. and Petito C. K. (1998) HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system. *Hum Pathol.* 29, 88-93.
- Hansen J. T. and Gash D. M. (1991) Functional aspects of mammalian neural transplantation. *Crit Rev Neurobiol.* 6, 79-98.
- Hansson O., Castilho R. F., Kaminski Schierle G. S., Karlsson J., Nicotera P., Leist M., and Brundin P. (2000) Additive effects of caspase inhibitor and lazardoid on the survival of transplanted rat and human embryonic dopamine neurons. *Exp Neurol.* 164, 102-111.
- Hantraye P., Riche D., Maziere M., and Isacson O. (1992) Intra-striatal transplantation of cross-species fetal striatal cells reduces abnormal movements in a primate model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 4187-4191.
- Harling-Berg C. J., Knopf P. M., and Cserr H. F. (1991) Myelin basic protein infused into cerebrospinal fluid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 35, 45-51.
- Harrison J. K., Jiang Y., Chen S., Xia Y., Maciejewski D., McNamara R. K., Streit W. J., Salafranca M. N., Adhikari S., Thompson D. A., Botti P., Bacon K. B., and Feng L. (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 10896-10901.
- Harrower T. P., Richards A., Cruz G., Copeman L., Dunnett S. B., and Barker R. A. (2002) Alpha Gal is widely expressed in embryonic porcine stem cells and neural tissue. *Neuroreport.* 13, 481-485.
- Hassan-Zahraee M., Ladiwala U., Lavoie P. M., McCrea E., Sekaly R. P., Owens T., and Antel J. P. (2000) Superantigen presenting capacity of human astrocytes. *J Neuroimmunol.* 102, 131-136.
- Hauser R. A., Freeman T. B., Snow B. J., Nauert M., Gauger L., Kordower J. H., and Olanow C. W. (1999) Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 56, 179-187.
- Hauser S. L., Bhan A. K., Gilles F. H., Hoban C. J., Reinherz E. L., Schlossman S. F., and Weiner H. L. (1983) Immunohistochemical staining of human brain with monoclonal antibodies that identify lymphocytes, monocytes, and the Ia antigen. *J Neuroimmunol.* 5, 197-205.
- Hayes G. M., Woodroffe M. N., and Cuzner M. L. (1988) Characterisation of microglia isolated from adult human and rat brain. *J Neuroimmunol.* 19, 177-189.

- He J., Chen Y., Farzan M., Choe H., Ohagen A., Gartner S., Busciglio J., Yang X., Hofmann W., Newman W., Mackay C. R., Sodroski J., and Gabuzda D. (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*. 385, 645-649.
- Helt C. E., Hoernig G. R., Albeck D. S., Gerhardt G. A., Ickes B., Reyland M. E., Quissell D. O., Stromberg I., and Granholm A. C. (2001) Neuroprotection of grafted neurons with a GDNF/caspase inhibitor cocktail. *Exp Neurol*. 170, 258-269.
- Herdegen T., Fiallos-Estrada C., Schmid W., Bravo R., and Zimmermann M. (1992) The transcription factor CREB, but not immediate-early gene encoded proteins, is expressed in activated microglia of lumbar spinal cord following sciatic nerve transection in the rat. *Neurosci Lett*. 142, 57-61.
- Herman J. P. and Arous N. D. (1994) Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog Neurobiol*. 44, 1-35.
- Hickey W. F. and Kimura H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*. 239, 290-292.
- Hickey W. F. and Kimura H. (1987) Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84, 2082-2086.
- Hickey W. F. (1991) Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol*. 1, 97-105.
- Hickey W. F. (1999) Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol*. 11, 125-137.
- Hickey W. F. (2000) P selectin, pioneer cells and the path to inflammation. *Brain*. 123 (Pt 6), 1073-1074.
- Hirji N., Lin T. J., Bissonnette E., Belosevic M., and Befus A. D. (1998) Mechanisms of macrophage stimulation through CD8: macrophage CD8alpha and CD8beta induce nitric oxide production and associated killing of the parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 160, 6004-6011.
- Hochwald G. M., Van Driel A., Robinson M. E., and Thorbecke G. J. (1988) Immune response in draining lymph nodes and spleen after intraventricular injection of antigen. *Int J Neurosci*. 39, 299-306.
- Hoek R. M., Ruuls S. R., Murphy C. A., Wright G. J., Goddard R., Zurawski S. M., Blom B., Homola M. E., Streit W. J., Brown M. H., Barclay A. N., and Sedgwick J. D. (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. 290, 1768-1771.

- Hoffer B. J., Hoffman A., Bowenkamp K., Huettl P., Hudson J., Martin D., Lin L. F., and Gerhardt G. A. (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett.* 182, 107-111.
- Hoglinger G. U., Widmer H. R., Spenger C., Meyer M., Seiler R. W., Oertel W. H., and Sautter J. (2001) 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.* 167, 148-157.
- Hohlfeld R., Kerschensteiner M., Stadelmann C., Lassmann H., and Wekerle H. (2000) The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 107, 161-166.
- Hollsberg P., Batra V., Dressel A., and Hafler D. A. (1996) Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen. *J Immunol.* 157, 5269-5276.
- Holzknacht Z. E. and Platt J. L. (1995) Identification of porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human xenoreactive natural antibodies. *J Immunol.* 154, 4565-4575.
- Honey C. R., Charlton H. M., and Wood K. J. (1991) Rat brain xenografts reverse hypogonadism in mice immunosuppressed with anti-CD4 monoclonal antibody. *Exp Brain Res.* 85, 149-152.
- Honey C. R., Clarke D. J., Dallman M. J., and Charlton H. M. (1990) Human neural graft function in rats treated with anti-interleukin II receptor antibody. *Neuroreport.* 1, 247-249.
- Honey C. R. and Shen H. (1999) Immunosuppression for neural xenografts : a comparison of cyclosporin and anti-CD25 monoclonal antibody. *J Neurosurg.* 91, 109-113.
- Hua L. L. and Lee S. C. (2000) Distinct patterns of stimulus-inducible chemokine mRNA accumulation in human fetal astrocytes and microglia. *Glia.* 30, 74-81.
- Huber J. D., Egleton R. D., and Davis T. P. (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 24, 719-725.
- Hudson J. L., Hoffman A., Stromberg I., Hoffer B. J., and Moorhead J. W. (1994) Allogeneic grafts of fetal dopamine neurons: behavioral indices of immunological interactions. *Neurosci Lett.* 171, 32-36.
- Huffaker T. K., Boss B. D., Morgan A. S., Neff N. T., Strecker R. E., Spence M. S., and Miao R. (1989) Xenografting of fetal pig ventral mesencephalon corrects motor asymmetry in the rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res.* 77, 329-336.

- Husemann J., Loike J. D., Anankov R., Febbraio M., and Silverstein S. C. (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*. 40, 195-205.
- Ibrahim M. A., Chain B. M., and Katz D. R. (1995) The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway. *Immunol Today*. 16, 181-186.
- Imamoto K. and Leblond C. P. (1977) Presence of labeled monocytes, macrophages and microglia in a stab wound of the brain following an injection of bone marrow cells labeled with 3H-uridine into rats. *J Comp Neurol*. 174, 255-279.
- Inaba K., Witmer-Pack M., Inaba M., Hathcock K. S., Sakuta H., Azuma M., Yagita H., Okumura K., Linsley P. S., Ikehara S., and et al. (1994) The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med*. 180, 1849-1860.
- Inoue H., Kohsaka S., Yoshida K., Otani M., Toya S., and Tsukada Y. (1985) Immunohistochemical studies on mouse cerebral cortex grafted into the third ventricle of rats treated with cyclosporin A. *Neurosci Lett*. 57, 289-294.
- Inverardi L., Clissi B., Stolzer A. L., Bender J. R., Sandrin M. S., and Pardi R. (1997) Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation*. 63, 1318-1330.
- Irani D. N., Lin K. I., and Griffin D. E. (1997) Regulation of brain-derived T cells during acute central nervous system inflammation. *J Immunol*. 158, 2318-2326.
- Irwin M., Hauger R., and Brown M. (1992) Central corticotropin-releasing hormone activates the sympathetic nervous system and reduces immune function: increased responsivity of the aged rat. *Endocrinology*. 131, 1047-1053.
- Isacson O., Deacon T. W., Pakzaban P., Galpern W. R., Dinsmore J., and Burns L. H. (1995) Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med*. 1, 1189-1194.
- Isacson O. and Deacon T. (1997) Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *Trends Neurosci*. 20, 477-482.
- Isacson O., van Horne C., Schumacher J. M., and Brownell A. L. (2001) Improved surgical cell therapy in Parkinson's disease. Physiological basis and new transplantation methodology. *Adv Neurol*. 86, 447-454.

- Issazadeh S., Ljungdahl A., Hojeberg B., Mustafa M., and Olsson T. (1995) Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolytic, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. *J Neuroimmunol.* 61, 205-212.
- Janabi N., Hau I., and Tardieu M. (1999) Negative feedback between prostaglandin and alpha- and beta-chemokine synthesis in human microglial cells and astrocytes. *J Immunol.* 162, 1701-1706.
- Jendroska K., Olasode B. J., Daniel S. E., Elliott L., Ogunniyi A. O., Aghadiuno P. U., Osuntokun B. O., and Lees A. J. (1994) Incidental Lewy body disease in black Africans. *Lancet.* 344, 882-883.
- Johansson M., Ellegren H., and Andersson L. (1995) Comparative mapping reveals extensive linkage conservation--but with gene order rearrangements--between the pig and the human genomes. *Genomics.* 25, 682-690.
- Johnson M. D., Gold L. I., and Moses H. L. (1992) Evidence for transforming growth factor-beta expression in human leptomeningeal cells and transforming growth factor-beta-like activity in human cerebrospinal fluid. *Lab Invest.* 67, 360-368.
- Johnson S. A., Pasinetti G. M., and Finch C. E. (1994) Expression of complement C1qB and C4 mRNAs during rat brain development. *Brain Res Dev Brain Res.* 80, 163-174.
- Joly E., Mucke L., and Oldstone M. B. (1991) Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science.* 253, 1283-1285.
- Juedes A. E., Hjelmstrom P., Bergman C. M., Neild A. L., and Ruddle N. H. (2000) Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 164, 419-426.
- Juedes A. E. and Ruddle N. H. (2001) Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 166, 5168-5175.
- Jurewicz A., Biddison W. E., and Antel J. P. (1998) MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol.* 160, 3056-3059.
- Kanellopoulos J. M., Wigglesworth N. M., Owen M. J., and Crumpton M. J. (1983) Biosynthesis and molecular nature of the T3 antigen of human T lymphocytes. *Embo J.* 2, 1807-1814.

- Karlsson-Parra A., Ridderstad A., Wallgren A. C., Moller E., Ljunggren H. G., and Korsgren O. (1996) Xenograft rejection of porcine islet-like cell clusters in normal and natural killer cell-depleted mice. *Transplantation*. 61, 1313-1320.
- Kawai T., Seki M., Hiromatsu K., Eastcott J. W., Watts G. F., Sugai M., Smith D. J., Porcelli S. A., and Taubman M. A. (1999) Selective diapedesis of Th1 cells induced by endothelial cell RANTES. *J Immunol*. 163, 3269-3278.
- Kawamoto J. C. and Barrett J. N. (1986) Cryopreservation of primary neurons for tissue culture. *Brain Res*. 384, 84-93.
- Kennedy K. J., Strieter R. M., Kunkel S. L., Lukacs N. W., and Karpus W. J. (1998) Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol*. 92, 98-108.
- Kennedy M. K., Torrance D. S., Picha K. S., and Mohler K. M. (1992) Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol*. 149, 2496-2505.
- Kerfoot S. M. and Kubes P. (2002) Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 169, 1000-1006.
- Kida S., Weller R. O., Zhang E. T., Phillips M. J., and Iannotti F. (1995) Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 21, 181-184.
- Kiefer R., Streit W. J., Toyka K. V., Kreutzberg G. W., and Hartung H. P. (1995) Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int J Dev Neurosci*. 13, 331-339.
- Kim J. H., Auerbach J. M., Rodriguez-Gomez J. A., Velasco I., Gavin D., Lumelsky N., Lee S. H., Nguyen J., Sanchez-Pernate R., Bankiewicz K., and McKay R. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 418, 50-56.
- Kitada T., Asakawa S., Matsumine H., Hattori N., Shimura H., Minoshima S., Shimizu N., and Mizuno Y. (2000) Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism. *Neurogenetics*. 2, 207-218.

- Kloss C. U., Werner A., Klein M. A., Shen J., Menuz K., Probst J. C., Kreutzberg G. W., and Raivich G. (1999) Integrin family of cell adhesion molecules in the injured brain: regulation and cellular localization in the normal and regenerating mouse facial motor nucleus. *J Comp Neurol.* 411, 162-178.
- Klyushnenkova E. N. and Vanguri P. (1997) Ia expression and antigen presentation by glia: strain and cell type-specific differences among rat astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol.* 79, 190-201.
- Knopf P. M., Harling-Berg C. J., Cserr H. F., Basu D., Sirulnick E. J., Nolan S. C., Park J. T., Keir G., Thompson E. J., and Hickey W. F. (1998) Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol.* 161, 692-701.
- Kogure K., Yamasaki Y., Matsuo Y., Kato H., and Onodera H. (1996) Inflammation of the brain after ischemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 66, 40-43.
- Kogure K., Tanuma N., Teramoto A., and Matsumoto Y. (1998) Quantitative analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in neural graft rejection. *J Neuroimmunol.* 87, 114-120.
- Konno H., Yamamoto T., Iwasaki Y., Suzuki H., Saito T., and Terunuma H. (1989) Wallerian degeneration induces Ia-antigen expression in the rat brain. *J Neuroimmunol.* 25, 151-159.
- Kordower J. H., Emborg M. E., Bloch J., Ma S. Y., Chu Y., Leventhal L., McBride J., Chen E. Y., Palfi S., Roitberg B. Z., Brown W. D., Holden J. E., Pyzalski R., Taylor M. D., Carvey P., Ling Z., Trono D., Hantraye P., Deglon N., and Aebischer P. (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science.* 290, 767-773.
- Kordower J. H., Freeman T. B., Snow B. J., Vingerhoets F. J., Mufson E. J., Sanberg P. R., Hauser R. A., Smith D. A., Nauert G. M., Perl D. P., and et al. (1995) 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.* 332, 1118-1124.
- Kordower J. H., Freeman T. B., Chen E. Y., Mufson E. J., Sanberg P. R., Hauser R. A., Snow B., and Olanow C. W. (1998) Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 13, 383-393.
- Korsgren O. (1997) Acute cellular xenograft rejection. *Xenotransplantation.* 4, 11:19.
- Krack P., Poepping M., Weinert D., Schrader B., and Deuschl G. (2000) Thalamic, pallidal, or subthalamic surgery for Parkinson's disease? *J Neurol.* 247 Suppl 2, II122-134.

