

> La pénurie d'organes disponibles est responsable d'un nombre croissant de décès de patients en attente de greffe. Dans ces conditions, des solutions alternatives sont envisagées, notamment l'utilisation d'organes porcins. Les xéno-greffes sont cependant soumises à différents types de rejet (hyperaigu, vasculaire aigu et cellulaire) dont les mécanismes commencent à être mieux connus. Les stratégies visant à faire de la xénotransplantation une réalité clinique existent et, bien que le nombre de laboratoires engagés dans ce domaine soit encore modeste, des progrès substantiels ont été récemment obtenus. Elles incluent de nouvelles modifications génétiques des animaux donneurs combinées à la mise au point de traitements immunosuppresseurs adaptés à la situation clinique, ainsi que les tentatives d'induction d'une tolérance immunitaire et la gestion du risque sanitaire. L'acceptation des xéno-greffes par les receveurs potentiels et son impact sur la société sont également pris en considération. <

La transplantation d'organes est devenue une thérapeutique permettant de sauver et d'améliorer la qualité de vie des patients. La pénurie d'organes est cependant un facteur limitant le développement des greffes. C'est pourquoi le recours à la xénotransplantation, greffe de cellules ou d'organes animaux, serait de nature à réduire cette pénurie, à condition de s'assurer qu'elle est sans risque pour le patient et pour la société. Dès 1963, avec l'apparition des premières molécules immunosuppressives, des xéno-greffes de rein, utilisant des organes de primate [1], ont été tentées en clinique, inaugurant une série d'essais incluant le cœur de babouin [2], les greffes d'îlots pancréatiques porcins [3] et, plus récemment, les cellules souches neurales porcines [4].

## Les xéno-greffes finiront-elles par être acceptées ?

Céline Séveno, Michèle Fellous,  
Joanna Ashton-Chess, Jean-Paul Souillou,  
Bernard Vanhove



### Compatibilité des organes porcins

Sa facilité d'élevage et la compatibilité physiologique de certains de ses organes avec les primates [5] font du porc un donneur possible et surtout disponible.

Chez le macaque, la greffe rénale porcine permet le maintien des électrolytes sériques (sodium, potassium, calcium, chlorure) et l'obtention de concentrations normales de créatinine et d'urée pendant plusieurs semaines [6, 5]. Cependant, une hypophosphorémie et une légère hypoalbuminémie sont observées. Les animaux développent, dans le cas d'une greffe de rein, une anémie nécessitant l'apport d'érythropoïétine recombinante humaine. Concernant la transplantation hépatique, peu de tentatives ont été réalisées à ce jour. Cependant, ce type de greffe a permis la survie de deux babouins pendant 4 et 8 jours respectivement, avec des concentrations normales de facteurs de coagulation et de fibrinogène, et une production normale de bile [7]. Dans le cadre particulier de la greffe de foie de primate réalisée chez l'homme [8], le taux d'albumine semblait cependant réglé par l'organe greffé lui-même et non par le rece-

C. Séveno, J. Ashton-Chess, J.P. Souillou, B. Vanhove: Institut de transplantation et de recherche en transplantation (ITERT), Inserm U.643, CHU Hôtel Dieu, 30, boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes, France. [jps@nantes.inserm.fr](mailto:jps@nantes.inserm.fr).

M. Fellous: UMR 8137, Centre de recherche sens, éthique, société (CERSES), 59-61, rue Pouchet, 75849 Paris Cedex 17, France. [michele.fellous@wanadoo.fr](mailto:michele.fellous@wanadoo.fr)

veur, indiquant que l'obtention de survies plus prolongées est nécessaire avant de conclure. Un certain nombre de cas nécessitant la restauration urgente des fonctions hépatiques (hépatite fulminante, agents hépatotoxiques, dysfonctionnement primaire) pourraient ainsi être traités par une xéno greffe en attendant qu'un greffon allogénique soit disponible.

Des études ont également montré que des greffes orthotopiques de cœur et de poumons permettaient la survie de primates tant que ces organes n'étaient pas rejetés [9-11]. Chez le macaque rendu diabétique par administration de streptozotocine, des îlots pancréatiques porcins injectés par voie intra-portale sont capables de restaurer la normoglycémie tant qu'un rejet de type cellulaire ne les détruit pas [12]. La greffe de neuroblastes fœtaux porcins a également été testée chez des patients parkinsoniens ou atteints de maladie de Huntington, dans un essai clinique de phase I. Un an après la transplantation, une amélioration modérée du score clinique d'évaluation avait été notée chez les patients parkinsoniens, mais pas chez ceux atteints de maladie de Huntington. L'autopsie d'un des patients a cependant révélé qu'un petit nombre de neurones xénogéniques avaient survécu plusieurs mois, suggérant qu'ils avaient été rejetés [4].

