

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

										16
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Propriétés immunosuppressives des cellules souches et étude de la réponse humorale en xénotransplantation intracérébrale

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, médecine et santé

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Elodie MATHIEUX

Le 18 octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Président : Christelle MONVILLE, Professeur, Evry

Rapporteurs : François FERON, Professeur, Marseille
Serge NATAF, Professeur, Lyon

Examineur : Christelle MONVILLE, Professeur, Evry

Directeur de thèse :

Philippe NAVEILHAN, Chargé de Recherche, Nantes

Co Encadrant de thèse :

Isabelle NEVEU, Chargée de Recherche, Nantes

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Pr. Serge Nataf et le Pr. François Féron pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'évaluer ce travail. Je remercie également le Pr Christelle Monville pour avoir accepté de participer au jury.

Je remercie le Docteur Ignacio Anegon pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire INSERM UMR 1064 à Nantes, dont la thématique de recherche porte sur « l'Immunointervention dans les Allo et Xenotransplantations » et de m'avoir permis d'intégrer son équipe durant ma dernière année de thèse.

*

Je voudrais sincèrement remercier le Dr Philippe Naveilhan de m'avoir dirigée durant cette thèse et de m'avoir accueillie au sein de l'équipe « Transplantation, plasticité neuronale et cellules souches ». Merci à vous pour votre disponibilité, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche depuis mon arrivée en master. Je tiens aussi à remercier le Dr Isabelle Neveu pour m'avoir co-encadrée, pour nos discussions, son soutien et pour toutes ses corrections et la relecture attentionnée de ce manuscrit.

*

Je tiens particulièrement à remercier le Dr Laurent Lescaudron pour ses précieux conseils et son dévouement pour tous les étudiants. Un grand merci à tous les membres de l'association CECAP de m'avoir financée durant mes 3 années de thèse et en particulier à Mme Geffard pour sa bonne humeur et son intérêt pour tous nos travaux.

Un jour, après la publication d'un article dans le journal de l'association, j'ai reçu un courrier de membre à mon adresse personnelle me remerciant pour mes recherches. Ce jour là, j'ai été très touchée et confortée dans l'idée de faire ce travail car derrière nos petites expériences, il y a des gens dans l'attente.

Un grand merci à Véro, pour sa disponibilité, ses conseils toujours donnés avec le sourire, son soutien et son aide précieuse. Merci à Xavier de m'avoir formée et encadrée en master et pour tous ces conseils. Merci aux anciens neuros pour m'avoir intégrée dans l'équipe : Virginie, Faustine, Julie, Hélène.

Merci aux membres de l'abbatoir et aux chauffeurs de l'INRA de Nouzilly pour leur sympathique accueil à chacune de mes visites.

Je remercie particulièrement toutes les personnes du laboratoire U1064 pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide : Flora, Caro, Laurence, Reynald, Françoise, Michelle, Séverine R, Séverine M, Laurent T, Thomas, Jessica, Laure-Hélène, Amélie, Matthias, Mélanie, Claire, Vanessa, Serge, Joelle, Sylvie, Laurence, Manu (le futur aventurier de Koh Lanta), Claire, Fred...et les autres.

*

Merci à mon bureau pour nos délires, nos petites (et longues) discussions autour d'un café sur les on et off du labo : Séverine pour sa bonne humeur, toujours à nous remotiver et à nous soutenir, aujourd'hui devenue une amie, Elo P pour son soutien, son amitié, Claire, Sabrina et les dentistes pour leur gentillesse et aux anciens : Anne-Laure et un merci particulier à Anne et Virginie pour leur motivation et pour nous faire découvrir tous les aspects de la recherche, vous êtes vraiment des super personnes et les championnes des off des labos. Un énorme merci à toi, Antoine, mon coéquipier de la neuro, on s'est toujours soutenu mutuellement durant cette thèse et je te remercie pour ton amitié et pour les supers moments passés au labo, en soirée ou pendant les congrès. On restera à jamais le dernier duo de la neuro à l'U1064 !!!

Bien sûr un grand merci à Alex, la bretonne Marion, Elo P, Annie, Antoine, Angélique, Juju, Sév pour m'avoir accompagnée dans les bons et mauvais moments de cette thèse, pour nos soirées et tous les moments particuliers que nous avons partagés et à toutes les personnes de l'équipe 10 !!! : Flora, Mélanie C, Athé, Laura, Gaëlle, Laetitia la nouvelle australienne, Laetitia la toulousaine et Mélanie N.

Un grand merci à mes amis hors labo pour leur soutien et les bons moments que l'on peut partager ensemble : Manu, Elise, François, Céline, Jaff, Mumu, Atchoum.

*

Et enfin et surtout, des grands merci à ma famille.

Merci à ma belle-famille pour leur soutien : Aurélie, Christophe, Gégé, Ludo, Manuel et Françoise pour avoir corrigé mon orthographe, mon grand frère adoré Steph et Gégé, ainsi que tous mes neveux et nièces pour me faire toujours rire : Antoine, les Romane, Candice, Erine, Martin et le futur Pifort!

Je n'ai pas assez de superlatifs pour remercier mes parents, Papa, Maman vous m'avez toujours soutenue, conseillée en me laissant faire mes propres choix, je vous aime profondément et cette thèse est pour vous.