- Krakovski M. L. and Owens T. (2000) Naive T lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. *Eur J Immunol.* 30, 1002-1009.
- Kreutzberg G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318.
- Krishnaswamy G., Kelley J., Yerra L., Smith J. K., and Chi D. S. (1999) Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res.* 19, 91-104.
- Krum J. M. and Rosenstein J. M. (1988) Patterns of angiogenesis in neural transplant models: II. Fetal neocortical transplants. *J Comp Neurol.* 271, 331-345.
- Lafont F. and Prochiantz A. (1994) Region-specific neuroastroglial interactions in neuronal morphogenesis and polarity: from homeogenic induction to cellular cytomorphogenesis. *Perspect Dev Neurobiol.* 2, 259-268.
- Lang A. E. and Lozano A. M. (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med.* 339, 1044-1053.
- Lang A. E. and Lozano A. M. (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med.* 339, 1130-1143.
- Langosch J. M., Gebicke-Haerter P. J., Norenberg W., and Illes P. (1994) Characterization and transduction mechanisms of purinoceptors in activated rat microglia. *Br J Pharmacol.* 113, 29-34.
- Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., and Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219, 979-980.
- Langston J. W., Widner H., Goetz C. G., Brooks D., Fahn S., Freeman T., and Watts R. (1992) Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Mov Disord.* 7, 2-13.
- Lannes-Viera J., Goudable B., Drexler K., Gehrmann J., Torres-Nagel N., Hunig T., and Wekerle H. (1995) Encephalitogenic, myelin basic protein-specific T cells from naive rat thymus: preferential use of the T cell receptor gene V beta 8.2 and expression of the CD4-CD8-phenotype. *Eur J Immunol.* 25, 611-616.
- Lanzavecchia A., Lezzi G., and Viola A. (1999) From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell.* 96, 1-4.
- Larsson L. C., Czech K. A., Widner H., and Korsgren O. (1999a) Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. *Transplantation.* 68, 1153-1160.

- Larsson L. C., Duan W. M., and Widner H. (1999b) Discordant xenografts: different outcome after mouse and rat neural tissue transplantation to guinea-pigs. *Brain Res Bull.* 49, 367-376.
- Larsson L. C., Czech K. A., Brundin P., and Widner H. (2000) Intrastratial ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. *Cell Transplant.* 9, 261-272.
- Larsson L. C., Anderson P., Widner H., and Korsgren O. (2001a) Enhanced survival of porcine neural xenografts in mice lacking CD1d1, but no effect of NK1.1 depletion. *Cell Transplant.* 10, 295-304.
- Larsson L. C., Frielingsdorf H., Mirza B., Hansson S. J., Anderson P., Czech K. A., Strandberg M., and Widner H. (2001b) Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp Neurol.* 172, 100-114.
- Larsson L. C., Corbascio M., Widner H., Pearson T. C., Larsen C. P., and Ekberg H. (2002) Simultaneous inhibition of B7 and LFA-1 signaling prevents rejection of discordant neural xenografts in mice lacking CD40L. *Xenotransplantation.* 9, 68-76.
- Lassmann H., Rossler K., Zimprich F., and Vass K. (1991) Expression of adhesion molecules and histocompatibility antigens at the blood-brain barrier. *Brain Pathol.* 1, 115-123.
- Lassmann H., Schmied M., Vass K., and Hickey W. F. (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia.* 7, 19-24.
- Launois P., Maillard I., Pingel S., Swihart K. G., Xenarios I., Acha-Orbea H., Diggelmann H., Locksley R. M., MacDonald H. R., and Louis J. A. (1997) IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity.* 6, 541-549.
- Lawrence M. B. and Springer T. A. (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 65, 859-873.
- Lawson L. J., Perry V. H., Dri P., and Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 39, 151-170.
- Lawson L. J., Perry V. H., and Gordon S. (1993) Microglial responses to physiological change: osmotic stress elevates DNA synthesis of neurohypophyseal microglia. *Neuroscience.* 56, 929-938.
- Lee S. C., Collins M., Vanguri P., and Shin M. L. (1992) Glutamate differentially inhibits the expression of class II MHC antigens on astrocytes and microglia. *J Immunol.* 148, 3391-3397.

- Lee S. J. and Benveniste E. N. (1999) Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 98, 77-88.
- Lee S. J., Zhou T., Choi C., Wang Z., and Benveniste E. N. (2000) Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J Immunol.* 164, 1277-1285.
- Lehmann P. V., Forsthuber T., Miller A. and Sercarz E. E. (1992) Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature.* 358, 155-157.
- Lehmann P. V. (1998) The fate of T cells in the brain: veni, vidi, vici and veni, mori. *Am J Pathol.* 153, 677-680.
- Lehmann P. V., Targoni O. S., and Forsthuber T.G. (1998) Shifting T-cell activation thresholds in autoimmunity and determinant spreading. *Immunol Rev.* 164, 53-61.
- Lehnert A. M., Mottram P. L., Han W., Walters S. N., Patel A. T., Hawthorne W. J., Cowan P. J., d'Apice A. J., and O'Connell P. J. (2001) Blockade of the CD28 and CD40 pathways result in the acceptance of pig and rat islet xenografts but not rat cardiac grafts in mice. *Transpl Immunol.* 9, 51-56.
- Levi-Strauss M. and Mallat M. (1987) Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation. *J Immunol.* 139, 2361-2366.
- Li T. S., Hamano K., Kajiwara K., Nishida M., Zempo N., and Esato K. (2001) Prolonged survival of xenograft fetal cardiomyocytes by adenovirus-mediated CTLA4-Ig expression. *Transplantation.* 72, 1983-1985.
- Li X. C., Wells A. D., Strom T. B., and Turka L. A. (2000) The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol.* 12, 522-527.
- Lieb K., Fiebich B. L., Busse-Grawitz M., Hull M., Berger M., and Bauer J. (1996) Effects of substance P and selected other neuropeptides on the synthesis of interleukin-1 beta and interleukin-6 in human monocytes: a re-examination. *J Neuroimmunol.* 67, 77-81.
- Liew F. Y. (2002) T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol.* 2, 55-60.
- Limousin P., Krack P., Pollak P., Benazzouz A., Ardouin C., Hoffmann D., and Benabid A. L. (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 339, 1105-1111.
- Lin X., Pease L. R., Murray P. D., and Rodriguez M. (1998) Theiler's virus infection of genetically susceptible mice induces central nervous system-infiltrating CTLs with no apparent viral or major myelin antigenic specificity. *J Immunol.* 160, 5661-5668.

- Lindsey J. W. and Jin R. (2000) Immune regulatory effects of central nervous system antigens in culture. *Int Immunol.* 12, 1605-1612.
- Lindvall O., Rehnström S., Brundin P., Gustavii B., Astedt B., Widner H., Lindholm T., Bjorklund A., Leenders K. L., Rothwell J. C., and et al. (1989) Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol.* 46, 615-631.
- Lindvall O., Brundin P., Widner H., Rehnström S., Gustavii B., Frackowiak R., Leenders K. L., Sawle G., Rothwell J. C., Marsden C. D., and et al. (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science.* 247, 574-577.
- Linsley P. S., Clark E. A., and Ledbetter J. A. (1990) T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 5031-5035.
- Linsley P. S., Wallace P. M., Johnson J., Gibson M. G., Greene J. L., Ledbetter J. A., Singh C., and Tepper M. A. (1992) Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science.* 257, 792-795.
- Lodge P. A. and Sriram S. (1996) Regulation of microglial activation by TGF-beta, IL-10, and CSF-1. *J Leukoc Biol.* 60, 502-508.
- Lotan M. and Schwartz M. (1994) Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *Faseb J.* 8, 1026-1033.
- Lotharius J. and Brundin P. (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci.* 3, 932-942.
- Lou Y. H., Park K. K., Agersborg S., Alard P., and Tung K. S. (2000) Retargeting T cell-mediated inflammation: a new perspective on autoantibody action. *J Immunol.* 164, 5251-5257.
- Lowenstein P. R. (2002) Dendritic cells and immune responses in the central nervous system. *Trends Immunol.* 23, 70.
- Luquin M. R., Montoro R. J., Guillen J., Saldise L., Insausti R., Del Rio J., and Lopez-Barneo J. (1999) Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron.* 22, 743-750.
- Lutz M. B., Rovere P., Kleijmeer M. J., Rescigno M., Assmann C. U., Oorschot V. M., Geuze H. J., Trucy J., Demandolx D., Davoust J., and Ricciardi-Castagnoli P. (1997) Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells. *J Immunol.* 159, 3707-3716.

- Maciejewski-Lenoir D., Chen S., Feng L., Maki R., and Bacon K. B. (1999) Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol.* 163, 1628-1635.
- MacPherson G. G., Jenkins C. D., Stein M. J., and Edwards C. (1995) Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol.* 154, 1317-1322.
- Mahalik T. J., Finger T. E., Stromberg I., and Olson L. (1985) Substantia nigra transplants into denervated striatum of the rat: ultrastructure of graft and host interconnections. *J Comp Neurol.* 240, 60-70.
- Male D., Pryce G., and Rahman J. (1990) Comparison of the immunological properties of rat cerebral and aortic endothelium. *J Neuroimmunol.* 30, 161-168.
- Mallat M., Houlgatte R., Brachet P., and Prochiantz A. (1989) Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev Biol.* 133, 309-311.
- Manilay J. O. and Sykes M. (1998) Natural killer cells and their role in graft rejection. *Curr Opin Immunol.* 10, 532-538.
- Marfaing-Koka A., Devergne O., Gorgone G., Portier A., Schall T. J., Galanaud P., and Emilie D. (1995) Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 154, 1870-1878.
- Marshall E. (2000) Fetal tissue research. Antiabortion groups target neuroscience study at Nebraska. *Science.* 287, 202-203.
- Mason D. W., Charlton H. M., Jones A. J., Lavy C. B., Puklavec M., and Simmonds S. J. (1986) The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience.* 19, 685-694.
- Massa P. T., Ozato K., and McFarlin D. E. (1993) Cell type-specific regulation of major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons. *Glia.* 8, 201-207.
- 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., and Kodama T. (1996) Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 3269-3274.

- Matsumoto Y., Ohmori K., and Fujiwara M. (1992) 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*. 76, 209-216.
- Matsuo Y., Onodera H., Shiga Y., Shozuhara H., Ninomiya M., Kihara T., Tamatani T., Miyasaka M., and Kogure K. (1994) Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res*. 656, 344-352.
- Matsuura K., Makino H., and Ogawa N. (1997) Cyclosporin A attenuates the decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity in nigrostriatal dopaminergic neurons and in striatal dopamine content in rats with intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Exp Neurol*. 146, 526-535.
- Matyszak M. K., Lawson L. J., Perry V. H., and Gordon S. (1992) Stromal macrophages of the choroid plexus situated at an interface between the brain and peripheral immune system constitutively express major histocompatibility class II antigens. *J Neuroimmunol*. 40, 173-181.
- Matyszak M. K. and Perry V. H. (1995) Demyelination in the central nervous system following a delayed-type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guerin. *Neuroscience*. 64, 967-977.
- Matyszak M. K. and Perry V. H. (1996) The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*. 74, 599-608.
- Matyszak M. K. (1998) Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. *Prog Neurobiol*. 56, 19-35.
- McEver R. P. (1994) Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann N Y Acad Sci*. 714, 185-189.
- McGeer P. L., Itagaki S., Akiyama H., and McGeer E. G. (1988) Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol*. 24, 574-576.
- McGrath J., Lintz E., Hoffer B. J., Gerhardt G. A., Quintero E. M., and Granholm A. C. (2002) Adeno-associated viral delivery of GDNF promotes recovery of dopaminergic phenotype following a unilateral 6-hydroxydopamine lesion. *Cell Transplant*. 11, 215-227.
- McMenamin P. G. (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol*. 405, 553-562.
- McRae B. L., Vanderlugt C. L., Dal Canto M. C., and Miller S. D. (1995) Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 182, 75-85.

- McTigue D. M., Tani M., Krivacic K., Chernosky A., Kelner G. S., Maciejewski D., Maki R., Ransohoff R. M., and Stokes B. T. (1998) Selective chemokine mRNA accumulation in the rat spinal cord after contusion injury. *J Neurosci Res.* 53, 368-376.
- Menei P., Pean J. M., Nerriere-Daguin V., Jollivet C., Brachet P., and Benoit J. P. (2000) Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage. *Exp Neurol.* 161, 259-272.
- Miller S. D., McRae B. L., Vanderlugt C. L., Nikcevich K. M., Pope J. G., Pope L., and Karpus W. J. (1995) Evolution of the T-cell repertoire during the course of experimental immune-mediated demyelinating diseases. *Immunol Rev.* 144, 225-244.
- Milner R. and Campbell I. L. (2002) The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res.* 69, 286-291.
- Moller T., Hanisch U. K., and Ransom B. R. (2000) Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem.* 75, 1539-1547.
- Moller T., Nolte C., Burger R., Verkhratsky A., and Kettenmann H. (1997) Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced [Ca²⁺]_i signaling in mouse microglia. *J Neurosci.* 17, 615-624.
- Montero-Menei C. N., Sindji L., Pouplard-Barthelaix A., Jehan F., Denechaud L., and Darcy F. (1994) Lipopolysaccharide intracerebral administration induces minimal inflammatory reaction in rat brain. *Brain Res.* 653, 101-111.
- Mor G., Gutierrez L. S., Eliza M., Kahyaoglu F., and Arici A. (1998) Fas-fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am J Reprod Immunol.* 40, 89-94.
- Morgan B. P. (2000) The complement system: an overview. *Methods Mol Biol.* 150, 1-13.
- Morioka T., Baba T., Black K. L., and Streit W. J. (1992) Immunophenotypic analysis of infiltrating leukocytes and microglia in an experimental rat glioma. *Acta Neuropathol (Berl).* 83, 590-597.
- Mosmann T. R. and Coffman R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7, 145-173.
- Murphy E., Shibuya K., Hosken N., Openshaw P., Maino V., Davis K., Murphy K., and O'Garra A. (1996) Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med.* 183, 901-913.