Dans tous les cas où une xéno greffe pourrait physiologiquement remplacer une fonction déficiente, la principale barrière à son utilisation chez l'homme sera probablement liée à une incompatibilité immunologique. Nombreux sont les chercheurs qui considèrent cependant que cet aspect pourra être résolu, tout d'abord par la modification de l'immunogénicité des tissus porcins par génie génétique (on a parlé d'«humanisation»), et ensuite par la mise au point de protocoles d'induction d'une tolérance immunitaire.

### Quelle approche pour quel type de rejet ?

Expérimentalement, dans les combinaisons d'espèces où le receveur possède des anticorps dirigés contre le donneur, un rejet qualifié d'hyperaigu survient quelques minutes à quelques heures après la revascularisation du greffon. C'est le cas notamment des combinaisons porc/babouin et porc/homme. Ces combinaisons dans lesquelles des anticorps naturels xénogéniques (ANX) sont directement responsables du rejet sont appelées discordantes. La cible porcine des ANX chez les primates et chez l'homme est très majoritairement constituée par le motif disaccharidique Gal $\alpha$ 1-3Gal présent sur les protéines et les lipides à la surface des cellules du donneur, en particulier à la surface des cellules endothéliales (CE). Ces ANX, d'isotypes IgG et IgM, possèdent une affinité élevée et sont directement responsables du rejet hyperaigu [13]. La forte densité de l'épitope Gal $\alpha$ 1-3Gal permet aux anticorps de se fixer massivement à l'endothélium [14] et d'activer le complément. La fixation de celui-ci provoque une activation de type I de l'endothélium, qui consiste en une acquisition rapide d'un phénotype

procoagulant, sans activation de gènes ni synthèse de protéines. Cela aboutit à la dissociation des cellules endothéliales, entraînant une suffusion hémorragique et une thrombose des gros vaisseaux [15].

Afin de prévenir l'apparition du rejet hyperaigu, il est possible de dépléter les anticorps xénoréactifs par plasmaphérèse [16] ou immunoadsorption. Les inhibiteurs du complément tels que le facteur de venin de cobra [17], le CR1 soluble (*complement receptor 1*) [18] et le sulfate de dextran [19] prolongent également la survie du greffon. L'activité du complément sur l'endothélium est normalement contrôlée par des protéines régulatrices telles que le DAF (*decay accelerating factor*), le CD59 ou la MCP (*membrane cofactor protein*). Cependant, ces protéines interagissent de façon spécifique d'espèce avec leur cible. Ainsi, dans la combinaison porc/homme, le DAF porcine ne peut régler efficacement l'activation du complément humain [20]. Il a donc été envisagé de contrôler le rejet hyperaigu en utilisant des animaux transgéniques pour ces molécules régulatrices. Des porcs transgéniques pour le DAF [21] et/ou le CD59 [22] humains ont été produits et utilisés avec succès dans des modèles de greffe cardiaque [23], rénale [24] ou hépatique [7]. Néanmoins, en l'absence de tout traitement, la prolongation obtenue ne dépasse pas quelques jours, les organes étant rejetés par un mécanisme appelé rejet vasculaire aigu (AVR) ou rejet retardé. Il se caractérise par une activation de type II de l'endothélium, conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (interleukines 1 et 8) et de molécules d'adhérence comme VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et la sélectine E, ainsi qu'à la production d'un environnement procoagulant, notamment par perte de la thrombomoduline. Lors de l'AVR, on observe de façon concomitante une forte augmentation du titre sérique des anticorps xénoréactifs IgM et IgG. Ces anticorps sont principalement dirigés contre l'épitope Gal $\alpha$ 1-3Gal, mais également contre d'autres épitopes porcins [25]. La fixation des IgG sur l'endothélium peut non seulement activer le complément, mais aussi induire l'activation des cellules NK (*natural killer*) via une interaction entre le fragment Fc des IgG et le Fc $\gamma$ RIII de ces cellules [26]. À ce jour, les différents traitements visant à surmonter l'AVR ont eu une efficacité limitée: des combinaisons associant plusieurs immunosuppresseurs (ciclosporine A, corticostéroïdes, cyclophosphamide, mycophénolate, mofétile), de même que la déplétion des anticorps xénoréactifs par plasmaphérèse ou par injection de polymères Gal n'ont pas permis d'obtenir une survie supérieure à 3 mois, les animaux subissant un AVR ou mourant de complications infectieuses dues à l'immunosuppression [27].