Et bien sûr, un énorme merci à l'homme de ma vie, mon mari Thomas. Tu as toujours été là pour moi, tu as su me remotiver, me donner confiance et tu as surtout tout assuré, tu acceptes beaucoup de choses pour mon travail et je te remercierai jamais assez. Je t'aime et cette thèse est la notre.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
AVANT-PROPOS	15
INTRODUCTION	17
I. La transplantation intracérébrale : application à la maladie de Parkinson	18
I-1. La maladie de Parkinson : description et principales thérapeutiques	18
I-1.1. Signes cliniques	18
I-1.2. Physiopathologie.....	19
I-1.2.1. La dégénérescence neuronale	19
I-1.2.2. Les corps de Lewy	21
I-1.3. Etiologie.....	22
I-1.3.1. Les facteurs environnementaux	23
I-1.3.2. Les facteurs génétiques.....	23
I-1.4. La neuroinflammation dans la MP : stress oxydatif et rôle de la microglie	25
I-1.4.1. Le stress oxydatif.....	25
I-1.4.2. Rôle de la microglie.....	26
I-1.5. Les stratégies thérapeutiques	27
I-1.5.1. Les traitements pharmacologiques.....	27
I-1.5.2. Interventions chirurgicales.....	29
I-1.5.3. Stratégies de neuroprotection.....	30
▪ Thérapie anti-inflammatoire	30
▪ Facteurs neurotrophiques.....	30
I-1.5.4. La thérapie cellulaire	31
I-2. Les différentes stratégies de transplantation	32
I-2.1. L'autotransplantation	32
I-2.1.1. La médullosurrénale	32

I-2.1.2. Le corps carotidien.....	32
I-2.2. L'allotransplantation.....	33
I-2.2.1. L'expérimentation animale	33
I-2.2.2. Les essais cliniques	33
I-2.2.3. Les limites de l'allotransplantation.....	35
I-2.3. La xénotransplantation de tissus porcins	37
I-2.3.1. Avantages	37
I-2.3.2. Les risques (sanitaires et infectieux).....	38
I-2.3.3. L'expérimentation animale	38
I-2.3.4. Les essais cliniques.....	39
II. Caractérisation du rejet des xénogreffes intracérébrales	41
II-1. Le statut immunologique du système nerveux central	41
II-1.1. La structure anatomique du SNC	41
II-1.1.1. Architecture	41
II-1.1.2. Structure et fonction de la BHE.....	42
▪ Structure de la BHE.....	42
▪ Fonction de la BHE	45
II-1.2. La circulation leucocytaire	46
II-1.2.1. Le drainage lymphatique particulier.....	46
II-1.2.2. La migration leucocytaire	48
II-1.3. Les cellules immunocompétentes du SNC	51
II-1.3.1. Les cellules microgliales	51
II-1.3.2. Les macrophages périvasculaires	52
II-1.3.3. Les astrocytes	52
II-2. Le rejet des xénogreffes intracérébrales	53
II-2.1. L'absence de rejet hyper aigu.....	54
II-2.2. Le rejet cellulaire.....	54
II-2.2.1. Implication des cellules microgliales	54
II-2.2.2. Implication des astrocytes	55
II-2.2.3. Rôle des cellules NK	56
II-2.2.4. Rôle des cellules dendritiques	56
II-2.2.5. Rôle des cellules T.....	57
▪ Les cellules T CD4	57
▪ Les cellules T CD8	59

▪ Mécanisme d'activation des cellules T	59
II-2.2.6. Cinétique de l'infiltration des cellules immunes dans une xénogreffe intracérébrale de cellules neurales porcines	61
II-2.3. Le rejet humoral : un rôle encore peu décrit.....	62
II-2.3.1. Le système du complément	62
II-2.3.2. Rôle des anticorps.....	63
▪ Production par les cellules B	63
▪ Structure des anticorps	64
▪ Rôle des anticorps dans le rejet	65
III. Les cellules souches comme source cellulaire : propriétés trophiques et immunorégulatrices.....	67
III-1. Caractéristiques des cellules souches	67
III-1.1. Propriétés	67
III-1.2. Les cellules souches embryonnaires	68
III-1.3. Les cellules souches multipotentes	71
III-2. Les cellules souches mésenchymateuses.....	72
III-2.1. Caractéristiques	72
III-2.2. Propriétés trophiques des CSM.....	74
III-2.3. Propriétés immunomodulatrices des CSM.....	74
III-2.3.1. Etudes <i>in vitro</i>	75
▪ Les cellules dendritiques	75
▪ Les cellules T.....	75
▪ Les cellules NK	76
▪ Les cellules B	76
▪ Mécanismes immunosuppresseurs des CSM.....	76
III-2.3.2. Etudes <i>in vivo</i>	78
III-3. Les cellules souches/progénitrices neurales.....	79
III-3.1. Propriétés	79
III-3.1.1. Caractéristiques des CSN.....	79
III-3.1.2. Distinction entre cellules souches et cellules progénitrices	80
III-3.2. Localisation des CSPN.....	80
III-3.2.1. Chez l'embryon.....	80
III-3.2.2. Chez l'adulte	81
III-3.3. Culture et différenciation des CSPN	82

III-3.3.1. Culture des CSPN	82
III-3.3.2. Différenciation des CSPN	83
III-3.4. Intérêts thérapeutiques des CSPN	84
III-3.4.1. Le remplacement cellulaire	84
III-3.4.2. Propriétés trophiques des CSPN	85
III-3.4.3. Propriétés migratoires des CSPN	86
III-3.4.4. Propriétés immunomodulatrices des CSPN	86
III-4. Les cellules iPS	88
III-4.1. Propriétés	88
III-4.2. Vers une utilisation en transplantation	90
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	92
RESULTATS	94
ARTICLE 1	95
Advantages of mesenchymal stem cells for the long term survival of intracerebral xenotransplant.....	95
Introduction	96
ARTICLE	99
Discussion	123
ARTICLE 2	128
Expression of Heme Oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host immune response	128
Introduction	129
ARTICLE	131
Discussion	143
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	148
Etude préliminaire de l'action immunosuppressive de cellules souches/progénitrices neurales dérivées de cellules souches pluripotentes induites humaines	148
ARTICLE 3.....	153

IgG response to intracerebral xenotransplantation: specificity and role in the rejection of porcine neurons.....	153
Introduction	154
ARTICLE	156
Discussion	181
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	185
CONCLUSION.....	190
BIBLIOGRAPHIE	191
ANNEXES	247