- Nakao N., Frodl E. M., Duan W. M., Widner H., and Brundin P. (1994) Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 12408-12412.
- Nakao N., Frodl E. M., Widner H., Carlson E., Eggerding F. A., Epstein C. J., and Brundin P. (1995) Overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase enhances survival of transplanted neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Nat Med.* 1, 226-231.
- Nataf S., Stahel P. F., Davoust N., and Barnum S. R. (1999) Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci.* 22, 397-402.
- Neumann H., Cavalie A., Jenne D. E., and Wekerle H. (1995) Induction of MHC class I genes in neurons. *Science.* 269, 549-552.
- Neumann H., Boucraut J., Hahnel C., Misgeld T., and Wekerle H. (1996) Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci.* 8, 2582-2590.
- Neumann H., Schmidt H., Cavalie A., Jenne D., and Wekerle H. (1997) 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.* 185, 305-316.
- Neumann H. and Wekerle H. (1998) Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57, 1-9.
- Neumann H. (2000) The immunological microenvironment in the CNS: implications on neuronal cell death and survival. *J Neural Transm Suppl.* 59, 59-68.
- Neumann H. (2001) Control of glial immune function by neurons. *Glia.* 36, 191-199.
- Neumann H., Medana I. M., Bauer J., and Lassmann H. (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 25, 313-319.
- Nguyen V. T. and Benveniste E. N. (2002) Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem.* 277, 13796-13803.
- Ni H. T., Merica R. R., Spellman S. R., Wang J. M., and Low W. C. (2000) Visualization of antigen-specific T cell activation in vivo in response to intracerebral administration of a xenopeptide. *Exp Neurol.* 164, 362-370.
- Nicholson C. and Sykova E. (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 21, 207-215.

- Nikkhah G., Cunningham M. G., Jodicke A., Knappe U., and Bjorklund A. (1994) Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 633, 133-143.
- Nishiyori A., Minami M., Ohtani Y., Takami S., Yamamoto J., Kawaguchi N., Kume T., Akaike A., and Satoh M. (1998) Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett.* 429, 167-172.
- Noble A., Thomas M. J., and Kemeny D. M. (2001) Early Th1/Th2 cell polarization in the absence of IL-4 and IL-12: T cell receptor signaling regulates the response to cytokines in CD4 and CD8 T cells. *Eur J Immunol.* 31, 2227-2235.
- Norenberg M. D. (1994) Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53, 213-220.
- O'Garra A. (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8, 275-283.
- Oh J. W., Schwiebert L. M., and Benveniste E. N. (1999) Cytokine regulation of CC and CXC chemokine expression by human astrocytes. *J Neurovirol.* 5, 82-94.
- Okamoto Y., Yamashita J., Hasegawa M., Fujisawa H., Yamashita T., Hashimoto T., Nonomura A., Matsumoto Y., and Kida S. (1999) Cervical lymph nodes play the role of regional lymph nodes in brain tumour immunity in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 25, 113-122.
- Okura Y., Tanaka R., Ono K., Yoshida S., Tanuma N., and Matsumoto Y. (1997) Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation: tolerance induction by anti-T-cell antibodies. *J Neurosci Res.* 48, 385-396.
- Olanow C. W., Freeman T., and Kordower J. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 345, 146; author reply 147.
- Omari K. I. and Dorovini-Zis K. (1999) Expression and function of lymphocyte function associated antigen-3 (LFA-3) at the blood-brain barrier. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 45, 25-35.
- Oriol R., Ye Y., Koren E., and Cooper D. K. (1993) Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation.* 56, 1433-1442.
- Owens T., Renno T., Taupin V., and Krakowski M. (1994) Inflammatory cytokines in the brain: does the CNS shape immune responses? *Immunol Today.* 15, 566-571.
- Pakzaban P. and Isacson O. (1994) Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience.* 62, 989-1001.

- Pakzaban P., Deacon T. W., Burns L. H., Dinsmore J., and Isacson O. (1995) 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*. 65, 983-996.
- Pan Y., Lloyd C., Zhou H., Dolich S., Deeds J., Gonzalo J. A., Vath J., Gosselin M., Ma J., Dussault B., Woolf E., Alperin G., Culpepper J., Gutierrez-Ramos J. C., and Gearing D. (1997) Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*. 387, 611-617.
- Pannetier C., Even J., and Kourilsky P. (1995) T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today*. 16, 176-181.
- Paradis K., Langford G., Long Z., Heneine W., Sandstrom P., Switzer W. M., Chapman L. E., Lockey C., Onions D., and Otto E. (1999) Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*. 285, 1236-1241.
- Paresce D. M., Ghosh R. N., and Maxfield F. R. (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*. 17, 553-565.
- Pashenkov M., Teleshova N., and Link H. (2003) Inflammation in the central nervous system: the role for dendritic cells. *Brain Pathol*. 13, 23-33.
- Paul W. E. and Seder R. A. (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76, 241-251.
- Pawlikowski M., Zelazowski P., Stepień H., and Schally A. V. (1987) Somatostatin and its analog enhance the formation of human leukocyte migration inhibiting factor: further evidence for immunomodulatory action of somatostatin. *Peptides*. 8, 951-952.
- Pedersen E. B., Poulsen F. R., Zimmer J., and Finsen B. (1995) Prevention of mouse-rat brain xenograft rejection by a combination therapy of cyclosporin A, prednisolone and azathioprine. *Exp Brain Res*. 106, 181-186.
- Pedersen E. B. and Widner H. (2000) Xenotransplantation. *Prog Brain Res*. 127, 157-188.
- Pedersen E. B., Zimmer J., and Finsen B. (1997) Triple immunosuppression protects murine intracerebral, hippocampal xenografts in adult rat hosts: effects on cellular infiltration, major histocompatibility complex antigen induction and blood-brain barrier leakage. *Neuroscience*. 78, 685-701.
- Pender M. P., McCombe P. A., Yoong G., and Nguyen K. B. (1992) Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J Autoimmun*. 5, 401-410.

- Pender M. P. and Rist M. J. (2001) Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia*. 36, 137-144.
- Pennell N. A. and Streit W. J. (1997) Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization. *Cell Transplant*. 6, 221-230.
- Peress N. S., Fleit H. B., Perillo E., Kuljis R., and Pezzullo C. (1993) Identification of Fc gamma RI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 48, 71-79.
- Perlow M. J., Freed W. J., Hoffer B. J., Seiger A., Olson L., and Wyatt R. J. (1979) Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*. 204, 643-647.
- Perry V. H., Crocker P. R., and Gordon S. (1992) The blood-brain barrier regulates the expression of a macrophage sialic acid-binding receptor on microglia. *J Cell Sci*. 101 (Pt 1), 201-207.
- Perry V. H. and Gordon S. (1987) Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J Exp Med*. 166, 1138-1143.
- Perry V. H., Hume D. A., and Gordon S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*. 15, 313-326.
- Perry V. H., Matyszak M. K., and Fearn S. (1993) Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*. 7, 60-67.
- Peschanski M., Defer G., N'Guyen J. P., Ricolfi F., Monfort J. C., Remy P., Geny C., Samson Y., Hantraye P., Jeny R., and et al. (1994) Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain*. 117 (Pt 3), 487-499.
- Petersen A., Hansson O., Emgard M., and Brundin P. (2000) Grafting of nigral tissue hibernated with tirilazad mesylate and glial cell line-derived neurotrophic factor. *Cell Transplant*. 9, 577-584.
- Phillips M. J., Needham M., and Weller R. O. (1997) Role of cervical lymph nodes in autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Pathol*. 182, 457-464.
- Phillips L. M. and Lampson L. A. (1999) Site specific of T cell traffic in the brain : T cell entry in brainstem vs. Hippocampus after local injection of IFN-gamma. *J Neuroimmunol*. 96, 218-227.
- Piccini P., Brooks D. J., Bjorklund A., Gunn R. N., Grasby P. M., Rimoldi O., Brundin P., Hagell P., Rehncrona S., Widner H., and Lindvall O. (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*. 2, 1137-1140.

- Piccini P., Lindvall O., Bjorklund A., Brundin P., Hagell P., Ceravolo R., Oertel W., Quinn N., Samuel M., Rehncrona S., Widner H., and Brooks D. J. (2000) Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol.* 48, 689-695.
- Platt N., Suzuki H., Kurihara Y., Kodama T., and Gordon S. (1996) Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 12456-12460.
- Poltorak M. and Freed W. J. (1991) BN rats do not reject F344 brain allografts even after systemic sensitization. *Ann Neurol.* 29, 377-388.
- Postigo A. A., Marazuela M., Sanchez-Madrid F., and de Landazuri M. O. (1994) B lymphocyte binding to E- and P-selectins is mediated through the de novo expression of carbohydrates on in vitro and in vivo activated human B cells. *J Clin Invest.* 94, 1585-1596.
- Potter E. D., Ling Z. D., and Carvey P. M. (1999) Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res.* 296, 235-246.
- Prat A., Biernacki K., Becher B., and Antel J. P. (2000) B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59, 129-136.
- Pratt J. R., Hibbs M. J., Laver A. J., Smith R. A., and Sacks S. H. (1996) Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol.* 149, 2055-2066.
- Priller J., Haas C. A., Reddington M., and Kreutzberg G. W. (1995) Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia.* 15, 447-457.
- Prineas J. W. (1979) Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science.* 203, 1123-1125.
- Prinz M. and Hanisch U. K. (1999) Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem.* 72, 2215-2218.
- Pryce G., Male D., Campbell I., and Greenwood J. (1997) Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro. *J Neuroimmunol.* 75, 84-94.
- Pryce G., Male D., and Sedgwick J. (1989) Antigen presentation in brain: brain endothelial cells are poor stimulators of T-cell proliferation. *Immunology.* 66, 207-212.

- Qian D. and Weiss A. (1997) T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 205-212.
- Quinonero J., Tchelingirian J. L., Vignais L., Foignant-Chaverot N., Colin C., Horellou P., Liblau R., Barbin G., Strosberg A. D., Jacque C., and Couraud P. O. (1997) Gene transfer to the central nervous system by transplantation of cerebral endothelial cells. *Gene Ther.* 4, 111-119.
- Raine C. S., Cannella B., Duijvestijn A. M., and Cross A. H. (1990) Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Lab Invest.* 63, 476-489.
- Randolph G. J., Inaba K., Robbiani D. F., Steinman R. M., and Muller W. A. (1999) Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 11, 753-761.
- Ransohoff R. M., Hamilton T. A., Tani M., Stoler M. H., Shick H. E., Major J. A., Estes M. L., Thomas D. M., and Tuohy V. K. (1993) Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Faseb J.* 7, 592-600.
- Rao K. and Lund R. D. (1989) Degeneration of optic axons induces the expression of major histocompatibility antigens. *Brain Res.* 488, 332-335.
- Rascol O., Brooks D. J., Korczyn A. D., De Deyn P. P., Clarke C. E., and Lang A. E. (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med.* 342, 1484-1491.
- Redmond D. E., Jr., Sladek J. R., and Spencer D. D. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 345, 146-147.
- Redwine J. M., Buchmeier M. J., and Evans C. F. (2001) In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. *Am J Pathol.* 159, 1219-1224.
- Reichmann G., Schroeter M., Jander S., and Fischer H. G. (2002) Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *J Neuroimmunol.* 129, 125-132.
- Reiner S. L. and Locksley R. M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 13, 151-177.
- Remy P., Samson Y., Hantraye P., Fontaine A., Defer G., Mangin J. F., Fenelon G., Geny C., Ricolfi F., Frouin V., and et al. (1995) Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients. *Ann Neurol.* 38, 580-588.

- Rettenberger G., Klett C., Zechner U., Kunz J., Vogel W., and Hameister H. (1995) Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics*. 26, 372-378.
- Roake J. A., Rao A. S., Morris P. J., Larsen C. P., Hankins D. F., and Austyn J. M. (1995) Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med*. 181, 2237-2247.
- Robinson S. R., Hampson E. C., Munro M. N., and Vaney D. I. (1993) Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science*. 262, 1072-1074.
- Rock E. P., Sibbald P. R., Davis M. M., and Chien Y. H. (1994) CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med*. 179, 323-328.
- Rogers J., Webster S., Lue L. F., Brachova L., Civin W. H., Emmerling M., Shivers B., Walker D., and McGeer P. (1996) Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging*. 17, 681-686.
- Rollins B. J., Yoshimura T., Leonard E. J., and Pober J. S. (1990) Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol*. 136, 1229-1233.
- Rosenblad C., Martinez-Serrano A., and Bjorklund A. (1998) Intrastratial glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 82, 129-137.
- Rosenblad C., Kirik D., and Bjorklund A. (1999a) Neurturin enhances the survival of intrastratial fetal dopaminergic transplants. *Neuroreport*. 10, 1783-1787.
- Rosenblad C., Kirik D., Devaux B., Moffat B., Phillips H. S., and Bjorklund A. (1999b) 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*. 11, 1554-1566.
- Rosenblad C., Gronborg M., Hansen C., Blom N., Meyer M., Johansen J., Dago L., Kirik D., Patel U. A., Lundberg C., Trono D., Bjorklund A., and Johansen T. E. (2000) In vivo protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-family member neublastin/artemin. *Mol Cell Neurosci*. 15, 199-214.
- Rosler K., Neuchrist C., Kitz K., Scheiner O., Kraft D., and Lassmann H. (1992) Expression of leucocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier (BBB). *J Neurosci Res*. 31, 365-374.