### Les porcs Gal-KO

Le rôle prédominant des anticorps xénoréactifs dans le rejet hyperaigu et l'AVR, ainsi que la difficulté existant à surmonter ces rejets ont conduit à l'idée, en 1993, que la suppression de

l'expression du motif Gal $\alpha$ 1-3Gal pourrait être une solution de choix au rejet humoral en xénotransplantation [28]. La technique du transfert de noyau, apparue en 1996, a permis de produire en 2001 les premiers porcs hétérozygotes pour une forme inactive de l' $\alpha$ 1,3-galactosyltransférase, l'enzyme responsable de la glycosylation Gal $\alpha$ 1-3Gal. L'année suivante, des porcs dont les deux allèles de l' $\alpha$ 1-3galactosyltransférase avaient été invalidés (porcs Gal-KO) ont vu le jour [29]. Les premiers résultats dans des modèles de greffes cardiaque et rénale sous traitement immunosuppresseur fort (mycophénolate mofétil, stéroïdes, splénectomie et/ou thymectomie) montrent une absence d'AVR et une survie plus longue, jusqu'à 100 jours [30]. Cependant, en fonction des traitements, des signes plus ou moins prononcés de microangiopathie thrombotique ont été observés dans la plupart des greffons [31, 32]. Cette microangiopathie évoque l'induction d'anticorps dirigés contre d'autres déterminants que le Gal $\alpha$ 1-3Gal. La transgénèse porcine pourrait contribuer à contrôler ce phénomène, en particulier en permettant l'expression d'inhibiteurs du facteur tissulaire et d'antithrombine [33, 34].

Enfin, le traitement immunosuppresseur utilisé a provoqué des effets secondaires importants, et les conséquences d'une éventuelle réduction de ce traitement sur la réponse immune du receveur ne sont pas connues. Les résultats préliminaires actuels ne suggèrent pas que les avancées concernant la modification du donneur puissent permettre cette réduction. La connaissance des cibles des anticorps non dirigés contre les motifs Gal $\alpha$ 1-3Gal et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le rejet cellulaire sont donc essentielles pour pouvoir adapter les traitements, voire induire une tolérance du receveur vis-à-vis de son greffon.

## Rejet cellulaire

Le rejet cellulaire est le type de rejet le plus fréquemment observé dans les modèles expérimentaux d'allogreffe. Il implique une activation oligoclonale des lymphocytes T. En xénotransplantation, l'obtention récente des porcs Gal-KO n'a pas encore permis d'étudier en détails les caractéristiques du rejet cellulaire des organes porcins dans les modèles de primates. Néanmoins, des études menées dans la combinaison hamster/rat ont montré que l'activation lymphocytaire est polyclonale, et qu'elle survient plus rapidement qu'en allogreffe, suggérant une grande diversité des peptides présentés [35]. Deux hypothèses, mutuellement non exclusives, coexistent : l'activation lymphocytaire résulterait d'une interaction directe avec des cellules présentatrices d'antigène (CPA) du donneur, ou d'une interaction avec des CPA du receveur présentant des peptides xénogéniques (voie indirecte). Bien que la voie indirecte de présentation antigénique soit sans aucun doute impliquée, la voie directe de présentation des xéno-antigènes peut être très importante. En effet, la réactivité croisée du TCR

(récepteur des cellules T) humain avec les CMH (complexes majeurs d'histocompatibilité) porcins, démontrée *in vitro* [36], est sensiblement du même ordre qu'en allogreffe; elle peut être inhibée par des anticorps dirigés contre les molécules du CMH porcine et contre les corécepteurs CD4 et CD8 ou les molécules de costimulation, notamment CD28, CD2 ou LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen 1*) [37]. Il existe donc une compatibilité moléculaire suffisante entre les CPA porcines et les lymphocytes T humains pour créer une synapse immunologique efficace permettant au rejet par la voie directe de survenir. À ce titre, l'expression constitutive d'activateurs de la costimulation (CD86) et l'expression inductible d'antigènes d'histocompatibilité de classe II par les cellules endothéliales porcines en font une cible permanente pour les lymphocytes humains par la voie directe de présentation xéno-antigénique [36]. Cette situation constitue une différence majeure par rapport à l'allogreffe où l'endothélium (humain) n'exprime pas de façon constitutive les molécules activatrices de la costimulation, et suggère que des porcs dont les gènes codant pour les molécules du CMH de classe II et pour la molécule CD86 ont été invalidés pourraient offrir d'importants avantages.