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La voie nigro-striée.....	19
Figure 2 : Organisation des ganglions de la base dans un contexte normal (A) et lors de la MP (B.).....	20
Figure 3 : Stades de la progression de la dégénérescence neuronale dans la MP selon la théorie de Braak.	21
Figure 4 : Les corps de Lewy.	22
Figure 5 : Métabolisme de la dopamine et production de dérivés réactifs de l'oxygène.	25
Figure 6 : Implication de l'inflammation dans la mort des neurones dopaminergiques. Hypothèse de travail.....	26
Figure 7 : Sites d'action des différents traitements pharmacologiques pour la MP.....	28
Figure 8 : La stimulation cérébrale profonde.	30
Figure 9 : TEP d'un patient parkinsonien avant et après la transplantation de cellules mésencéphaliques humaines..	34
Figure 10 : Localisation du mésencéphale ventral chez un fœtus de porc à 27-28 jours de gestation.	39
Figure 11 : Architecture du SNC.....	42
Figure 12 : Structure de la BHE.	43
Figure 13 : Composition des jonctions intercellulaires endothéliales de la BHE.	44
Figure 14 : Les différentes voies de transport au travers de la BHE.....	45
Figure 15 : La circulation lymphatique au sein du SNC.	47
Figure 16 : Le drainage antigénique au sein du SNC.....	48
Figure 17 : Extravasation des leucocytes à travers la BHE.....	49
Figure 18 : Transformation d'une microglie résidente ramifiée en une microglie activée au phénotype amiboïde macrophagique.....	51
Figure 19 : La différenciation des cellules T CD4+ en Th1 et Th2.	58
Figure 20 : Mécanisme d'activation des cellules T.....	60
Figure 21 : Profil d'infiltration des cellules immunes dans une greffe intrastriatale de cellules du MV fœtal porcin chez le rat.....	61

Figure 22 : Développement et différenciation des cellules B.	64
Figure 23 : Structure d'une immunoglobuline.	65
Figure 24 : Les différents types de cellules souches.	67
Figure 25 : Etapes pour l'établissement d'une culture de CSE.	69
Figure 26 : Potentiel de différenciation des CSM.	73
Figure 27 : Molécules hypothétiquement impliquées dans l'activité immunosuppressive des CSM.	77
Figure 28 : Caractéristiques des cellules souches neurales.	79
Figure 29 : Neurogénèse chez l'embryon.	80
Figure 30 : Les différentes zones de neurogénèse dans le cerveau adulte.	81
Figure 31 : Prolifération des CSPN in vitro.	83
Figure 32 : Reprogrammation de fibroblastes adultes en cellules iPS.	89
Figure 33 : Schéma expérimental d'une co-transplantation de neuroblastes porcins (300 000) avec des CSM (100 000) de rat dans le striatum de rat.	97
Figure 34 : Etude de l'activité immunosuppressive des CSM de rat dans un contexte xénogénique.	125
Figure 35 : Etude dose-réponse de la prolifération de PBMC humaines en présence d'une quantité croissante de CSN dérivées d'iPSC.	150
Figure 36 : Analyse de la prolifération des PBMC en présence de surnageant de culture des iCSN.	151
Figure 37 : Analyse dose-réponse de l'effet de surnageant de culture d'iCSN sur la prolifération des PBMC.	151
Figure 38 : Prolifération des cellules T de rat IgM KO en présence de PBMC de porc.	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Gènes impliqués dans la MP.	24
Tableau 2 : Les différentes voies d'activation du complément.	62

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARNm : acide ribonucléique messenger
AVC : accident vasculaire cérébral
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
BHE : barrière hémato-encéphalique
BMP4 : bone morphogenetic protein 4
CD : cluster of differentiation
CDCC : cytotoxicité cellulaire dépendante du complément
CE : cellule endothéliale
CFSE : carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CO : carbon monoxide
COMT : catéchol-O-méthyl transférase
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CPN : cellule progénitrice neurale
CSE : cellule souche embryonnaire
CSM : cellule souche mésenchymateuse
CSN : cellule souche neurale
CSPN : cellule souche/progénitrice neurale
CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DA : dopamine
DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine
EAE : encéphalomyélite allergique expérimentale
EGF : epidermal growth factor
EOPS : exempts d'organismes pathogènes spécifiés
FasL : ligand de Fas
Fc : fragment constant
FcγR : Fc gamma récepteur
F-dopa : fluorodopa
(b)FGF : (basic) fibroblast growth factor
G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor

GDNF : glial-cell-line-derived neurotrophic factor
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GM-CSF : granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
GP : globus pallidus
HGF : hepatocyte growth factor
HLA : human leukocyte antigen
HO : heme oxygénase
ICAM : intercellular adhesion molecule
IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN γ : interféron gamma
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IPSC : induced pluripotent stem cell
IVG : interruption volontaire de grossesse
JAM : junctionnal adhesion molecule
KO : knock-out
LB : lymphocyte B
LCR : liquide céphalo-rachidien
LFA : lymphocyte fonction-associated antigen
LIF : leukemia inhibitory factor
LNMA : NG-Monomethyl-L-arginine acetate
LPS : lipopolysaccharide
LRK2 : Leucine-rich repeat kinase 2
LT : lymphocyte T
MAO : monoamine oxydase
MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1
MMP : métalloprotéase matricielle
MP : maladie de Parkinson
MPP⁺ : 1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP : 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MV : mésencéphale ventral
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NEP : neuroépithéliale
NF70 : neurofilament de 70kDa
NF κ B : nuclear factor kappa B