- Rostaing-Rigattieri S., Flores-Guevara R., Peschanski M., and Cadusseau J. (1997) Glial and endothelial cell response to a fetal transplant of purified neurons. *Neuroscience*. 79, 723-734.
- Rothstein J. D., Jin L., Dykes-Hoberg M., and Kuncl R. W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90, 6591-6595.
- Royo N. C., Wahl F., and Stutzmann J. M. (1999) Kinetics of polymorphonuclear neutrophil infiltration after a traumatic brain injury in rat. *Neuroreport*. 10, 1363-1367.
- Rusakov D. A. and Kullmann D. M. (1998) A tortuous and viscous route to understanding diffusion in the brain. *Trends Neurosci*. 21, 469-470.
- Saadi S. and Platt J. L. (1999) Role of complement in xenotransplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 26, 1016-1019.
- Saas P., Walker P. R., Hahne M., Quiquerez A. L., Schnuriger V., Perrin G., French L., Van Meir E. G., de Tribolet N., Tschopp J., and Dietrich P. Y. (1997) Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest*. 99, 1173-1178.
- Sachs C. and Jonsson G. (1975) Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol*. 24, 1-8.
- Sakai K., Date I., Yoshimoto Y., Arisawa T., Nakashima H., Furuta T., Asari S., and Ohmoto T. (1991) The effect of a new immunosuppressive agent, FK-506, on xenogeneic neural transplantation in rodents. *Brain Res*. 565, 167-170.
- Sanberg P. R., Borlongan C. V., Othberg A. I., Saporta S., Freeman T. B., and Cameron D. F. (1997) Testis-derived Sertoli cells have a trophic effect on dopamine neurons and alleviate hemiparkinsonism in rats. *Nat Med*. 3, 1129-1132.
- Sanberg P. R., Borlongan C. V., Saporta S., and Cameron D. F. (1996) Testis-derived Sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain. *Nat Biotechnol*. 14, 1692-1695.
- Santambrogio L., Belyanskaya S. L., Fischer F. R., Cipriani B., Brosnan C. F., Ricciardi-Castagnoli P., Stern L. J., Strominger J. L., and Riese R. (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 6295-6300.
- Saoudi A., Simmonds S., Huitinga I., and Mason D. (1995) Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. *J Exp Med*. 182, 335-344.

- Satoh J., Kim S. U., Kastrukoff L. F., and Takei F. (1991) Expression and induction of intercellular adhesion molecules (ICAMs) and major histocompatibility complex (MHC) antigens on cultured murine oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res.* 29, 1-12.
- Sawle G. V., Bloomfield P. M., Bjorklund A., Brooks D. J., Brundin P., Leenders K. L., Lindvall O., Marsden C. D., Rehncrona S., Widner H., and et al. (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET [18F]6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol.* 31, 166-173.
- Schapira A. H. (1999) Science, medicine, and the future: Parkinson's disease. *Bmj.* 318, 311-314.
- Schierle G. S., Hansson O., Leist M., Nicotera P., Widner H., and Brundin P. (1999) Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med.* 5, 97-100.
- Schmid C. D., Sautkulis L. N., Danielson P. E., Cooper J., Hasel K. W., Hilbush B. S., Sutcliffe J. G., and Carson M. J. (2002) Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J Neurochem.* 83, 1309-1320.
- Schmidt R. H., Ingvar M., Lindvall O., Stenevi U., and Bjorklund A. (1982) Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum: neurotransmitter metabolism and [14C]2-deoxy-D-glucose autoradiography. *J Neurochem.* 38, 737-748.
- Schroeter M., Jander S., Huitinga I., and Stoll G. (2001) CD8+ phagocytes in focal ischemia of the rat brain: predominant origin from hematogenous macrophages and targeting to areas of pannecrosis. *Acta Neuropathol (Berl).* 101, 440-448.
- Schumacher J. M., Ellias S. A., Palmer E. P., Kott H. S., Dinsmore J., Dempsey P. K., Fischman A. J., Thomas C., Feldman R. G., Kassissieh S., Raineri R., Manhart C., Penney D., Fink J. S., and Isacson O. (2000) Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology.* 54, 1042-1050.
- Schwartz M., Cohen I., Lazarov-Spiegler O., Moalem G., and Yoles E. (1999a) The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair. *J Mol Med.* 77, 713-717.
- Schwartz M., Moalem G., Leibowitz-Amit R., and Cohen I. R. (1999b) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci.* 22, 295-299.
- Schwartz M. and Cohen I. R. (2000) Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today.* 21, 265-268.
- Sebille F., Gagne K., Guillet M., Degauque N., Pallier A., Brouard S., Vanhove B., Delsuc M. A., and Soullillou J. P. (2001) Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells

- mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J Immunol.* 167, 3082-3088.
- Sedgwick J. D., Mossner R., Schwender S., and ter Meulen V. (1991a) Major histocompatibility complex-expressing nonhematopoietic astroglial cells prime only CD8+ T lymphocytes: astroglial cells as perpetuators but not initiators of CD4+ T cell responses in the central nervous system. *J Exp Med.* 173, 1235-1246.
- Sedgwick J. D., Schwender S., Imrich H., Dorries R., Butcher G. W., and ter Meulen V. (1991b) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 7438-7442.
- Selmaj K. (1996) Pathophysiology of the blood-brain barrier. *Springer Semin Immunopathol.* 18, 57-73.
- Selvan R. S., Kapadia H. B., and Platt J. L. (1998) Complement-induced expression of chemokine genes in endothelium: regulation by IL-1-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 161, 4388-4395.
- Semchuk K. M., Love E. J., and Lee R. G. (1992) Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology.* 42, 1328-1335.
- Serafini B., Columba-Cabezas S., Di Rosa F., and Aloisi F. (2000) Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 157, 1991-2002.
- Serot J. M., Foliguet B., Bene M. C., and Faure G. C. (1997) Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *Neuroreport.* 8, 1995-1998.
- Shimizu Y., Newman W., Tanaka Y., and Shaw S. (1992) Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today.* 13, 106-112.
- Shimojo M., Nakajima K., Takei N., Hamanoue M., and Kohsaka S. (1991) Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett.* 123, 229-231.
- Sica A., Wang J. M., Colotta F., Dejana E., Mantovani A., Oppenheim J. J., Larsen C. G., Zachariae C. O., and Matsushima K. (1990) Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 144, 3034-3038.
- Siveke J. T. and Hamann A. (1998) T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol.* 160, 550-554.

- Skundric D. S., Huston K., Shaw M., Tse H. Y., and Raine C. S. (1994) Experimental allergic encephalomyelitis. T cell trafficking to the central nervous system in a resistant Thy-1 congenic mouse strain. *Lab Invest.* 71, 671-679.
- Sloan D. J., Wood M. J., and Charlton H. M. (1992) Leucocyte recruitment and inflammation in the CNS. *Trends Neurosci.* 15, 276-278.
- Sminia T., de Groot C. J., Dijkstra C. D., Koetsier J. C., and Polman C. H. (1987) Macrophages in the central nervous system of the rat. *Immunobiology.* 174, 43-50.
- Sobel R. A., Mitchell M. E., and Fondren G. (1990) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol.* 136, 1309-1316.
- Sotomayor C. E. and Rabinovich G. A. (2000) "Galectin-1 induces central and peripheral cell death: implications in T-cell physiopathology". *Dev Immunol.* 7, 117-129.
- Stahel P. F., Morganti-Kossmann M. C., and Kossmann T. (1998) The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev.* 27, 243-256.
- Stanimirovic D., Shapiro A., Wong J., Hutchison J., and Durkin J. (1997) The induction of ICAM-1 in human cerebrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion. *J Neuroimmunol.* 76, 193- 205.
- Stanimirovic D. and Satoh K. (2000) Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol.* 10, 113-126.
- Steiner J. P., Hamilton G. S., Ross D. T., Valentine H. L., Guo H., Connolly M. A., Liang S., Ramsey C., Li J. H., Huang W., Howorth P., Soni R., Fuller M., Sauer H., Nowotnik A. C., and Suzdak P. D. (1997) Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 2019-2024.
- Steiniger B. and van der Meide P. H. (1988) Rat ependyma and microglia cells express class II MHC antigens after intravenous infusion of recombinant gamma interferon. *J Neuroimmunol.* 19, 111-118.
- Steinman L. (1996) A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 2253-2256.
- Steinman R. M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 9, 271-296.

- Stein-Streilein J. and Streilein J. W. (2002) Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol.* 21, 123-152.
- Stockinger B., Zal T., Zal A., and Gray D. (1996) B cells solicit their own help from T cells. *J Exp Med.* 183, 891-899.
- Stone L. A., Frank J. A., Albert P. S., Bash C., Smith M. E., Maloni H., and McFarland H. F. (1995) The effect of interferon-beta on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 37, 611-619.
- Street N. E. and Mosmann T. R. (1991) Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *Faseb J.* 5, 171-177.
- Streilein J. W., Okamoto S., Sano Y., and Taylor A. W. (2000) Neural control of ocular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci.* 917, 297-306.
- Streit W. J., Graeber M. B., and Kreutzberg G. W. (1989) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol.* 105, 115-126.
- Streit W. J., Walter S. A., and Pennell N. A. (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 57, 563-581.
- Streit W. J., Hurley S. D., McGraw T. S., and Semple-Rowland S. L. (2000) Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J Neurosci Res.* 61, 10-20.
- Streit W. J. (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 40, 133-139.
- Studer L., Csete M., Lee S. H., Kabbani N., Walikonis J., Wold B., and McKay R. (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci.* 20, 7377-7383.
- Sumitran S., Anderson P., Widner H., and Holgersson J. (1999a) Porcine embryonic brain cell cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Cell Transplant.* 8, 601-610.
- Sumitran S., Liu J., Czech K. A., Christensson B., Widner H., and Holgersson J. (1999b) Human natural antibodies cytotoxic to pig embryonic brain cells recognize novel non-Gal α 1,3Gal-based xenoantigens. *Exp Neurol.* 159, 347-361.
- Suzumura A., Lavi E., Weiss S. R., and Silberberg D. H. (1986) Coronavirus infection induces H-2 antigen expression on oligodendrocytes and astrocytes. *Science.* 232, 991-993.

- Tan P., Anasetti C., Hansen J. A., Melrose J., Brunvand M., Bradshaw J., Ledbetter J. A., and Linsley P. S. (1993) Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med.* 177, 165-173.
- Tani M. and Ransohoff R. M. (1994) Do chemokines mediate inflammatory cell invasion of the central nervous system parenchyma? *Brain Pathol.* 4, 135-143.
- Taupin P. and Gage F. H. (2002) Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res.* 69, 745-749.
- Taylor A. W. and Streilein J. W. (1996) Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation.* 3, 112-118.
- Thomas A., Gasque P., Vaudry D., Gonzalez B., and Fontaine M. (2000) Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *Int Immunol.* 12, 1015-1023.
- Thomas W. E. (1999) Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev.* 31, 42-57.
- Tseng J. L. and Aebischer P. (2000) Encapsulated neural transplants. *Prog Brain Res.* 127, 189-202.
- Turnley A. M., Miller J. F., and Bartlett P. F. (1991) Regulation of MHC molecules on MBP positive oligodendrocytes in mice by IFN-gamma and TNF-alpha. *Neurosci Lett.* 123, 45-48.
- Ullrich O., Diestel A., Eyupoglu I. Y., and Nitsch R. (2001) Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat Cell Biol.* 3, 1035-1042.
- Ulvestad E., Williams K., Mork S., Antel J., and Nyland H. (1994) Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53, 492-501.
- van der Kooy D. and Weiss S. (2000) Why stem cells? *Science.* 287, 1439-1441.
- van der Laan L. J., Lockey C., Griffeth B. C., Frasier F. S., Wilson C. A., Onions D. E., Hering B. J., Long Z., Otto E., Torbett B. E., and Salomon D. R. (2000) Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature.* 407, 90-94.
- Varastet M., Riche D., Maziere M., and Hantraye P. (1994) Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 63, 47-56.

- Vass K. and Lassmann H. (1990) Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol.* 137, 789-800.
- Vibulsreth S., Hefti F., Ginsberg M. D., Dietrich W. D., and Busto R. (1987) Astrocytes protect cultured neurons from degeneration induced by anoxia. *Brain Res.* 422, 303-311.
- Vine A. M., Lang J., Wood M. J., and Charlton H. M. (1999) Cytokine gene expression following neural grafts. *Exp Brain Res.* 126, 281-288.
- Walker L. S. and Abbas A. K. (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2, 11-19.
- Walker W. S., Gatewood J., Olivas E., Askew D., and Havenith C. E. (1995) Mouse microglial cell lines differing in constitutive and interferon-gamma-inducible antigen-presenting activities for naive and memory CD4+ and CD8+ T cells. *J Neuroimmunol.* 63, 163-174.
- Waltz D. A., Sailor L. Z., and Chapman H. A. (1993) Cytokines induce urokinase-dependent adhesion of human myeloid cells. A regulatory role for plasminogen activator inhibitors. *J Clin Invest.* 91, 1541-1552.
- Wang Y., Berezovska O., and Fedoroff S. (1999) Expression of colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) by CNS neurons in mice. *J Neurosci Res.* 57, 616-632.
- Weber F., Meinl E., Aloisi F., Nevinny-Stickel C., Albert E., Wekerle H., and Hohlfeld R. (1994) Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis. *Brain.* 117 (Pt 1), 59-69.
- Weiss J. M. and Berman J. W. (1998) Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *J Neuroimmunol.* 91, 190-197.
- Weissert R., de Graaf K. L., Storch M. K., Barth S., Linington C., Lassmann H., and Olsson T. (2001) MHC class II-regulated central nervous system autoaggression and T cell responses in peripheral lymphoid tissues are dissociated in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 166, 7588-7599.
- Wekerle H., Schwab M., Linington C., and Meyermann R. (1986) Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol.* 16, 1551-1557.
- Wekerle H., Kojima K., Lannes-Vieira J., Lassmann H., and Linington C. (1994) Animal models. *Ann Neurol.* 36 Suppl, S47-53.
- Weller R. O., Engelhardt B., and Phillips M. J. (1996) Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol.* 6, 275-288.

- Wenkel H., Streilein J. W., and Young M. J. (2000) Systemic immune deviation in the brain that does not depend on the integrity of the blood-brain barrier. *J Immunol.* 164, 5125-5131.
- Wennberg L., Rafael E., Liu J., Sundberg B., Wernersson A., and Korsgren O. (1997) Allogeneic and xenogeneic islets are rejected by different and specific mechanisms: a study in rodents using a mixed allogeneic-xenogeneic islet transplantation model. *Xenotransplantation.* 4, 228.
- Wennberg L., Czech K. A., Larsson L. C., Mirza B., Bennet W., Song Z., and Widner H. (2001) Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation.* 71, 1797-1806.
- Whittemore E. R., Korotzer A. R., Etebari A., and Cotman C. W. (1993) Carbachol increases intracellular free calcium in cultured rat microglia. *Brain Res.* 621, 59-64.
- Widenfalk J., Nosrat C., Tomac A., Westphal H., Hoffer B., and Olson L. (1997) Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J Neurosci.* 17, 8506-8519.
- Widner H., Moller G., and Johansson B. B. (1988) Immune response in deep cervical lymph nodes and spleen in the mouse after antigen deposition in different intracerebral sites. *Scand J Immunol.* 28, 563-571.
- Wilbanks G. A. and Streilein J. W. (1992) Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 22, 1031-1036.
- Wilby M. J., Sinclair S. R., Muir E. M., Zietlow R., Adcock K. H., Horellou P., Rogers J. H., Dunnett S. B., and Fawcett J. W. (1999) A glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting clone of the Schwann cell line SCTM41 enhances survival and fiber outgrowth from embryonic nigral neurons grafted to the striatum and to the lesioned substantia nigra. *J Neurosci.* 19, 2301-2312.
- Willenborg D. O. and Parish C. R. (1988) Inhibition of allergic encephalomyelitis in rats by treatment with sulfated polysaccharides. *J Immunol.* 140, 3401-3405.
- Williams C. B., Blankenhorn E. P., Byrd K. E., Levinson G., and Gutman G. A. (1991) Organization and nucleotide sequence of the rat T cell receptor beta-chain complex. *J Immunol.* 146, 4406-4413.
- Williams K., Alvarez X., and Lackner A. A. (2001) Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia.* 36, 156-164.