## Tolérance xénogénique

En allogreffe, les risques infectieux ainsi que l'augmentation de l'incidence des cancers dus à l'immunosuppression actuellement utilisée en clinique conduisent les chercheurs à mettre au point des protocoles d'induction de tolérance. On recherche soit une tolérance totale (la greffe est fonctionnelle en l'absence de tout traitement immunosuppresseur), soit l'utilisation d'une immunosuppression minimale. Cette problématique revêt un intérêt fondamental en xénotransplantation, dans la mesure où les traitements immunosuppresseurs actuellement requis sont incompatibles avec la clinique humaine. L'induction d'une tolérance à l'allogreffe chez les primates peut être obtenue par une greffe de moelle osseuse qui, grâce à la création d'un chimérisme hématopoïétique, permet la délétion des clones alloréactifs dans le thymus. L'induction d'un chimérisme hématopoïétique permet également la survie prolongée des xéngreffes concordantes (babouin sur macaque) [38], mais pas des xéngreffes discordantes (porc sur babouin) [39]. La délétion des cellules T xénoréactives recherchée par les expériences de greffe de moelle peut également être obtenue - de manière semble-t-il plus efficace - par une greffe de fragments thymiques du donneur (Figure 1) : ces fragments peuvent être placés sous la capsule rénale plusieurs semaines avant le prélèvement, afin de permettre la création d'un environnement thymique vascularisé. Le jour de la greffe, c'est alors un « thymus-rein » qui est greffé et permet la délétion des lymphocytes T xénoréactifs [40]. Cette opération est associée à un taux de survie plus important des xéngreffes discordantes [32].

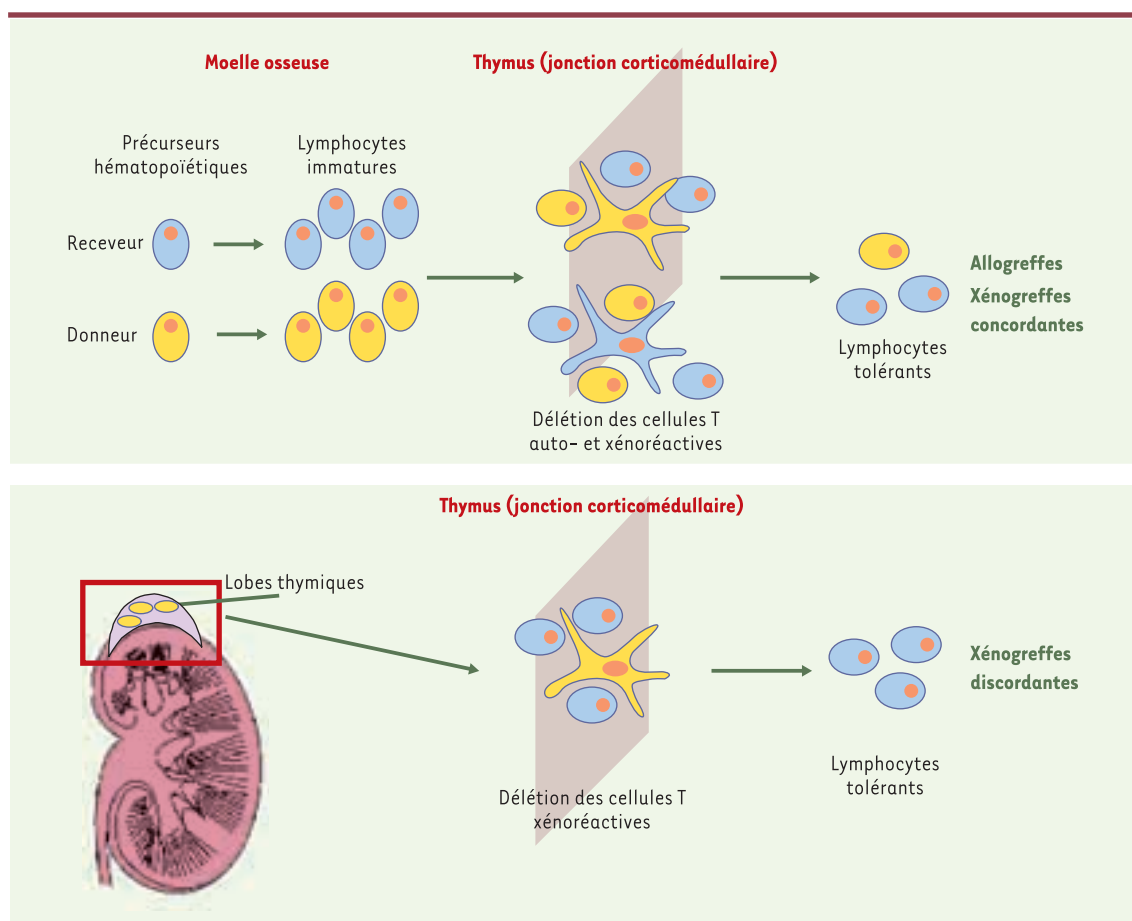
## Les stratégies d'immuno-intervention fonctionnent-elles en xénotransplantation ?