NGF : nerve growth factor
Ngn2 : neurogenin-2
NK : natural killer
NO : nitric oxide
NOS : nitric oxyde synthase (i : inducible, n : neuronal)
NT : neurotrophine
Nurr1 : Nuclear receptor related 1 protein
OHDA : hydroxydopamine
PAEC : porcine aortic endothelial cell
PBMC : peripheral blood mononuclear cell
PCR : polymerase chain reaction (q : quantitative)
PDGF : platelet-derived growth factor
PERV : porcin endogenous retrovirus
PG : progéniteur glial
PGE2 : prostaglandine E2
PINK-1 : PTEN-induced putative kinase 1
PN : progéniteur neuronal
pNB : neuroblaste porcin
PNH : primate non humain
PRR : pattern recognition receptor
RANTES : regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
SHH : sonic hedgehog
SNC : système nerveux central
SNpc : substance noire pars compacta
SnPP : tin-protoporphyrin-IX
SNpr : substance noire pars reticulata
SVF : sérum de veau fœtal
Tc : T cytotoxique
TCR : T cell receptor
TEP : tomographie par émission de positons
TGF- β : transforming growth factor beta
TH : tyrosine hydroxylase
Th : T helper
TNF : tumor necrosis factor
UCH-L1 : Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1

VCAM : vascular cell adhesion molecule

VLA : very late antigen

ZO : zona occludens

ZSG : zone sous-granulaire

ZSV : zone sous-ventriculaire

ZV : zone ventriculaire

AVANT-PROPOS

Le cerveau est un organe complexe et malgré d'intenses recherches, beaucoup de mystères entourent encore cette entité. La découverte que le cerveau est doué de neuroplasticité a permis d'imaginer reconstruire un réseau neuronal lésé et a fait entrer la recherche en neuroscience dans l'ère de la transplantation. L'idée de la transplantation intracérébrale a fait son apparition à la fin du XIX^{ème} siècle lorsque Thompson préleva une pièce de néocortex de 8mm sur un chien qu'il transplanta dans le néocortex d'un autre chien. La greffe surviva jusqu'à 7 semaines mais avec une importante nécrose (Thompson, 1890). La recherche de stratégies thérapeutiques pour la maladie de Parkinson en transplantant des cellules dans le cerveau des patients a débuté vers les années 1980. Le but était de greffer dans le striatum des cellules susceptibles de le réinnervier et de rétablir un niveau physiologique de dopamine. Des études expérimentales chez l'animal, puis cliniques chez l'homme se sont succédées avec comme principale source cellulaire les neuroblastes issus du mésencéphale ventral de fœtus. Des résultats encourageants ont été obtenus mais les problèmes d'éthique, de religion, de disponibilité et de logistique, liés à l'utilisation de tissu fœtal humain ont freiné cette approche. Une des alternatives fut la xénotransplantation de cellules mésencéphaliques porcines avec comme défi de parvenir à contrôler le rejet des xénogreffes intracérébrales. En effet, les nombreuses expériences de transplantation accélérèrent la remise en question du dogme d'un cerveau comme organe immunoprivilégié (Barker and Widner, 2004) au profit du terme « immunologiquement particulier ». Le concept d'interaction entre le système immunitaire et le système nerveux central (SNC) prit alors de l'ampleur.

Les dernières décennies virent l'explosion de la recherche sur les cellules souches. Ces cellules, au fort potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation, ouvrirent de nouvelles perspectives pour les thérapies restauratrices. A ces potentialités s'ajoutèrent des propriétés trophiques, migratoires et immunomodulatrices fort intéressantes pour la transplantation et la survie des greffons. Une intense recherche fut menée pour déterminer la source idéale de cellules souches. Après les cellules souches neurales et les cellules souches embryonnaires, l'expérimentation s'est focalisée sur les cellules pluripotentes induites (iPSC). Ces cellules somatiques adultes reprogrammées pour pouvoir être différenciées en tous types de cellules devraient permettre d'obtenir des cellules spécifiques de patients pour développer des

modèles de pathologies, tester de nouvelles drogues. Les iPSC sont également un superbe outil si l'on souhaite transplanter des cellules autologues génétiquement corrigées. Malheureusement, le coût, le temps et la difficulté pour obtenir des cellules autologues tendent aujourd'hui vers la mise en place de banques d'iPSC avec un screening des haplotypes HLA (human leukocyte antigen) pour adapter le greffon à la spécificité immunologique du receveur (Fairchild, 2010; Nakatsuji et al., 2008). A l'heure actuelle, il y a une réelle orientation de la transplantation vers une médecine personnalisée.

Dans l'introduction, nous reviendrons en détails sur plusieurs de ces points, en évoquant également les caractéristiques de la maladie de Parkinson et les stratégies thérapeutiques dont la greffe intracérébrale. Après avoir décrit les particularités du cerveau d'un point de vue immunologique, nous rappellerons les différents mécanismes de rejets possibles. La dernière partie de l'introduction brossera un portrait des différents types de cellules souches, en particulier celles utilisées durant ma thèse : les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les cellules souches/progénitrices neurales (CSPN).

Après avoir exposé les objectifs de la thèse, je présenterai les résultats de nos travaux sur les mécanismes immunosuppresseurs des CSM, CSPN et CSN dérivées d'iPSC avec notamment deux articles. Dans une seconde partie, j'exposerai nos résultats sur l'implication de la réponse humorale dans le rejet de xénogreffes neurales porcines, avec un article. Nous finirons par une discussion générale en incorporant les diverses perspectives envisagées.

INTRODUCTION

I. La transplantation intracérébrale : application à la maladie de Parkinson

I-1. La maladie de Parkinson : description et principales thérapeutiques

La maladie de Parkinson (MP) a été décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson comme une « paralysie agitante » caractérisée par un tremblement de repos, des anomalies de la marche et de la posture, une paralysie et une diminution de la force motrice (An Essay on the Shaking Palsy, Sherwood, Neely and Jones London, 1817). C'est la deuxième maladie neurodégénérative chronique la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Actuellement, cette pathologie touche 1% de la population de plus de 60 ans et 4-5% des plus de 80 ans (Dawson and Dawson, 2002; de Lau and Breteler, 2006), mais son incidence est en progression, due notamment au vieillissement de la population mondiale.