- Williams K., Ulvestad E., and Antel J. P. (1994) B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. *Eur J Immunol.* 24, 3031-3037.
- Williams K. C., Dooley N. P., Ulvestad E., Waage A., Blain M., Yong V. W., and Antel J. P. (1995) Antigen presentation by human fetal astrocytes with the cooperative effect of microglia or the microglial-derived cytokine IL-1. *J Neurosci.* 15, 1869-1878.
- Witting A., Muller P., Herrmann A., Kettenmann H., and Nolte C. (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem.* 75, 1060-1070.
- Wong D. and Dorovini-Zis K. (1992) Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* 39, 11-21.
- Wong D. and Dorovini-Zis K. (1995) Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Microvasc Res.* 49, 325-339.
- Wood M. J., Sloan D. J., Wood K. J., and Charlton H. M. (1996) Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience.* 70, 775-789.
- Wood K. J. and Sakaguchi S. (2003) Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 3, 199-210.
- Wuerthele S. M., Freed W. J., Olson L., Morihisa J., Spoor L., Wyatt R. J., and Hoffer B. J. (1981) Effect of dopamine agonists and antagonists on the electrical activity of substantia nigra neurons transplanted into the lateral ventricle of the rat. *Exp Brain Res.* 44, 1-10.
- Xiao B. G., Bai X. F., Zhang G. X., Hojeberg B., and Link H. (1996) Shift from anti- to proinflammatory cytokine profiles in microglia through LPS- or IFN-gamma-mediated pathways. *Neuroreport.* 7, 1893-1898.
- Xiao B. G., Diab A., Zhu J., van der Meide P., and Link H. (1998) Astrocytes induce hyporesponses of myelin basic protein-reactive T and B cell function. *J Neuroimmunol.* 89, 113-121.
- Xiao B. G. and Link H. (1999) Is there a balance between microglia and astrocytes in regulating Th1/Th2-cell responses and neuropathologies? *Immunol Today.* 20, 477-479.
- Yamada S., DePasquale M., Patlak C. S., and Cserr H. F. (1991) Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am J Physiol.* 261, H1197-1204.

- Yednock T. A., Cannon C., Fritz L. C., Sanchez-Madrid F., Steinman L., and Karin N. (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 356, 63-66.
- Yong V. W., Krekoski C. A., Forsyth P. A., Bell R., and Edwards D. R. (1998) Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci*. 21, 75-80.
- Yu N., Zhang X., Magistretti P. J., and Bloom F. E. (1998) IL-1-alpha and TNF-alpha differentially regulate CD4 and Mac-1 expression in mouse microglia. *Neuroimmunomodulation*. 5, 42-52.
- Yurek D. M. (1998) Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of dopaminergic neurons in transplants of fetal ventral mesencephalic tissue. *Exp Neurol*. 153, 195-202.
- Zawada W. M., Zastrow D. J., Clarkson E. D., Adams F. S., Bell K. P., and Freed C. R. (1998) Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. *Brain Res*. 786, 96-103.
- Zhang E. T., Richards H. K., Kida S., and Weller R. O. (1992) Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 83, 233-239.
- Zhang Z. G., Chopp M., Tang W. X., Jiang N., and Zhang R. L. (1995) Postischemic treatment (2-4 h) with anti-CD11b and anti-CD18 monoclonal antibodies are neuroprotective after transient (2 h) focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*. 698, 79-85.
- Zinkernagel R. M. and Hengartner H. (1997) Antiviral immunity. *Immunol Today*. 18, 258-260.
- Zipp F., Martin R., Lichtenfels R., Roth W., Dichgans J., Krammer P. H., and Weller M. (1997) Human autoreactive and foreign antigen-specific T cells resist apoptosis induced by soluble recombinant CD95 ligand. *J Immunol*. 159, 2108-2115.
- Zurn A. D., Widmer H. R., and Aebischer P. (2001) Sustained delivery of GDNF: towards a treatment for Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 36, 222-229.

Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependant neuroprotection

Benoît Melchior^{*1}, Véronique Nerrière-Daguin^{*1}, David-A. Laplaud^{*†}, Séverine Rémy^{*}, Sandrine Wiertelowski[†], Isabelle Neveu^{*}, Philippe Naveilhan^{*}, Susan O. Meakin[§] and Philippe Brachet^{*2}

**Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 437, and †Clinique Neurologique, Centre Hospitalier Universitaire, 44093 Nantes, France, and § The Robarts Research Institute, London, Ontario, Canada.*

Running title: Ectopic expression of TrkA in brain neurons

¹Both authors contributed equally to this work.

²Correspondence: P. Brachet, INSERM U437 / ITERT, 30 bd Jean-Monnet, 44093 Nantes, France.
Fax: 33 (0)2 40 08 74 11; E-mail: pbrachet@nantes.inserm.fr

A recombinant adeno-associated virus (rAAV) was used to investigate the impact of an ectopic expression of the NGF high affinity receptor in adult neurons. The rat TrkA cDNA cloned in a pCMX vector was firstly tagged with a human c-Myc sequence. The resulting vector was shown to encode a functional receptor which promoted the expression of TrkA immunoreactivity upon transfection of 293 fibroblasts or nnr5 cells, a TrkA-defective variant of PC12 cells. These cells also accumulate TrkA transcripts upon transfection, and extended neurites in the presence of NGF. Therefore, the TrkA_{myc} cassette was inserted into the pSSV9 plasmid. The new vectors shared properties similar to pCMX TrkA_{myc} in 293 and nnr5 cells, and enabled the preparation of rAAV TrkA_{myc} viruses. Unilateral injection of this rAAV into the substantia nigra (SN) resulted in a protracted expression of TrkA (or c-Myc) immunoreactivity in numerous cell bodies, including tyrosine-hydroxylase (TH)-positive dopaminergic neurons. The presence of TrkA receptors in corresponding striatal dopaminergic endings was demonstrated by the advent of a striato-nigral retrograde axonal transport of [¹²⁵I]-NGF. Likewise, ectopic expression of TrkA in neurons of the parafascicular thalamic nucleus promoted a striatofuge transport of NGF towards this structure. To investigate whether ectopic expression of TrkA in SN neurons may confer neuroprotection, lesions were induced by 6-hydroxydopamine in striata located ipsilateral to the virus injection site. NGF or vehicle were next delivered dorsally to the virus-treated SN for 2 weeks, before sacrifice and processing of brains for TH-immunohistochemistry. NGF treatment, in contrast to treatment with vehicle, significantly enhanced the number of dopaminergic neurons counted in the lesioned SN. These data suggest that ectopic TrkA can mediate the trophic actions of NGF and influence neuronal plasticity *in vivo*.

Key words: Alzheimer's disease; Parkinson's disease; nerve growth factor; gene therapy; neurotrophin; neurotrophic factor; cell death.

INTRODUCTION

Nerve growth factor (NGF) is a neurotrophic factor belonging to the neurotrophin family. In the central nervous system (CNS), NGF exerts trophic effects on the cholinergic neurons of the basal forebrain and striatum (42, 68), as well as acting on some non-cholinergic neuronal populations located in more caudal positions (20). As a mirror image, target areas of NGF-responsive neurons are the major sources of NGF in the brain. This is the case for the hippocampus and cortex, and to a lesser extent, the striatum, which provides NGF to cholinergic neurons in the forebrain (4, 29, 49, 58). Astrocytes constitute another source of NGF, which is less influenced by regional clues (22, 60). The neurotrophic effects of NGF are mediated by a high affinity receptor, a trans-membrane tyrosine-kinase referred to as TrkA (24, 26, 40), which is expressed by the NGF-responsive neurons of the CNS (20, 21). Although NGF may also interact with a low-affinity co-receptor, p75^{NTR}, ligation of TrkA is sufficient in driving complex downstream phosphorylation cascades which mediate its major trophic actions (Reviewed in 10, 25). Moreover, TrkA is associated with cytoskeletal components (33, 71), and in the brain, is subjected to retrograde axonal transport, irrespective of the presence of the low-affinity co-receptor (11, 13, 20, 57, 66). However, in the adult brain, endogenous production of NGF may be insufficient in ensuring the survival of NGF-responsive neurons following exposure to drastic traumatic conditions. In contrast, survival may be obtained by increasing the local availability of NGF. Such rescue experiments were initially based on a direct intracerebral infusion of NGF (3, 18, 62), or implantation of biodegradable NGF-loaded microspheres (41). Other strategies have involved the transplantation of cells or injection of viral vectors that had been genetically modified to produce NGF (37, 51, 62). Similarly, vector-derived production of a factor such as glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) has been reported to protect injured dopaminergic mesencephalic neurons (reviewed in 7).

The potential benefit of a reciprocal strategy, based on an ectopic expression of TrkA, has been much less documented. Expression of TrkA in neurons which naturally fail to synthesize this high affinity receptor should confer a certain degree of responsiveness to NGF. This assumption is supported by *in vitro* studies involving cultures of peripheral embryonic neurons, or

pheochromocytoma PC12 variant cells lacking TrkA. In both cases, ectopic expression of TrkA enhanced and/or triggered NGF-dependent biological effects (1, 2, 32).

In the present study, we investigated the possibility of genetically modifying adult brain neurons *in vivo*, in order to trigger a sustained synthesis of TrkA in cells which do not normally express this receptor. For this purpose, we made use of a recombinant adeno-associated virus (rAAV), since this type of vector is known to efficiently transduce certain CNS neurons, without inducing any significant inflammatory reaction within the host brain (31, 36). Thus, a rAAV was constructed, in which the rat TrkA cDNA was placed under the control of a CMV early promoter. The ability of this recombinant vector to drive a protracted production of TrkA was investigated using substantia nigra (SN) dopaminergic neurons as target cells. These neurons play a pivotal role in the control of movement and the pathophysiology of Parkinson's disease (19, 59). They project their axons into the striatum, and they constitute a typical population which fails both to express TrkA and to respond to NGF (20, 23, 28, 56). The data presented here indicate that the rAAV is able to drive a prolonged expression of TrkA in SN dopaminergic neurons. This ectopic expression triggers retrograde axonal transport of NGF from striatal terminals and confers a neuroprotection of lesioned dopaminergic neurons upon delivery of exogenous NGF.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction and AAV TrkA_{myc} production. Rat TrkA cDNA was subcloned into the plasmid vector pCMX as described previously (39). For the addition of a tag, a sequence encoding an antigenic peptide fragment of the human Myc protein (EQKLISEEDL) as well as a GP stretch to help the tag hang away from the receptor, was subcloned between the signal peptide and the mature end of rat TrkA between amino-acids Ala [34] and Ser [35]. This was achieved by overlap Polymerase Chain Reaction (PCR) mutagenesis using wild type TrkA primers as the outside anchors. The final PCR product (approx. 620 bp) was cloned into the TrkA Apa1 and PvuII sites. The inserted PCR fragment contained an internal and unique EcoRV site which was used to

confirm the presence of the tag on the receptors. The identity of the PCR generated TrkA construct was confirmed by DNA sequencing.

The resulting TrkA_{myc} cDNA was then subcloned from pCMX TrkA_{myc} into the unique Xho1 site in pSSV9 (14) to produce pSSV9 TrkA_{myc}. Plasmids were propagated in SURE 2 supercompetent cells (Stratagene, La Jolla, CA), then extracted and purified using the Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, USA). Some control experiments involved pSSV9 LacZ which drives the expression of *E. Coli* β -galactosidase (14, 53).

AAV production. Type II rAAV was produced by the Gene Vector Production Network (GVPN, University Hospital of Nantes, France) using the procedure described in detail by Salvetti *et al.* (53). Briefly rAAV TrkA_{myc} was produced by transfection of 293 cells with pSSV9 TrkA_{myc} and a plasmid vector pDG containing the *rep* and *cap* genes (17). Cells were infected 6 h after transfection with a wild type adenovirus. After 48 h, cells were harvested and lysed. The rAAV was purified on an iodixarol gradient, through a heparin column and then was dialyzed as described by Zolotukhin *et al.* (72). Two different methods were used to measure the rAAV titer. Dot blot analysis, which is based on the quantification of viral DNA, gave a range of 10^{11} to 10^{12} particles/ml. Modified Replicant Center Assay (RCA) gave a value of 10^{10} to 10^{11} infectious particles/ml, depending on the preparation. A stock of rAAV LacZ control virus was prepared from plasmid pSSV9 LacZ under conditions similar to those described above (kind gift of Dr A. Salvetti).

Cell culture and transfection. Rat pheochromocytoma PC12 and nnr5 cells (a gift from Dr M. Magazin, SANOFI, Labège, France) were cultured as described by Loeb *et al.* (32) in culture dishes coated with rat tail collagen (Jacques Boy, Lyon, France) or 50 mg/ml poly-L-lysine (from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Human kidney E293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich). Plasmid transfection was achieved with the non-liposomal formulation, FuGene 6 Transfection Reagent (Boehringer-Mannheim, Germany) using 2 μ g of plasmid for 80% cell confluence in 35mm tissue culture dishes in the presence of FCS. Human recombinant β NGF

(Sigma-Aldrich) was used at a final concentration of 50 ng/ml to assess the function of the TrkA_{myc} protein. nnr5 cells were considered as positive when neuritic length exceeded twice the cell diameter (32).