Les modifications par génie génétique des tissus porcins, l'adaptation de l'immunosuppression, ainsi que les protocoles d'induction de tolérance ont eu un impact certain sur la survie moyenne des xéngreffes chez les primates. À présent, des survies de l'ordre de 2 à 4 mois peuvent être obtenues (Tableau 1). D'après ces résultats, les voies immunologiques à privilégier pour une application clinique semblent donc être une combinaison de modifications génétiques du donneur (dont Gal-KO) associées à l'induction d'une tolérance et à l'utilisation d'immunosuppresseurs. Les modifications génétiques pourraient inclure la production de porcs dont les gènes codant pour CD86 ou pour les antigènes

de CMH de classe II ont été invalidés, ou de porcs surexprimant des inhibiteurs de la coagulation.

### Risque sanitaire

À la différence de l'allotransplantation, et à condition de maintenir les animaux dans des conditions EOPS (exemptes d'organismes pathogènes spécifiques), il est possible d'éviter la transmission de la plupart des agents infectieux, dont le cytomégalovirus [41]. Cependant, un risque majeur concerne les virus endogènes intégrés dans le génome porcine : les PERV (*porcin endogenous retrovirus*) A, B et C. *In vitro*, les PERV peuvent infecter de façon productive des cellules humaines [42]. Cependant, plusieurs études menées chez des patients ayant brièvement été en contact avec des tissus porcins n'ont pas montré de signes d'infection [43-45], ce qui suggère que cette transmission ne se produit pas *in vivo*. Néanmoins, le risque infectieux pourrait augmenter



**Figure 1. Chimérisme hématopoïétique et délétion thymique.** Chez les primates, une greffe de moelle osseuse du donneur, préalablement à la greffe, peut induire un chimérisme hématopoïétique et la création d'un environnement thymique permettant la délétion des cellules T alloréactives et xénoréactives. La greffe de fragments de thymus porcine sous la capsule rénale avant la greffe permet la re-création d'un thymus porcine vascularisé, qui opère cette délétion thymique sans chimérisme hématopoïétique (le jour de la greffe, c'est alors un « thymus-rein » qui est greffé).

avec l'utilisation des porcs Gal-KO. En effet, les PERV sont entourés d'une membrane cellulaire issue des cellules du donneur, qui contient donc des résidus Gal $\alpha$ 1-3Gal permettant leur neutralisation par les anticorps naturels xénogéniques et le complément [46]. Les essais en cours chez les primates devraient permettre d'étudier *in vivo* l'infectivité des PERV issus de porcs Gal-KO, et de répondre à la question de leur dangerosité.

### Acceptabilité psychosociale de la xénotransplantation

Une étude menée auprès d'une centaine de patients greffés ou en attente de greffe a permis d'émettre certaines hypothèses quant à l'acceptabilité psychique d'une xénotransplantation (Michèle Fellous, rapport 2003 à l'Établissement français des greffes). Trois profils différents se sont dégagés parmi les patients interrogés: ceux qui acceptent sans condition l'idée d'une xénotransplantation (45%), ceux qui la refusent radicalement (30%) et les patients qui posent des conditions (25%).