I-1.1. Signes cliniques

La MP est principalement diagnostiquée suite à la présence d'au moins deux des symptômes moteurs suivants : un tremblement de repos, une rigidité des membres, une bradykinésie/akinésie et une instabilité posturale (de Lau and Breteler, 2006). Au tout début de la maladie, le tremblement, souvent unilatéral et restreint aux extrémités, ne survient qu'au repos, mais il est augmenté dans un état de stress ou d'effort de concentration. La rigidité se traduit par une hypertonie musculaire, le plus souvent asymétrique. La bradykinésie est caractérisée par une lenteur des mouvements pouvant conduire à une akinésie, une difficulté à initier le mouvement. Ce symptôme peut se traduire par une lenteur à l'écriture, une diminution du balancement des bras lors de la marche, de l'expression faciale et de l'amplitude de la voix (Fahn, 2003). Beaucoup de patients développent en plus des symptômes non moteurs (pour revue (Chaudhuri et al., 2006)) tels qu'une fatigue, une anxiété, une dépression, des déficits cognitifs (Starkstein et al., 1990), des démences (Aarsland D, 2003), des problèmes de sommeil (Chaudhuri, 2003), des dysfonctions olfactives (Doty et al., 1992; Hawkes et al., 1997; Huisman et al., 2004) et des dysfonctions gastro-intestinales (pour revue (Pfeiffer, 2003)).

I-1.2. Physiopathologie

I-1.2.1. La dégénérescence neuronale

Une des principales caractéristiques pathologiques de la MP est la perte progressive et sélective des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriatale. Cette voie fait intervenir deux zones du cerveau, la substance noire et le striatum (composé du noyau caudé et du putamen), deux structures appartenant aux noyaux gris centraux ou ganglions de la base.

Figure 1.

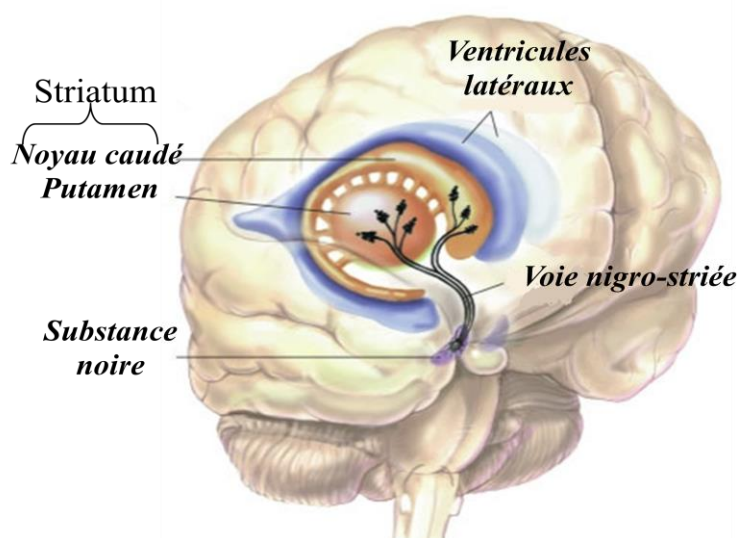


Figure 1 : La voie nigro-striée. Les neurones dopaminergiques de la substance noire projettent vers le striatum composé du noyau caudé et du putamen. Adapté de <http://fr.ircminational.com>.

La dégénération des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire pars compacta (SNpc) et de leurs projections vers le striatum entraîne un déficit de dopamine au niveau de cette région (Hornykiewicz, 1966). Lorsque le diagnostic de la pathologie est établi, 80% de la dopamine striatale et 50% des neurones dopaminergiques de la SNpc ont déjà disparu (Toulouse and Sullivan, 2008). Cette perte de dopamine entraîne une faible activation des récepteurs dopaminergiques présents au niveau du striatum et par voie de conséquence, un dysfonctionnement des ganglions de la base. **Figure 2.**

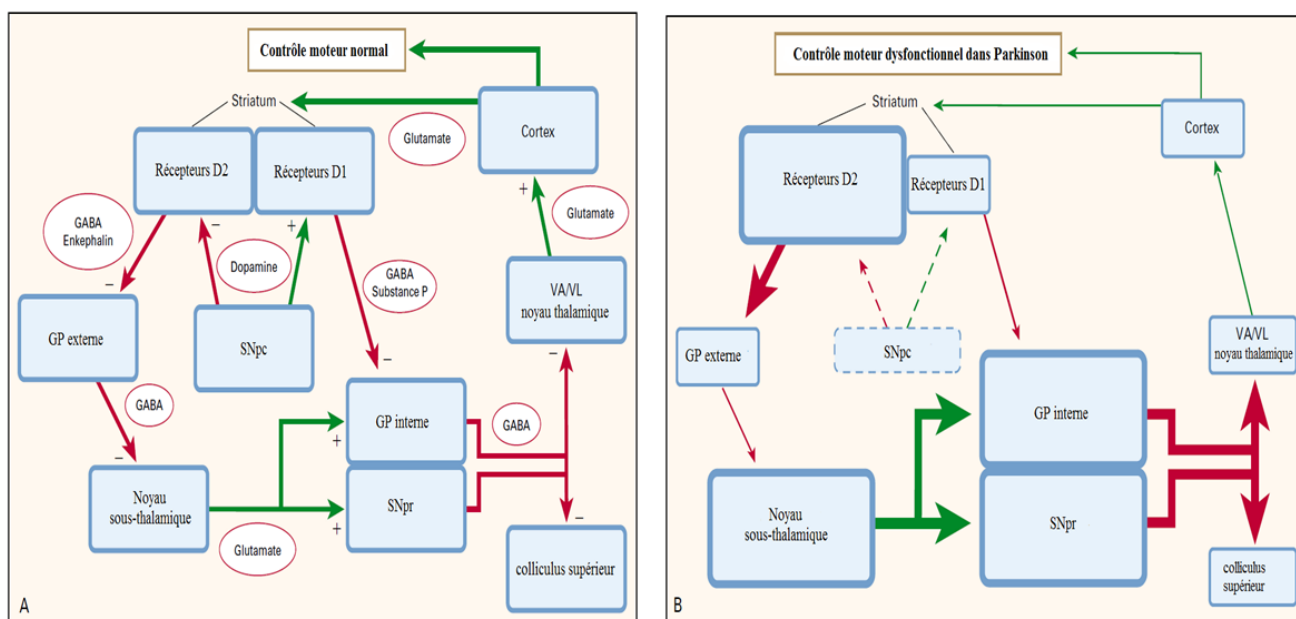


Figure 2 : Organisation des ganglions de la base dans un contexte normal (A) et lors de la MP (B). En vert : voie excitatrice, en rose : voie inhibitrice, cercle : neurotransmetteurs. Adapté de (Lang and Lozano, 1998).