Immunocytochemistry. After 24 or 48 h, transfected E293 and nnr5 cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, treated for 5 min with 0.3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline, and then with normal goat serum. Cells were exposed overnight at 4°C to rabbit polyclonal anti-TrkA antibody (1:5000; kindly provided by Dr L. Reichardt, Howard Hughes Medical Institute, San Francisco, CA) or mouse anti-c-Myc 9E10 antibody (1:500; Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA). Cells were subsequently incubated for 1 h with a biotinylated anti-rabbit or anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and then treated with the ABC kit Vectastain (Vector, Burlingame, CA), using diaminobenzidine or very intense purple, and counter-stained with hematoxylin/lithium carbonate. *RNase protection assays.* *RNase protection assays for the detection of TrkA RNA were performed as previously described (46). Briefly, 15µg of RNA isolated from cell cultures by the lithium chloride-urea procedure, were hybridized with cRNA probes labeled with [³²P]CTP (Amersham-Pharmacia-Biotech, Saclay, France) using the RPAII Kit (Ambion, Austin, TX). PC12 and nnr5 cells served as positive and negative controls, respectively. The rat TrkA antisense cRNA probe was prepared as previously described. In order to control and standardize RNA loading, an antisense probe detecting glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcripts was added to each sample. Protected cRNA fragments were separated on 4% polyacrylamide gels under denaturing conditions. Gels were fixed, dried and exposed to a Molecular Dynamics (Palo Alto, CA) Phospho Imager Screen. Gels were exposed for 1 day or 6 h (for cells transfected with the TrkA-expressing vector) to X-ray films at -70°C with intensifying screens.*

Animals and unilateral stereotaxic injection of AAV TrkA_{myc}. All procedures involving animals were in compliance with our Institutional guidelines. Adult female outbred Sprague-Dawley rats (Laboratoires Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were weighed (280-300g) and anesthetized

with 0.3 ml of a mixture of 2% Rompun and 50 mg/ml Ketamine administered intraperitoneally. The injection coordinates for the right SN *pars compacta* were: bregma -5.3 mm antero-posterior (AP), -2.4 mm medial-lateral (ML), -7.5 mm dorsal-ventral (DV); incisor bar at -3.3 mm. Viral stocks ($1.5 \cdot 10^{10}$ pi/ml) were injected with a 10 μ l Hamilton syringe mounted on a automated microinjector (Phymep, Paris, France). The pump delivered 5 μ l over a 5 min period, and the needle remained in place for 5 additional min. A similar procedure was used for the rAAV LacZ control virus.

Immunohistochemistry and confocal image analysis. Anesthetized animals were perfused with 100 ml of 0.9% NaCl, followed by 300 ml of cold 4% paraformaldehyde in 100mM phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed and cryoprotected in two successive solutions of 15% and 30% sucrose/phosphate-buffered saline at 4°C, and stored at -80°C. Free floating coronal sections (40 μ m) of midbrain were exposed for 24 h at 4°C to several antibodies: rabbit anti-TrkA antibody (1:5000), mouse anti-c-Myc 9E10 antibody (1:500) and rabbit anti-TH antibody (1:500; Pel Freez, Rogers, AR, USA). Sections were incubated for 1 h with an appropriate secondary biotinylated antibody, and revealed with the ABC kit and diaminobenzidine, as described above. Controls included sections where the primary antibody was omitted. The possible induction of the low affinity neurotrophin receptor p75^{NTR} in response to rAAV TrkA_{myc} administration was monitored by immunohistochemistry using the MC192 monoclonal antibody (Boehringer-Mannheim). When the rAAV LacZ control virus was used, expression of β -galactosidase was detected with an antibody from ICN Pharmaceuticals (Orsay, France). To further unravel the identity of TrkA-positive cell bodies observed following injection of the rAAV TrkA_{myc} virus, selected sections were double-labeled using a sheep FITC-conjugated anti-TH antibody (Jackson ImmunoResearch, PA) and a biotinylated anti-rabbit antibody, visualized using a streptavidin-TexasRed complex. Slides were analyzed with a Leica confocal microscope using TCS NT software.

Retrograde transport of [¹²⁵I]-NGF. The rAAV TrkA_{myc} was administered to the right SN (n=2) or parafascicular thalamic nucleus (n=1). Animals were anesthetized after 24 weeks, and 5 μ l (1 μ Ci) of [¹²⁵I]-NGF (specific activity : 1366Ci /mmol ; Amersham-Pharmacia-Biotech) were injected at two

different sites in each striatum. This corresponded to an input of 20 ng of NGF per striatum. Stereotaxic coordinates were : bregma +1.0 mm AP, ± 2.8 mm ML, -5.2 mm DV; and +0.5 mm AP, ± 2.5 mm ML, -5.2 mm DV, incisor bar at -3.3 mm, with a Hamilton syringe, at 1 μ l/min. Animals were anesthetized and perfused 20 h later and their brains cryoprotected as described above. For autoradiography, frontal cryostat sections (30 μ m) performed at the level of the midbrain were mounted onto gelatin-treated slides and were firstly placed in contact with Kodak films (Paris, France) for 2 months. After development, which revealed the presence of radiolabeled material on at least 24 successive sections (740 μ m) or more, part of the slides were dehydrated in successive baths of alcohol, and dipped in Kodak emulsion NTB-2. Development was performed 4 months later, and preparations were counterstained with cresyl-violet. Other slides were used to monitor the presence of TrkA immunoreactivity. However, TrkA-immunohistochemistry turned out to be negative, even in brain areas such as the septum which naturally contains neurons expressing the NGF receptor. This was probably due to damage of the tissue sections as a result of their two month storage period at room temperature for autoradiography. Eventually, immunoreactivity was recovered by first treating the sections for 40 min at 95°C in 10 μ M citrate buffer, pH 6.0, before they were processed as described above.

Assessment of neuroprotection. Eight weeks following unilateral injection of rAAV in the right SN, performed as described above, 7 animals received two ipsilateral intrastriatal injections (55) of 5 μ l of 6-hydroxydopamine (6-OHDA; free base from Sigma-Aldrich) at 2 mg/ml, dissolved in 1 mg/ml ascorbic acid-0.9 % NaCl, pH 4.3. The coordinates were: bregma + 0.5 mm AP, -2.5 mm ML, -5.0 mm DV; and -0.5 mm AP, -4.2 mm ML, -5.0 mm DV, incisor bar at 0. Four days later, a stainless steel cannula was sealed to the skull of each animal, with its tip at the level of the dorsal side of the ipsilateral SN (-5.3 mm AP, -2.4 mm ML, -7.0 mm DV, incisor bar at -3.3 mm). The cannula were connected to Alzet 2002 mini osmotic pumps (Alza Corp, Palo-Alto, CA, USA), and 4 animals (group a) received a continuous delivery of 0.7 μ g/day of human recombinant NGF (Sigma-Aldrich) in 124 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 2.4 mM KCl, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.4 mM CaCl₂, 2

mM MgCl₂, 0.5 mM Na₂SO₄ and 6 mM glucose at pH 7.4 (65). The flow rate was 0.5 µl/h for 14 days. The second group of three animals (group *b*) received pumps delivering vehicle alone. Three more animals were included in the study, as an additional control group. Unlike the 2 former groups, these animals had no prior administration of rAAV, but they were lesioned with 6-OHDA and received pumps delivering NGF (n=2) or vehicle (n=1). The results obtained under both conditions were so similar that the three animals were pooled and will be referred to as group *c*. All animals were sacrificed at the end of the treatment. After perfusion, brains were processed for TH-immunohistochemistry as described above. Free floating coronal sections (40 µm) were prepared and those showing the medial terminal nucleus of the optic track served as references, and were assumed to correspond to (or to be closed to) position AP -5.3 mm to bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (48, 55). TH-immunoreactive neurons were counted in this, and as well as neighboring sections at 240 µm intervals, thus allocated to coordinates AP -4.82, -5.06, -5.30, -5.54 mm to bregma. These calculated values were used by convenience, knowing that actual positions are probably less accurate. Sections stained for TH-immunoreactivity were viewed on a computer screen and contralateral, untreated SN were delineated to exclude the ventral tegmental area (16). The same area of interest was delineated on the lesioned side. For each rostrocaudal position, the mean percentage of TH-positive cell bodies remaining in the lesioned SN was established, ascribing a value of 100% to the counts found in the non-lesioned contralateral side. The mean percentages are presented +/- SEM. To obtain an overview of the data, the average of the values found in the 4 successive sections of each experimental group was calculated. The differences were analyzed using one-factor analysis of variance (ANOVA).

RESULTS

Expression of TrkA_{myc} in cell cultures. The rat TrkA cDNA cloned into plasmid pCMX was tagged with a human c-Myc sequence, and the resulting pCMX TrkA_{myc} plasmid was used to transfect human kidney E293 cells. Staining 24h later with an anti-TrkA antibody showed that about 15-20 % of the cells expressed TrkA-immunoreactivity (Fig. 1A and B). A similar pattern was observed with an anti-c-Myc antibody (not shown). In order to test the functionality of the tagged

receptor, *nnr5* variant cells of the PC12 strain were transfected with the same plasmid. In this case, the fraction of TrkA-immunoreactive cells was much lower than in the case of E293 cells. However, most TrkA-immunoreactive cells extended neurites when exposed for 48h to 50 ng/ml of NGF. Furthermore, the fraction of neurite-bearing cells was significantly elevated compared to untransfected cells, or cells transfected with a control plasmid (Fig. 1C and D). An RNase protection assay confirmed that transfection of *nnr5* cells with the pCMX TrkA_{myc} plasmid restored a high expression of *TrkA* mRNA in these cells (Fig. 2C). In view of these results, the TrkA_{myc} cassette was subcloned into the pSSV9 plasmid. Transfection of E293 cells with the resulting plasmid pSSV9 TrkA_{myc} resulted in the appearance of TrkA immunoreactivity in approximately 15% of the cells, as in the case of the pCMX TrkA_{myc} plasmid. Likewise, TrkA-positive *nnr5* cells responded to NGF by an outgrowth of neurites (Fig. 1A and C).

Long-lasting expression of TrkA in neurons. The rAAV TrkA_{myc} was prepared from the pSSV9 TrkA_{myc} plasmid, and injected into the right SN. Animals were sacrificed after 6, 11, 20 and 24 weeks, and their brains processed for immunohistochemistry. TrkA-immunoreactive cell bodies were observed at all time-points, around the virus injection site. In the example presented in Fig. 3, the brain was analyzed 6 weeks after unilateral viral administration. TH staining did not reveal any obvious anatomical differences between the contralateral (Fig. 3A) and ipsilateral sides (Fig. 3B). TrkA-immunoreactive somata were found at the level of TH-positive neurons (Fig. 3B and D) in the ipsilateral side only (Fig. 3A and C). The anti-c-Myc antibody gave a similar staining pattern (Fig. 3E and F). Immunohistochemistry performed with an anti-p75^{NTR} antibody remained negative, irrespective of a prior administration of the rAAV TrkA_{myc} to the SN (data not shown). To further characterize the specificity of the TrkA-expressing rAAV, controls were performed with a rAAV LacZ vector. The virus was injected into the right SN, under conditions similar to those described for the rAAV TrkA_{myc}. After 8 weeks, the rAAV LacZ led to the expression of β -galactosidase in cell bodies located around the injection site, as detected by immunohistochemistry. In contrast, it failed to induce any TrkA-immunoreactivity (data not shown).

Co-localization of TrkA and TH-immunoreactivity by confocal microscopy confirmed that

dopaminergic neurons permitted a long-term expression of the TrkA transgene (Fig.4). Many immunoreactive neurites were observed, around cell bodies located in the *pars compacta*. In contrast, analyses performed on the striatum were not conclusive, because unlike the substantia nigra, this structure contains TrkA-immunoreactive interneurons. No significant differences in the staining intensity between either the ipsilateral or contralateral sides could be distinguished. In parasagittal sections, the anti-TrkA antibody revealed scarce ascending axons between the substantia nigra and the striatum (not shown), possibly corresponding to projections of dopaminergic neurons. However, this result was not supported by staining performed with the anti-c-Myc antibody, possibly because of a high background staining. Likewise, no differences could be detected between either the ipsilateral or the contralateral sides of the striatum, when analyzed on frontal sections with the same antibody.

Striatofuge transport of NGF. Retrograde axonal transport was used to determine whether ectopically expressed TrkA was positioned along the striatal axonal endings of dopaminergic neurons. Two animals whose substantia nigra was exposed 24 weeks earlier to a unilateral stereotaxic administration of the rAAV TrkA_{myc} virus received two bilateral, intrastriatal injections of [¹²⁵I]-NGF. Brains were collected 20h later and frontal sections, performed at the level of the midbrain, were subjected to autoradiography. Labeled neuronal cell bodies were detected in the virus-treated substantia nigra (Fig. 5B and E), whereas the contralateral side was negative (Fig. 5A). Control experiments performed by immunohistochemistry on adjacent sections confirmed the existence of TrkA-immunoreactivity at the level of radiolabeled cell bodies (not shown). One animal displayed radioactive somata scattered in the parafascicular thalamic nucleus. It was verified that in this animal, TrkA-immunoreactive cells were present in this structure, ipsilaterally to the virus injection site (Fig. 5C, D and F).

Neuroprotection of SN dopaminergic neurons. The rAAV TrkA_{myc} vector was injected into the right SN and 8 weeks later, the dopaminergic system was lesioned by two intrastriatal injections of 6-OHDA. Four days later, NGF (n=4; group a) or vehicle (n=3; group b) was delivered dorsal to the

virus injection site for a period of 14 days. The third group (group c) included animals which were not exposed to the rAAV, but which received the lesion and were treated for 14 days with either NGF (n=2) or vehicle (n=1). These three animals were pooled, because the type of treatment had no significant influence on the results. All brains were collected at the end of the treatments and were processed for TH-immunohistochemistry. For each experimental group, percentages of TH-immunoreactive neurons present ipsilateral to the lesion (% of contralateral) were established in 4 successive coronal sections, positioned as described in the Methods section. Scores found for a similar rostrocaudal position were averaged and values \pm SEM are shown in Fig. 6A. The results indicate that in comparison to the non-lesioned contralateral side, the intrastriatal lesion consistently decreased the number of TH-positive neurons in the ipsilateral SN. The numbers of dopaminergic cell bodies were minimal in the 3 animals of control group c (lesion plus supply of either NGF or vehicle, without any prior rAAV administration), as well as in group b (SN exposed to the virus and subsequently lesioned, with a supply of vehicle only). In striking contrast, TH-positive somata were more numerous in group a (SN exposed to the vector and subsequently lesioned, with a delivery of NGF). This was observed in 3 successive sections, which were the closest to the tip of the device delivering the trophic factor (AP: -4.82, -5.06 and -5.30 mm to bregma). In order to obtain an overview of these results, mean scores corresponding to the 4 sections were pooled and the average calculated (Fig. 6B). One-factor analysis of variance (ANOVA) indicated a significant neuroprotective effect of NGF treatment in brains that had been firstly exposed to the TrkA-expressing vector ($P < 0.001$, group a vs b; $P < 0.003$, group a vs c).