Parmi les personnes acceptant sans condition l'idée d'une xénotransplantation, on retrouve celles pour qui l'urgence extrême de la situation justifie un choix, comme si le patient était dans une impasse, et celles qui banalisent la transplantation d'organe en en faisant une pièce mécanique à changer pour remettre l'ensemble en état de marche. Il y a alors désinvestissement de l'organe greffé, qu'il soit humain, animal ou artifi-

ciel. Les uns comme les autres expriment leur confiance, voire leur soumission, à la science et la médecine, comme s'il y avait une inéluctabilité à leurs avancées. Les patients qui refusent la xénotransplantation voient une différence radicale entre espèce humaine et espèces animales. À ce titre, l'organe animal serait plus difficilement intégrable, physiquement et psychologiquement. Ces patients demandent à ce que l'on reste entre humains, qu'un effort se poursuive pour accroître la solidarité afin d'augmenter les dons. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, cette position est plus éthique que religieuse, même si elle est adoptée par quelques patients qui se disent croyants. On trouve d'ailleurs dans la catégorie des patients favorables aux xéno greffes des personnes affirmant une pratique religieuse: elles font alors de la greffe une intervention purement technique qui n'interfère pas avec leur croyance. Enfin, les patients de la troisième catégorie posent des conditions et demandent plus d'informations. Il leur est difficile de se prononcer hors situation. Ils insistent sur une préparation psychologique avant et après la greffe. Ils se montrent confiants mais critiques envers la science, exprimant une crainte de dérive utopiste. En fait, chez l'ensemble des personnes interrogées, la plupart ignore tout des organismes génétiquement modifiés et, de ce fait, de la nature même des éventuelles xéno greffes pour lesquelles ils ont potentiellement donné leur accord, ainsi que de la nature et la mesure des risques encourus.

Certaines réticences doivent être envisagées: on peut ainsi craindre une banalisation de la greffe d'un organe animal, donnant l'illusion que les patients puissent être dispensés d'une réflexion sur le «tremblement de terre» que constitue une greffe d'organe. Par ailleurs, il existe un risque de désinvestissement du don d'organes humains si les xénotransplantations se banalisaient. En effet, loin d'être seulement un organe vital, l'organe humain greffé provient du don volontaire d'un humain à un autre humain, et est à ce titre précieusement investi. Réduit à une matière vivante animale, il simplifiera certainement les

Porc donneur	Traitement/Manipulation	Survie	Organe
Normal	Sans traitement	Quelques heures	Rein [47], cœur [48]
Normal	IS classique	Minutes à heures	Cœur [49]
Normal	IS novatrice + greffe de moelle	3 à 15 jours	Cœur et rein [39]
Transgénique pour une MRCh	Sans traitement	< une semaine	Rein [27]
Transgénique pour une MRCh	IS classique	Quelques heures à 3 mois	Cœur [50, 51], rein [27]
Transgénique pour une MRCh	IS novatrice	3 jours à 4 mois et demi	Cœur [52, 11]
Transgénique pour une MRCh	IS + « thymus-rein »	Jusqu'à un mois	Rein [40]
Transgénique pour une MRCh	Sans traitement	< une semaine	Cœur [23], rein [53]
Gal KO	IS classique	1 mois (n = 1)	Rein [54]
Gal KO	IS classique+ « thymus-rein »	Environ 2 mois et demi (n = 1)	Rein [32]

**Tableau 1. Survies de xéno greffes porc/primat en fonction des manipulations effectuées sur le donneur et/ou le receveur.** MRCh: molécule régulatrice du complément humain (CD55, CD59, CD46); IS: immunosuppression.

dilemmes que le patient greffé doit résoudre, en particulier celui de l'impossibilité de pouvoir remercier celui à qui il doit sa survie. Mais la question est également posée de savoir si la xénotransplantation ne sera pas perçue comme un soin nécessitant une extrême compétence, certes, mais qui, à long terme, affecterait le geste solidaire de faire don de ses organes. Cela poserait un problème dans le cas où la xéno greffe ne fonctionnerait que comme une « prothèse biologique » placée en attente d'une greffe d'origine humaine.

## Conclusions

Avec la production des porcs dont le gène codant pour l' $\alpha 1,3$ -galactosyltransférase (porcs Gal-KO) a été invalidé, la recherche en xénotransplantation vient de franchir un obstacle majeur, même si de nombreuses questions demandent encore à être résolues avant une éventuelle application à l'homme. Il existe aujourd'hui un consensus, en cas de greffe de rein, pour n'envisager une telle application clinique qu'après avoir obtenu la survie d'une greffe fonctionnelle pendant plus d'un an chez le primate. La possibilité d'une utilisation temporaire (*bridge*) dans les indications de cardiologie ou d'hépatologie est également discutée. L'exigence sécuritaire est également une condition à la réalisation de xéno greffes: ainsi, une absence d'infectiosité des tissus porcins devra être démontrée, et la possibilité de voir des xéno greffes réalisées par des équipes ne pratiquant pas de contrôle sanitaire suffisant (pratique qui pourrait être qualifiée de « xénotourisme ») constitue un risque que les pays « développés » ne peuvent ignorer. ♦