La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc entraîne un déficit de dopamine qui a pour conséquence une faible stimulation des récepteurs dopaminergiques (D2 et D1) du striatum, provoquant un dysfonctionnement des deux voies des ganglions de la base :

- La voie directe : la diminution de l'excitation du récepteur D1 entraîne une inhibition moins forte par les neurones GABAergiques du globus pallidus (GP) interne, ce qui permet une inhibition plus accentuée du noyau thalamique qui va alors moins activer le cortex par les neurones glutamatergiques et en conséquence diminuer aussi l'excitation du striatum.
- La voie indirecte : la diminution de l'inhibition du récepteur D2 entraîne une plus forte inhibition du globus pallidus externe par les neurones GABAergiques et donc une moindre inhibition du noyau sous-thalamique, qui va par les neurones glutamatergiques permettre une plus forte activation du GP interne et de la substance noire pars reticulata (SNpr), ce qui accentue la forte inhibition du noyau thalamique et donc du cortex.

La conséquence de la dysfonction de ces deux voies est une forte inhibition de l'activité du cortex, ce qui induit une perturbation du contrôle moteur.

La perte neuronale n'est pas limitée à la SNpc. Elle touche aussi le locus coeruleus, les noyaux moteurs dorsaux des nerfs vagues et glossopharyngiens, le noyau basal de Meynert et à un stade plus tardif le néocortex (Braak et al., 2003). En étudiant les cerveaux de 110

patients de la MP, Braak et al., ont ainsi pu définir une topographie de la progression de la MP selon 6 stades. **Figure 3.**

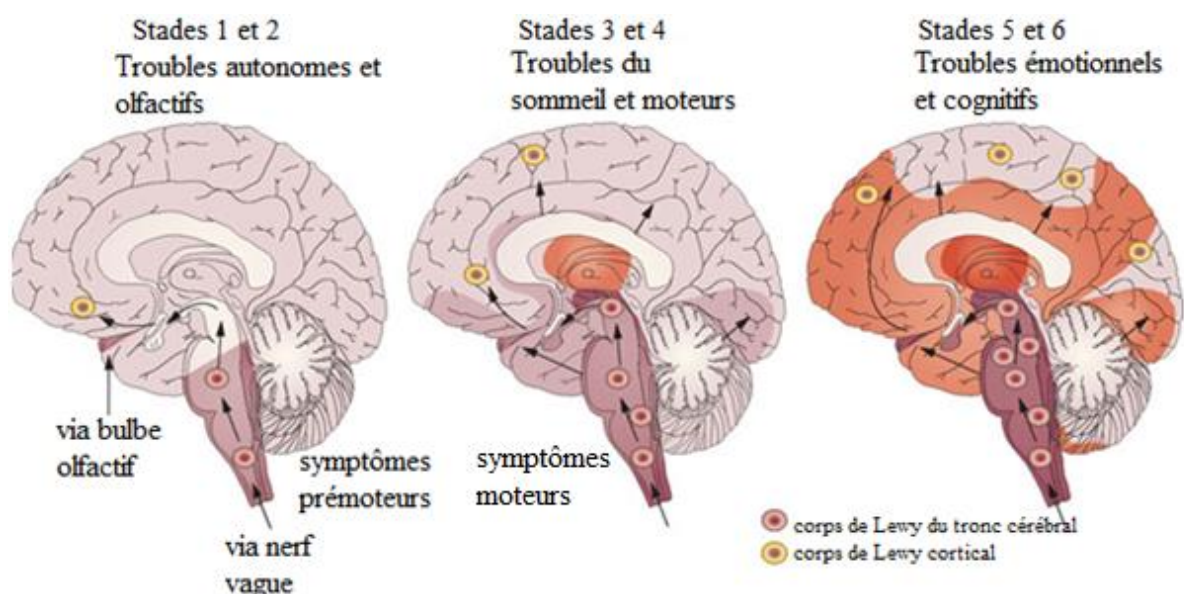


Figure 3 : Stades de la progression de la dégénérescence neuronale dans la MP selon la théorie de Braak. Adapté de (Braak et al., 2003).

Dans les stades 1 et 2, les lésions touchent la structure olfactive, la medulla oblongata et une partie du pontine tegmentum provoquant des dysfonctions olfactives et autonomiques. Aux stades 3 et 4, la SNpc et des aires proencéphaliques sont affectées, ce qui a pour conséquence l'apparition des déficits moteurs et des perturbations du sommeil. Aux stades 5 et 6, une dégénérescence des aires sensorielles du néocortex et de l'aire prémotrice apparaît, à l'origine des problèmes émotionnels et cognitifs. Cette atteinte généralisée explique les symptômes moteurs et non moteurs de la pathologie.