DISCUSSION

Our results show that tropism of the type 2 AAV vector used in this study enables an efficient transduction of SN dopaminergic neurons, in which the cytomegalovirus (CMV) promoter of the construct remained functional for at least 24 weeks. Such a long-term neuronal expression confirms data obtained with other recombinant AAV and is in contrast with the poor efficiency of transduction of striatal rostral neurons (12, 27, 36, 63).

While double labeling experiments unambiguously showed that TrkA immunoreactivity was present in TH-positive somata and dendrites, axonal localization of the receptor could not be assessed using immunohistochemical techniques alone, despite the Myc-tag. In contrast, mesencephalic neurons exposed several weeks earlier to the rAAV were able to translocate NGF from the striatum to cell bodies in the SN. As pointed out above, this process of retrograde axonal transport relies on the expression of TrkA. In agreement with data of Schwab *et al.* (56), it was not observed in the contralateral SN, which was not treated with the TrkA-expressing virus. These results indicate that ectopically synthesized TrkA_{myc} receptors are positioned along the striatal axonal efferences of the nigral dopaminergic neurons and also support the concept that TrkA_{myc} molecules are functional, at least with respect to their interaction with the anterograde and retrograde trafficking machineries. It is worth noting that this transport was observed in the absence of any detectable expression of p75^{NTR} immunoreactivity in the SN, a fact which supports the possibility that the low affinity neurotrophin receptor is not required for NGF axonal transport in certain CNS neurons (13, 20, 44, 66). This does not exclude that conditions leading to a co-expression of the p75^{NTR} receptor in DA neurons might modify qualitative or quantitative parameters characterizing NGF axonal flux (30). Mesencephalic dopaminergic neurons respond to other neurotrophins (23, 28), in particular, they express TrkB (47) and promote retrograde axonal transport of its ligand, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (44). Therefore, it is possible that the transducing machinery of the TrkB receptor may contribute to the promotion of retrograde axonal transport of NGF liganded to TrkA. The ectopic expression of TrkA in the parafascicular thalamic nucleus also resulted in the retrograde axonal transport of radiolabeled NGF injected into the striatum whereas no such transport was seen in the contralateral side. This result is explained by the existence of a projection of parafascicular neurons towards the striatum, which has been described using other techniques of axonal retrograde tracing (5, 6). Neurons present in the same structure were reported to transport BDNF but not NGF in a retrograde manner, as do SN dopaminergic neurons (43, 44). Hence, data do not make it possible to determine whether an ectopic expression of TrkA can promote a retrograde transport of NGF in neurons that are lacking any other Trk-related receptor and its

corresponding transducing apparatus. The TrkA-expressing rAAV vector may serve to unravel this question.

A hallmark of NGF and other neurotrophins is the promotion of neuronal survival. In the case of NGF, the signaling role of retrograde axonal transport remains a matter of controversy (34, 50, 64, 67). The Trk receptor family transduces signals via several intracellular pathways (10, 25) which are redundant to some extent (61). However, responses may differ, according to the cell type or development stage. Furthermore, several arguments indicate that these receptors are not equivalent (9, 38, 70) and that under certain conditions, NGF is more effective than other neurotrophins in promoting neuronal survival (15, 39). In order to investigate whether ectopically expressed TrkA could exert a positive action on the survival of SN dopaminergic neurons, we used the model described by Sauer and Ortel (55) of intrastriatal insult with 6-OHDA. This lesion is followed by a striatofuge, progressive degeneration of SN dopaminergic neurons. We verified that the infusion of NGF alone to the injured SN had no effect on the number of residual dopaminergic neurons. This is in agreement with previous work demonstrating the lack of trophic action of NGF on SN dopaminergic neurons (23, 28, 56). Likewise, the expression of ectopic TrkA alone in SN neurons was insufficient to promote dopaminergic cell survival (or in slowing down the cell death process), since the number of dopaminergic neurons remaining in the lesioned SN was not influenced by a previous administration of rAAV TrkA_{myc}. This suggests that endogenous production of NGF (3, 29) is not sufficient to protect TrkA-expressing SN dopaminergic neurons. In contrast, exogenous supplementation of NGF significantly enhanced the number of TH-immunoreactive neurons in SN that were initially exposed to the TrkA-expressing vector. Vehicle delivery was inefficient under the same experimental conditions. It seems, therefore, that NGF transduces a survival signal in adult dopaminergic SN neurons via ectopic TrkA. As stated above, this effect took place in the absence of any observable expression of the low affinity p75^{NTR}. However, further studies will be required to determine to what extent this survival effect mobilizes transducing elements of TrkB or other related neurotrophin receptors.

Taken together, our data indicate that transduction of TrkA by a viral vector provides a convenient way to modify the plasticity of adult CNS neurons *in vivo*. This could have interesting applications

in repair strategies, for instance in conjunction with agonists of TrkA (35) or compounds able to enhance NGF synthesis in the brain or spinal cord (54, 69). Moreover, several reports have shown that in Alzheimer disease, loss of cholinergic neurons of the basal forebrain nuclei is preceded by a decreased expression of the TrkA receptor (8, 45, 52). Recombinant vectors driving the ectopic expression of this receptor might provide new strategies to maintain or restore the responsiveness of these neurons to NGF, and could contribute to enhancing the therapeutic potential of this factor.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported by two grants from the Association Française contre les Myopathies to P.Brachet. B. Melchior was a recipient of grants from the Fédération Française des Groupements de Parkinsoniens, the Association des Parkinsoniens de Loire-Atlantique and the Fondation pour la Recherche Médicale. AAV stocks were prepared by Drs P. Moullier and A. Salvetti from the Laboratoire de Thérapie Génique of the University Hospital of Nantes, to whom we are very grateful. The authors also thank Dr L. F. Reichardt (University of California at San Francisco) for the generous gift of the anti-TrkA antibody, Dr F. Lachapelle (INSERM Unit 546) for teaching us how to insert osmotic pumps, and Pr J.P. Soullou (INSERM Unit 437) for his constant support. J. Ashton (INSERM Unit 437) is acknowledged for her critical reading of the manuscript. For security reasons, experiments involving iodinated NGF were performed in the INSERM Unit 316 of Tours, thanks to the kind hospitality of Dr S. Chalon.

REFERENCES

1. Allsopp, T. E., M. Robinson, S. Wyatt, and A. M. Davies. 1993. Ectopic trkA expression mediates a NGF survival response in NGF-independent sensory neurons but not in parasympathetic neurons. *J Cell Biol* **123**: 1555-66.
2. Allsopp, T. E., M. Robinson, S. Wyatt, and A. M. Davies. 1994. TrkA mediates an NGF survival response in NGF-independent sensory neurons but not in parasympathetic neurons. *Gene Ther* **1**: S59.
3. Altar, C. A., M. Armanini, M. Dugich-Djordjevic, G. L. Bennett, R. Williams, S. Feinglass, V. Anicetti, D. Sinicropi, and C. Bakhit. 1992. Recovery of cholinergic phenotype in the injured rat neostriatum: roles for endogenous and exogenous nerve growth factor. *J Neurochem* **59**: 2167-77.
4. Ayer-LeLievre, C., L. Olson, T. Ebendal, A. Seiger, and H. Persson. 1988. Expression of the beta-nerve growth factor gene in hippocampal neurons. *Science* **240**: 1339-41.
5. Beckstead, R. M. 1984. The thalamostriatal projection in the cat. *J Comp Neurol* **223**: 313-46.
6. Berendse, H. W., and H. J. Groenewegen. 1990. Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol* **299**: 187-228.
7. Bjorklund, A., D. Kirik, C. Rosenblad, B. Georgievska, C. Lundberg, and R. J. Mandel. 2000. 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* **886**: 82-98.
8. Boissiere, F., S. Hunot, B. Faucheux, L. B. Hersh, Y. Agid, and E. C. Hirsch. 1997. Trk neurotrophin receptors in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **8**: 1-8.
9. Bradbury, E. J., V.R. King, L.J. Simmons, J.V. Priestley and S.B. McMahon. 1998. NT-3 but not BDNF, prevents atrophy and death of axotomized spinal cord projection neurons. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 3058-3068.

10. Chao, M. V., and B. L. Hempstead. 1995. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* **18**: 321-6.
11. Curtis, R., K. M. Adryan, J. L. Stark, J. S. Park, D. L. Compton, G. Weskamp, L. J. Huber, M. V. Chao, R. Jaenisch, K. F. Lee, and et al. 1995. Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* **14**: 1201-11.
12. Davidson, B. L., C. S. Stein, J. A. Heth, I. Martins, R. M. Kotin, T. A. Derksen, J. Zabner, A. Ghodsi, and J. A. Chiorini. 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3428-32.
13. DiStefano, P. S., B. Friedman, C. Radziejewski, C. Alexander, P. Boland, C. M. Schick, R. M. Lindsay, and S. J. Wiegand. 1992. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* **8**: 983-93.
14. Du, B., P. Wu, D. M. Boldt-Houle, and E. F. Terwilliger. 1996. Efficient transduction of human neurons with an adeno-associated virus vector. *Gene Ther* **3**: 254-61.
15. Frim D. M., T. A. U., M.P. Short, Z.D. Ezzedine, M. Klagsburn, X.O. Breakfield and O. Isacson. 1993. Effect of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions. *NeuroReport* **4**: 367-370.
16. German, D. C. a. K. F. M. 1993. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9 and A10): three dimensional reconstruction in the rat. *J. Comp. Neurol.* **331**: 297-309.
17. Grimm, D., A. Kern, K. Rittner, and J. A. Kleinschmidt. 1998. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9**: 2745-60.
18. Hefti, F. 1986. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci* **6**: 2155-62.
19. Hirsch, E. C., B. Faucheux, P. Damier, A. Mouatt-Prigent, and Y. Agid. 1997. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **50**: 79-88.

20. Holtzman, D. M., J. Kilbridge, Y. Li, E. T. Cunningham, Jr., N. J. Lenn, D. O. Clary, L. F. Reichardt, and W. C. Mobley. 1995. TrkA expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J Neurosci* **15**: 1567-76.
21. Holtzman, D. M., Y. Li, L. F. Parada, S. Kinsman, C. K. Chen, J. S. Valletta, J. Zhou, J. B. Long, and W. C. Mobley. 1992. p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* **9**: 465-78.
22. Houlgatte, R., M. Mallat, P. Brachet, and A. Prochiantz. 1989. Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain. *J Neurosci Res* **24**: 143-52.
23. Hyman, C., M. Juhasz, C. Jackson, P. Wright, N. Ip and R. Lindsay. 1994. 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.* **14**: 335-347.
24. Kaplan, D. R., B. L. Hempstead, D. Martin-Zanca, M. V. Chao, and L. F. Parada. 1991. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**: 554-8.
25. Kaplan, R. D. and F. D. M. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**: 381-391.
26. Klein, R., S. Q. Jing, V. Nanduri, E. O'Rourke, and M. Barbacid. 1991. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**: 189-97.
27. Klein, R. L., A. C. Hirko, C. A. Meyers, J. R. Grimes, N. Muzyczka, and E. M. Meyer. 2000. NGF gene transfer to intrinsic basal forebrain neurons increases cholinergic cell size and protects from age-related, spatial memory deficits in middle-aged rats. *Brain Res* **875**: 144-51.
28. Knusel, B., J. W. Winslow, A. Rosenthal, L. E. Burton, D. P. Seid, K. Nikolics, and F. Hefti. 1991. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 961-5.

29. Korsching, S., G. Auburger, R. Heumann, J. Scott, and H. Thoenen. 1985. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *Embo J* **4**: 1389-93.
30. Kramer, B. M. R., C.E.E. Van Der Zee and T. Hagg. 1999. p75 nerve growth factor receptor is important for retrograde transport of neurotrophins in adult cholinergic basal forebrain neurons. *Neuroscience* **94**: 1163-1172.
31. Lo, W. D., G. Qu, T. J. Sferra, R. Clark, R. Chen, and P. R. Johnson. 1999. Adeno-associated virus-mediated gene transfer to the brain: duration and modulation of expression. *Hum Gene Ther* **10**: 201-13.
32. Loeb, D. M., J. Maragos, D. Martin-Zanca, M. V. Chao, L. F. Parada, and L. A. Greene. 1991. The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell* **66**: 961-6.
33. MacDonald, J. I., J. M. Verdi, and S. O. Meakin. 1999. Activity-dependent interaction of the intracellular domain of rat trkA with intermediate filament proteins, the beta-6 proteasomal subunit, Ras-GRF1, and the p162 subunit of eIF3. *J Mol Neurosci* **13**: 141-58.
34. MacInnis, B. L., and R. B. Campenot. 2002. Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor. *Science* **295**: 1536-9.
35. Maliartchouk, S., Y. Feng, T. Debeir, A.C. Cuello, K. Burges and H.U. Saragovi. 2000. A designed peptidomimetic agonistic ligand of TrkA nerve growth factor receptors. *Mol. Pharmacol.* **57**: 385-391.
36. Mandel, R. J., S. K. Spratt, R. O. Snyder, and S. E. Leff. 1997. Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14083-8.
37. Martinez-Serrano, A., C. Lundberg, P. Horellou, W. Fischer, C. Bentlage, K. Campbell, R. D. McKay, J. Mallet, and A. Bjorklund. 1995. CNS-derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult rat brain: complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation into the septum. *J Neurosci* **15**: 5668-80.