## SUMMARY

### On the acceptability of xenografts

Transplantation represents a major advance in modern medicine with a major impact on the interactions between individuals and society. The numbers of patients undergoing organ transplantation increased steadily over the years and around 250,000 individuals are living nowadays in Europe with a transplanted organ. On the other hand, the numbers of cadaveric (brain-dead) donors used for organ transplantation remains stable, at around 5,000 each year, and the numbers of transplantation from living donors only slowly increase in Europe. Therefore, a gap is growing between the numbers of patients in need of a transplant and the numbers of organs available for transplantation. About 45,000 patients are currently on renal transplant waiting lists in Europe and, depending on the countries considered, 15 to 30% of candidates for liver or heart transplantation die before a life-saving transplant becomes available to them. There is therefore an urgent need to implement innovative research and to take full advantage of recent biotechnological advances to explore new avenues in xenotransplantation, and to simultaneously address the ethical, societal and public health issues related to organ replacement.

Much progresses have been accomplished in the understanding of xenograft rejection processes that include hyperacute, acute vascular and cellular rejection mechanisms. Strategies to promote xenograft survival that are currently under evaluation include genetic engineering of donor pigs, adapted immunosuppressive treatments and tolerance induction. Also, the psychological acceptance has been evaluated. ♦

## RÉFÉRENCES

1. Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU, et al. Heterotransplantation of the kidney: two clinical experiences. *Science* 1964; 143: 700-2.
2. Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, et al. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* 1985; 254: 3321-9.
3. Groth CG. Deoxyspergualin in allogeneic kidney and xenogeneic islet transplantation: early clinical trials. *Ann NY Acad Sci* 1993; 685: 193-5.
4. Fink JS, Schumacher JM, Elias SL, et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 2000; 9: 273-8.
5. Soin B, Smith KG, Zaidi A, et al. Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. *Kidney Int* 2001; 60: 1592-7.
6. Cozzi E, Bhatti F, Schmoekel M, et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 2000; 70: 15-21.
7. Ramirez P, Chavez R, Majado M, et al. Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days. *Transplantation* 2000; 70: 989-98.
8. Starzl TE, Fung J, Tzakis A, et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341: 65-71.
9. Daggett CW, Yeatman M, Lodge AJ, et al. Total respiratory support from swine lungs in primate recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 19-27.
10. Waterworth PD, Dunning J, Tolan M, et al. Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 1201-7.
11. Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJ, et al. Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154 mAb-based regimen. *Am J Transplant* 2004; 4: 363-72.
12. Kirchof N, Shibata S, Wijkstrom M, et al. Reversal of diabetes in non-immunosuppressed rhesus macaques by intraportal porcine islet xenografts precedes acute cellular rejection. *Xenotransplantation* 2004; 11: 396-407.
13. Kroshus TJ, Bolman RM, 3rd, Dalmaso AP. Selective IgM depletion prolongs organ survival in an *ex vivo* model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation* 1996; 62: 5-12.
14. Vanhove B, Bach FH. Human xenoreactive natural antibodies. Avidity and targets on porcine endothelial cells. *Transplantation* 1993; 56: 1251-3.
15. Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, et al. Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J Exp Med* 1990; 171: 1363-8.
16. Xu Y, Lorf T, Sablinski T, et al. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma *in vitro* and *in vivo* by a Gal- $\alpha 1-3$ Gal-beta1-4betaGlc-X immunoaffinity column. *Transplantation* 1998; 65: 172-9.
17. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, et al. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 1993; 55: 857-66.
18. Candinas D, Lesnikoski BA, Robson SC, et al. Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996; 62: 336-42.
19. Laumonier T, Mohacs PJ, Matozan KM, et al. Endothelial cell protection by dextran sulfate: a novel strategy to prevent acute vascular rejection in xenotransplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 181-7.
20. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Platt JL, et al. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 1991; 52: 530-3.
21. Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1995; 1: 964-6.
22. Diamond LE, McCurry KR, Martin MJ, et al. Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation* 1996; 61: 1241-9.
23. McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, et al. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* 1995; 1: 423-7.