I-1.2.2. Les corps de Lewy

L'apparition d'inclusions cytoplasmiques de 5-25µm de diamètre appelées corps de Lewy, ainsi que la présence de neurites de Lewy est une autre marque neuropathologique de la MP. **Figure 4.**

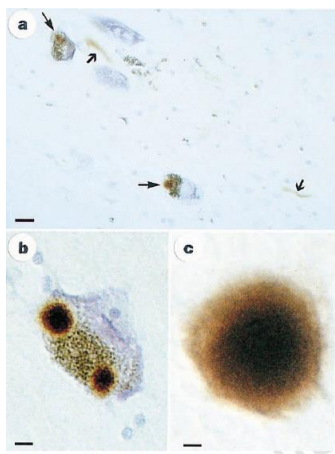


Figure 4 : Les corps de Lewy. Adapté de (Spillantini et al., 1997).

Les corps de Lewy sont retrouvés dans différentes structures du cerveau : la SN, l'hypothalamus, le cortex cérébral, le locus coeruleus, le noyau basal de Meynert, le noyau vagal dorsal, le noyau moteur du nerf crânien et dans différentes zones du système nerveux autonome (Gibb and Lees, 1988). Le composant majeur des corps de Lewy est l' α -synucléine, une protéine qui à l'état normal se trouve dans les terminaisons présynaptiques (Baba et al., 1998; Spillantini et al., 1997, 1998), et qui est impliquée dans la plasticité synaptique, le dynamisme des vésicules et la régulation de la synthèse de dopamine (Lotharius and Brundin, 2002; Sidhu et al., 2004). La mutation de son gène est à l'origine d'une des formes génétiques de la MP (Polymeropoulos et al., 1997). L' α -synucléine mutée, devenue résistante au système ubiquitine/protéasome, forme des agrégats qui s'accumulent dans les corps de Lewy. L'ubiquitine et d'autres neurofilaments ont aussi été décrits dans ces inclusions (Goldman et al., 1983; Spillantini et al., 1997). Les corps de Lewy ne sont pas spécifiques à la MP puisqu'ils sont retrouvés dans d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Lippa et al., 1998) ou des démences à corps de Lewy (Kosaka et al., 1976).

I-1.3. Etiologie

Dans 90-95% des cas diagnostiqués, la MP est d'origine idiopathique (Toulouse and Sullivan, 2008) mais des études indiquent que la MP serait une pathologie aux origines multifactorielles, caractérisée par une susceptibilité génétique et une influence de l'environnement (Gao et al., 2011).

I-1.3.1. Les facteurs environnementaux

Plusieurs études ont ainsi montré un lien entre l'exposition à certains composés chimiques de synthèse et l'apparition d'une MP. Le premier exemple fut décrit par l'analyse de la mépéridine, un substitut de l'héroïne, dont la consommation entraîna des symptômes similaires à la MP chez de jeunes consommateurs (Davis et al., 1979). Le dérivé synthétique de cette drogue identifié comme le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), et d'agir comme un puissant neurotoxique pour les neurones dopaminergiques de la substance noire (D'Amato et al., 1986; Langston et al., 1983, 1999). Effectivement, l'injection de MPTP chez le singe entraîne une perte de 90 % des neurones dans la SNpc (Burns et al., 1983). En fait, l'oxydation du MPTP par la monoamine oxydase B (MAO-B) génère un radical libre, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+), qui une fois capté par les transporteurs de la dopamine, inhibe le complexe I de la chaîne de transport des électrons des mitochondries, et provoque la mort des neurones dopaminergiques (Javitch et al., 1985).

De récentes études épidémiologiques ont également mis en évidence une augmentation du risque de développer une MP après exposition à certains pesticides (Ascherio et al., 2006; Elbaz et al., 2009; Engel et al., 2001; Frigerio et al., 2006; Gorell et al., 1998; Lai et al., 2002a; Priyadarshi et al., 2001). C'est ainsi que la roténone, communément utilisée en insecticide, s'est révélée être un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînant des lésions dopaminergiques nigrostriatales spécifiques. Les animaux exposés à la roténone présentent, au niveau de la substance noire, des inclusions contenant de l' α -synucléine et de l'ubiquitine, et développent des symptômes similaires à ceux de la MP (Betarbet et al., 2000). Le paraquat, un herbicide présentant une structure similaire au MPP^+ (Brooks et al., 1999; Liou et al., 1997; McCormack et al., 2002) ainsi que le maneb, un puissant fongicide (Thiruchelvam et al., 2000) sont eux aussi toxiques pour les neurones dopaminergiques.

I-1.3.2. Les facteurs génétiques

Dans 5 à 10% des cas de MP, des facteurs génétiques seraient en cause (Toulouse and Sullivan, 2008), notamment quand la maladie se déclare avant 50 ans. Différentes mutations génétiques ont ainsi été associées aux formes familiales de la MP, et les différents loci des gènes recensés ont été regroupés sous le terme PARK. Plusieurs gènes ont clairement été

identifiés mais d'autres sont encore inconnus (Park 3, 9, 10, 11) (Gasser et al., 1998; Olanow et al., 2009a). **Tableau 1.**

Nom	Gène	Rôle	Références
Park 1	α -synucléine	Dynamisme vésicules et lipides, régulation de la synthèse de dopamine	A30P (Krüger et al., 1998) A53T (Polymeropoulos et al., 1997) E46K (Zarranz et al., 2004) Tripllication (Singleton et al., 2003)
Park 2	Parkin	Système ubiquitine-protéasome, stress oxydatif et fonction mitochondriale	(Abbas et al., 1999; Kitada et al., 1998; Lücking et al., 2000; Oliveira et al., 2003; Shimura et al., 2000; Sun M, 2006)
Park 5	UCH-L1	Système ubiquitine-protéasome	(Liu et al., 2002)
Park 6	PINK1	Stress oxydatif et fonction mitochondriale	(Abou-Sleiman et al., 2006; Rogaeva E, 2004; Valente et al., 2004)
Park 7	DJ-1	Stress oxydatif et fonction mitochondriale	(Bonifati et al., 2003; Irrcher et al., 2010; Lockhart et al., 2004)
Park 8	LRRK2	Trafic cellulaire, phosphorylation et signaux intracellulaires	(Di Fonzo et al., 2005; Funayama et al., 2005; Gilks et al., 2005; Nichols et al., 2005; Paisán-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004)

Tableau 1 : Gènes impliqués dans la MP.