38. McAllister, A. K., L.C. Katz; D.C. Lo. 1997. Opposing roles of endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* **18**: 767-778.
39. Meakin, S. O., E. A. Gryz, and J. I. MacDonald. 1997. A kinase insert isoform of rat TrkA supports nerve growth factor-dependent cell survival but not neurite outgrowth. *J Neurochem* **69**: 954-67.
40. Meakin, S. O., U. Suter, C. C. Drinkwater, A. A. Welcher, and E. M. Shooter. 1992. The rat trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2374-8.
41. Menei, P., J. M. Pean, V. Nerriere-Daguin, C. Jollivet, P. Brachet, and J. P. Benoit. 2000. Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage. *Exp Neurol* **161**: 259-72.
42. Mobley, W. C., J. L. Rutkowski, G. I. Tennekoon, K. Buchanan, and M. V. Johnston. 1985. Choline acetyltransferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science* **229**: 284-7.
43. Mufson, E. J., J. S. Kroin, Y. T. Liu, T. Sobreviela, R. D. Penn, J. A. Miller, and J. H. Kordower. 1996. Intrastratial and intraventricular infusion of brain-derived neurotrophic factor in the cynomologous monkey: distribution, retrograde transport and co-localization with substantia nigra dopamine-containing neurons. *Neuroscience* **71**: 179-91.
44. Mufson, E. J., J. S. Kroin, T. Sobreviela, M. A. Burke, J. H. Kordower, R. D. Penn, and J. A. Miller. 1994. Intrastratial infusions of brain-derived neurotrophic factor: retrograde transport and colocalization with dopamine containing substantia nigra neurons in rat. *Exp Neurol* **129**: 15-26.
45. Mufson, E. J., J. M. Li, T. Sobreviela, and J. H. Kordower. 1996. Decreased trkA gene expression within basal forebrain neurons in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **8**: 25-9.
46. Naveilhan, P., I. Neveu, C. Baudet, H. Funakoshi, D. Wion, P. Brachet, and M. Metsis. 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **41**: 259-68.

47. Numan, S., and K. B. Seroogy. 1999. Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **403**: 295-308.
48. Paxinos, G. a. C. W. 1982. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press, Sydney*.
49. Rennert, P. D., and G. Heinrich. 1986. Nerve growth factor mRNA in brain: localization by in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* **138**: 813-8.
50. Riccio, A., B. A. Pierchala, C. L. Ciarallo, and D. D. Ginty. 1997. An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* **277**: 1097-100.
51. Rosenberg, M. B., T. Friedmann, R. C. Robertson, M. Tuszynski, J. A. Wolff, X. O. Breakefield, and F. H. Gage. 1988. Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of NGF expression. *Science* **242**: 1575-8.
52. Salehi, A., J. Verhaagen, P. A. Dijkhuizen, and D. F. Swaab. 1996. Co-localization of high-affinity neurotrophin receptors in nucleus basalis of Meynert neurons and their differential reduction in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **75**: 373-87.
53. Salvetti, A., S. Oreve, G. Chadeuf, D. Favre, Y. Cherel, P. Champion-Arnaud, J. David-Ameline, and P. Moullier. 1998. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* **9**: 695-706.
54. Saporito, M. S., H.M. Wilcox, K.C. Hartpence, M.F. Lewis, J.L. Vaught and S. Carswell. 1993. Pharmacological induction of nerve growth factor mRNA in adult brain. *Exp. Neurol.* **123**: 295-302.
55. Sauer, H. a. W. H. O. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**: 401-415.
56. Schwab, M. E., U. Otten, Y. Agid, and H. Thoenen. 1979. Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS: absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in locus coeruleus and substantia nigra. *Brain Res* **168**: 473-83.

57. Seiler, M., and M. E. Schwab. 1984. Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res* **300**: 33-9.
58. Senut, M. C., Y. Lamour, J. Lee, P. Brachet, and E. Dicou. 1990. Neuronal localization of the nerve growth factor precursor-like immunoreactivity in the rat brain. *Int J Dev Neurosci* **8**: 65-80.
59. Smith, Y., and J. Z. Kieval. 2000. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **23**: S28-33.
60. Spranger, M., D. Lindholm, C. Bandtlow, R. Heumann, H. Gnahn, M. Naher-Noe and H. Thoenen. 1990. Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and in vivo. *Eur. J. Neurosci.* **2**: 69-76.
61. Stephens, R. M., D.L. Loeb, T.D. Copeland, T. Pawson, L.A. Greene and D.R. Kaplan. 1994. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma1 to mediate NGF responses. *Neuron* **12**: 691-705.
62. Stromberg, I., C. J. Wetmore, T. Ebendal, P. Ernfors, H. Persson, and L. Olson. 1990. Rescue of basal forebrain cholinergic neurons after implantation of genetically modified cells producing recombinant NGF. *J Neurosci Res* **25**: 405-11.
63. Tenenbaum, L., F. Jurysta, A. Stathopoulos, Z. Puschban, C. Melas, W. T. Hermens, J. Verhaagen, B. Pichon, T. Velu, and M. Levivier. 2000. Tropism of AAV-2 vectors for neurons of the globus pallidus. *Neuroreport* **11**: 2277-83.
64. Tsui-Pierchala, B. A., and D. D. Ginty. 1999. Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci* **19**: 8207-18.
65. Tuszynski, M. H. 2000. Intraparenchymal NGF infusions rescue degenerating cholinergic neurons. *Cell Transplant* **9**: 629-36.
66. Venero, J. L., F. Hefti, and K. D. Beck. 1995. Retrograde transport of nerve growth factor from hippocampus and amygdala to trkA messenger RNA expressing neurons in paraventricular and reuniens nuclei of the thalamus. *Neuroscience* **64**: 855-60.

67. Watson, F. L., H. M. Heerssen, D. B. Moheban, M. Z. Lin, C. M. Sauvageot, A. Bhattacharyya, S. L. Pomeroy, and R. A. Segal. 1999. Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci* **19**: 7889-900.
68. Williams, L. R., S. Varon, G. M. Peterson, K. Wictorin, W. Fischer, A. Bjorklund, and F. H. Gage. 1986. Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 9231-5.
69. Wion, D., D. MacGrogan, I. Neveu, R. Houlgatte and P. Brachet. 1991. 1,25-dihydroxyvitamine D3 is a potent inducer of nerve growth factor synthesis. *J. Neurosci. Res.* **28**: 110-114.
70. Yamada, M., T. Numakawa, H. Koshimizu, K. Tanabe, K. Wada, S. Koizumi and H. Hatanaka. 2002. Distinct usage of phospholipase C gamma and Shc in intracellular signaling stimulated by neurotrophins. *Brain Res.* **955**: 183-190.
71. Yano, H., F. S. Lee, H. Kong, J. Chuang, J. Arevalo, P. Perez, C. Sung, and M. V. Chao. 2001. Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *J Neurosci* **21**: RC125.
72. Zolotukhin, S., B. J. Byrne, E. Mason, I. Zolotukhin, M. Potter, K. Chesnut, C. Summerford, R. J. Samulski, and N. Muzyczka. 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* **6**: 973-85.

Figure legends

FIG. 1. Expression of TrkA in E293 and *nnr5* cells.

A. E293 cells were transfected with plasmids pSSV9 LacZ (–), pCMX TrkA_{myc} (solid bars), pSSV9 TrkA_{myc} (grey bars). The histogram summarizes the percentage of TrkA-immunoreactive cells after 24 h, +/- standard deviation. Cells exposed to the non-relevant plasmid pSSV9 remained negative whilst about 15-20 % of cells transfected with either of the TrkA-expressing plasmids displayed TrkA-immunoreactivity.

B. E293 fibroblasts 24h after transfection with the pCMX TrkA_{myc} plasmid. TrkA-immunoreactive cells are depicted in dark blue (arrows) and are scattered among a majority of negative cells, visualized by a counter-staining with hematoxylin (light blue) (X200).

C. Neurite extension by *nnr5* cells. Cells were either untreated (hatched bar), or were transfected with plasmids pSSV9 LacZ (open bar), pCMX TrkA_{myc} (solid bar), or pSSV9 TrkA_{myc} (grey bar). Cells were incubated with 50 ng/ml NGF for 48h. Transfection with TrkA_{myc} expression vectors significantly increased the fraction of neurite-bearing cells. Data are presented as percentage +/- standard deviation (*, pCMX TrkA_{myc} vs pSSV9 LacZ: $P < 0.005$; **, pSSV9 TrkA_{myc} vs pSSV9 LacZ: $P < 0.0005$; Student's *t* test).

D. TrkA-immunoreactive *nnr5* cells form neurites in the presence of NGF. *nnr5* cells transfected with pCMX TrkA_{myc} were exposed for 48h to 50 ng/ml NGF and were subsequently processed for TrkA immunocytochemistry. Immunoreactive neurite bearing cells are found among a majority of round, TrkA-negative cells (arrows) (X 300).

FIG. 2. RNase protection assays of *trkA* transcripts (higher panels) and *GAPDH* transcripts (lower panels). A, detection of *trkA* and *GAPDH* transcripts in: PC12 cells; B, in *nnr5* cells; C, in *nnr5* cells transfected with pCMX TrkA_{myc} and D, with an irrelevant plasmid, pSSV9 LacZ (exposition time was 24 h, and 6 h for *trkA* transcripts in B).

FIG. 3. Detection of TrkA- or c-Myc immunoreactivity 6 weeks following unilateral stereotaxic injection of rAAV TrkA_{myc}. The virus was administered to the right SN. A and B, TH- staining identifies dopaminergic neurons in the SN located both contralateral (A) and ipsilateral (B) to the injection site. C and D, TrkA-immunohistochemistry evidences cell bodies ipsilaterally (D), but not contralaterally (C) to the virus injection site. E and F, c-Myc-immunohistochemistry, which stains cell bodies in the ipsilateral SN only (F), and is absent in the contralateral side (E), as in the case of TrkA-expressing cells. Scale bar: 100 μm.

FIG. 4. Expression of TrkA in TH-positive neurons. Confocal microscopic observation of a SN 6 weeks after injection of rAAV TrkA_{myc}. The anti-TH antibody was labeled with FITC (green) and the anti-TrkA antibody with Texas Red. Superposition of both images shows that most TH-positive neurons present in the field express TrkA-immunoreactivity, as shown by their yellow color.

FIG. 5. Striatofuge transport of [¹²⁵I] NGF. Animals received a unilateral injection of AAV TrkA_{myc}. After 24 weeks, a bilateral injection of radiolabeled NGF was performed in both striata. After 20 h, animals were sacrificed and midbrain slices subjected to autoradiography, as described in the Methods section. After development, preparations were counter-stained with cresyl-violet. No radiolabeled cells could be detected in the SN located contralaterally to the virus injection site (A). In contrast, labeled cells were present in the ipsilateral SN (B and E). In one animal, labeled somata were found in the parafascicular thalamic nucleus located in the virus-treated hemisphere (C). This coincided with the presence of TrkA-immunoreactivity in the same structure (D). Such immunoreactive cell bodies are lacking in the contralateral side (F). Scale bars: A, B, D: 110μm; C: 1mm; E: 20 μm.

Fig. 6. Neuroprotection associated with rAAV TrkA_{myc} administration.

A. The virus was administered to the right SN, in animals which were subjected 8 weeks later to two ipsilateral, intrastriatal insults with 6-OHDA. This was followed by a 14 day supply of NGF

(group *a*, ● ; *n* = 4) or vehicle (group *b*, ▲ ; *n* = 3), at the level of the virus injection site. Three other animals did not receive any virus, but were subjected to the unilateral intrastriatal 6-OHDA lesions and received NGF (*n* = 2) or vehicle (*n* = 1). These 3 additional control animals were pooled to form one group (group *c*, □). Brains were processed for TH-immunohistochemistry. Cell bodies were counted in 4 successive sections, whose coordinates were assessed as described in the Methods section. The graph depicts the average percentages of TH-immunoreactive somata counted ipsilaterally in each section, and for each group (% of values found contralaterally) +/- SEM.

B. Overview of results. Data presented in A, which corresponded to 4 successive midbrain sections, were pooled and their average calculated. Survival in group *a* (solid bar) is significantly higher than group *b* (grey bar) and *c* (open bar) (**, $P < 0.001$, group *a* vs *b*; $P < 0.003$, group *a* vs *c*; ANOVA).

Résumé :

La xénotransplantation de neurones fœtaux porcins fournit une alternative thérapeutique aux allotransplantations de neurones humains réalisées dans la maladie de Parkinson. Cependant son application passe par la compréhension des mécanismes qui induisent le rejet de telles xénogreffes. Nous avons développé un modèle de transplantation de neurones fœtaux porcins dans le striatum du rat, dans lequel une réaction de rejet soudaine se produit lors de la quatrième semaine, après une infiltration du greffon par des macrophages et des lymphocytes T (LT). La technologie de PCR quantitative a permis de confirmer l'apparition rapide des LT au moment du rejet, par la mesure de l'expression des transcrits des ARNm du récepteur T (TCR). Ceci s'accompagne d'une accumulation concomitante des transcrits codants pour des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , IL-1, IL-2 et IL-6) ou des chimiokines (MCP-1 et RANTES) contrastant avec la pauvreté des transcrits d'IL-4 et d'IL-13. Ainsi, l'accumulation des LT infiltrants se fait dans un contexte inflammatoire de type Th1. En outre, l'analyse des altérations des longueurs du CDR3 des gènes V β du TCR a montré que les LT infiltrants paraissent avoir des spécificités antigéniques variées. L'analyse des altérations du répertoire T en périphérie démontre la participation des ganglions cervicaux drainants dans le rejet tandis que les lymphocytes du sang et de la rate ne paraissent pas impliqués.

MOTS-CLES :

Xénotransplantation, maladie de Parkinson, neurones, système nerveux central (SNC), rejet, macrophages / microglie, lymphocytes T, cytokines, chimiokines, TCR, répertoire, ganglions cervicaux profonds.

Abstract :

Xenotransplantation of porcine foetal neurons provides a therapeutic alternative to the allotransplantation of human foetal neurons for the treatment of Parkinson's disease. However its application necessitates by the comprehension of the mechanisms involved in xenografts rejection. We have developed a model of transplantation of porcine foetal mesencephalic neurons into the rat striatum. Using this model we observed a sudden rejection around the fourth week post-transplantation which was preceded by an infiltration of the graft by macrophages and T cells. By quantitative PCR we were able to confirm the rapid appearance of T cells at the time of the rejection through the measurement of the accumulation of T cells receptor (TCR) mRNA. This accumulation was accompanied by a concomitant accumulation of transcripts coding for pro-inflammatory cytokines (IFN γ , IL-1, IL-2 et IL-6) and chemokines (MCP-1 and RANTES) whereas IL-4 and IL-13 transcripts were scarce. Thus, the T cells infiltration is actively promoted in a proinflammatory context based on a TH1 polarization. Moreover, analysis of the CDR3 lengths alteration of the TCR V β genes showed that the infiltrating T cells appear to have varied antigenic specificities. The analysis of the T cells repertoire in the periphery indicates the involvement of draining deep cervical lymph nodes in the rejection process while the T cells of the blood and spleen do not appear to be implicated.

KEY WORDS :

Xenotransplantation, Parkinson's disease, neurons, central nervous system (CNS), rejection, macrophages / microglia, T lymphocytes, cytokines, chemokines, TCR, repertoire, deep cervical lymph nodes.