24. Loss M, Vangerow B, Schmidtko J, et al. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model. *Xenotransplantation* 2000; 7: 186-96.
25. Dehoux JP, de la Parra B, Latinne D, et al. Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation* 2002; 9: 338-49.
26. Schaapherder AF, Daha MR, te Bulte MT, et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against porcine endothelium induced by a majority of human sera. *Transplantation* 1994; 57: 1376-82.
27. Ashton-Chess J, Roussel J, Bernard P, et al. The effect of immunoglobulin immunoadsorption on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons. *Xenotransplantation* 2003; 10: 552-61.
28. Cooper DK, Koren E, Oriol R. Genetically engineered pigs. *Lancet* 1993; 342: 682-3.
29. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089-92.
30. Houser SL, Kuwaki K, Knosalla C, et al. Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation* 2004; 11: 416-25.
31. Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, et al. Heart transplantation in baboons using  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 2005; 11: 29-31.
32. Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 2005; 11: 32-4.
33. Chen D, Riesbeck K, McVey JH, et al. Human thrombin and FXa mediate porcine endothelial cell activation. Modulation by expression of TFPI-CD4 and hirudin-CD4 fusion proteins. *Xenotransplantation* 2001; 8: 258-65.
34. Riesbeck K, Chen D, Kemball-Cook G, et al. Expression of hirudin fusion proteins in mammalian cells: a strategy for prevention of intravascular thrombosis. *Circulation* 1998; 98: 2744-52.
35. Sebille F, Guillet M, Brouard S, et al. T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *Am J Transplant* 2001; 1: 21-8.
36. Murray AG, Khodadoust MM, Pober JS, et al. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* 1994; 1: 57-63.
37. Rollins SA, Kennedy SP, Chodera AJ, et al. Evidence that activation of human T cells by porcine endothelium involves direct recognition of porcine SLA and costimulation by porcine ligands for LFA-1 and CD2. *Transplantation* 1994; 57: 1709-16.
38. Bartholomew AM, Powelson J, Sachs DH, et al. Tolerance in a concordant nonhuman primate model. *Transplantation* 1999; 68: 1708-16.
39. Kozlowski T, Shimizu A, Lambripts D, et al. Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regimen and antibody adsorption. *Transplantation* 1999; 67: 18-30.
40. Barth RN, Yamamoto S, LaMattina JC, et al. Xenogeneic thymokidney and thymic tissue transplantation in a pig-to-baboon model. I. Evidence for pig-specific T-cell unresponsiveness. *Transplantation* 2003; 75: 1615-24.
41. Gollackner B, Mueller NJ, Houser S, et al. Porcine cytomegalovirus and coagulopathy in pig-to-primate xenotransplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1841-7.
42. Martin U, Winkler ME, Id M, et al. Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* 2000; 7: 138-42.
43. Paradis K, Langford G, Long Z, et al. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 study group. *Science* 1999; 285: 1236-41.
44. Levy MF, Crippin J, Sutton S, et al. Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 2000; 69: 272-80.
45. Elliott RB, Escobar L, Garkavenko O, et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant* 2000; 9: 895-901.
46. Rother RP, Squinto SP. The alpha-galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell* 1996; 86: 185-8.
47. Alexandre GP, Gianello P, Latinne D, et al. Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation. In: Hardy MA, ed. *Xenograft* 25. New York: Excerpta Medica, 1989: 259-66.
48. Fischel RJ, Matas AJ, Platt JL, et al. Cardiac xenografting in the pig-to-Rhesus monkey model: manipulation of antiendothelial antibody prolongs survival. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 965-74.
49. Ye Y, Neethling FA, Niekrasz M, et al. Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts. *Transplantation* 1994; 58: 330-7.
50. Schmoekel M, Bhatti FN, Zaidi A, et al. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation* 1998; 65: 1570-7.
51. Bhatti FN, Schmoekel M, Zaidi A, et al. Three-month survival of HDAFF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc* 1999; 31: 958.
52. McGregor CGA, Teotia SS, Schirmer JM, et al. *Cardiac xenotransplantation: 4-1/2 month survival in the laboratory*. Abstracts of the seventh congress of the International xenotransplantation association, Glasgow, 2003. *Xenotransplantation* 2003; 10: 479-537.
53. Menoret S, Plat M, Blanco G, et al. Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation* 2004; 77: 1468-71.
54. Yamada K, Yazawa K, Kamono C, et al. *An initial report of alpha-Gal deficient pig-to-baboon renal xenotransplantation: evidence for the benefit of cotransplanting vascularised donor thymic tissue*. Abstracts of the seventh congress of the International xenotransplantation association, Glasgow, 2003. *Xenotransplantation* 2003; 10: 479-537.