Les mutations recensées étant soit dominantes, soit récessives, elles ont été classées en deux groupes distincts :

- Mutations autosomales dominantes : identifiées pour les gènes de l' α -synucléine et la leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2). Ces mutations sont associées à des caractéristiques communes de la MP idiopathique incluant la présence de corps de Lewy et une apparition plutôt tardive de la maladie.
- Mutations autosomales récessives : mutations homozygotes ou perte de fonction hétérozygotes rares dans les gènes Parkin, DJ-1 et PINK1. Elles sont caractérisées par une apparition le plus souvent précoce de la maladie, une faible progression et une bonne réponse à la L-DOPA. Le gène Parkin code pour une ubiquitine ligase dont la perte de fonction conduit à l'accumulation de substrat non ubiquitiné dans les neurones dopaminergiques.

I-1.4. La neuroinflammation dans la MP : stress oxydatif et rôle de la microglie

I-1.4.1. Le stress oxydatif

Plusieurs événements tendent à rendre les neurones dopaminergiques particulièrement sensibles au stress oxydatif. Le métabolisme de la dopamine en est un exemple. **Figure 5.**

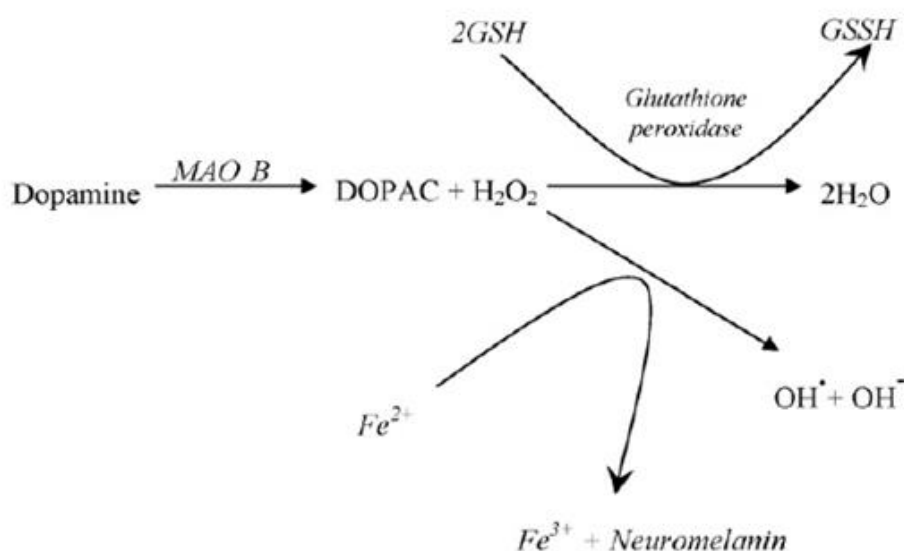


Figure 5 : Métabolisme de la dopamine et production de dérivés réactifs de l'oxygène. DOPAC : acide dihydroxyphényl acétique, H₂O₂ : peroxide d'hydrogène, MAO B : monoamine-oxydase B, GSH : glutathion, GSSH : glutathion disulfide, OH• : radicaux libres hydroxyl, OH⁻ : ion hydroxyl, Fe : fer. Adapté de (Singh et al., 2007).

La dégradation de la dopamine par les monoamines oxydases B ou par auto-oxydation génère de hauts niveaux de dérivés réactifs de l'oxygène : peroxyde d'hydrogène converti à son tour en radicaux libres hydroxyl et ions hydroxyl. Plusieurs phénomènes vont accentuer ce processus lors de la MP. Tout d'abord, l'augmentation naturelle du taux en fer avec l'âge est accentuée chez les patients parkinsoniens (Sofic et al., 1988). Ensuite, les malades présentent une déplétion en glutathion ainsi qu'une augmentation de son taux d'oxydation (Spina and Cohen, 1989) ce qui a pour effet de ralentir la détoxification des radicaux libres via la glutathione peroxidase. Ces deux processus conduisent à une augmentation de la production de radicaux libres. A cela s'ajoute une sur-régulation de l'enzyme NADPH, responsable de la production de radicaux libres, observée chez des patients (Wu et al., 2003). Le dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant aussi une augmentation des radicaux libres, comme observé lors de l'injection d'inhibiteurs du complexe I tels que la roténone (Betarbet et al., 2000) et le MPTP (Javitch et al., 1985) ou via

la mutation de gènes de protéines mitochondriales (Devi et al., 2008; Irrcher et al., 2010; Palacino et al., 2004), confirme le rôle délétère d'un stress oxydatif pour la survie des neurones dopaminergiques.

I-1.4.2. Rôle de la microglie

Une forte réaction microgiale chez des patients parkinsoniens (Langston et al., 1999) et un nombre plus important de cellules microgliales au niveau de la SN (Kim et al., 2000) a conduit à l'hypothèse d'un rôle critique de ces cellules dans la MP. Cette hypothèse a été renforcée par la forte perte dopaminergique observée après l'injection in situ d'un agent inflammatoire comme le LPS qui active les cellules microgliales (Castaño et al., 1998; Herrera et al., 2000), et génère différents facteurs neurotoxiques et proinflammatoires, tels que le TNF, l'IL-1, les radicaux libres NO et les ions superoxydes (Gao et al., 2002). Cet effet est contré par l'utilisation du naloxane, un antagoniste du récepteur aux opioïdes (Liu et al., 2000a, 2000b, 2000c; Lu et al., 2000). Les cellules microgliales sont donc probablement impliquées dans la pathologie mais il reste à déterminer si l'activation de ces cellules est une cause ou une conséquence de la MP. Une inflammation auto-renouvelée telle que décrite sur la **figure 6** accélère probablement le processus dégénératif.

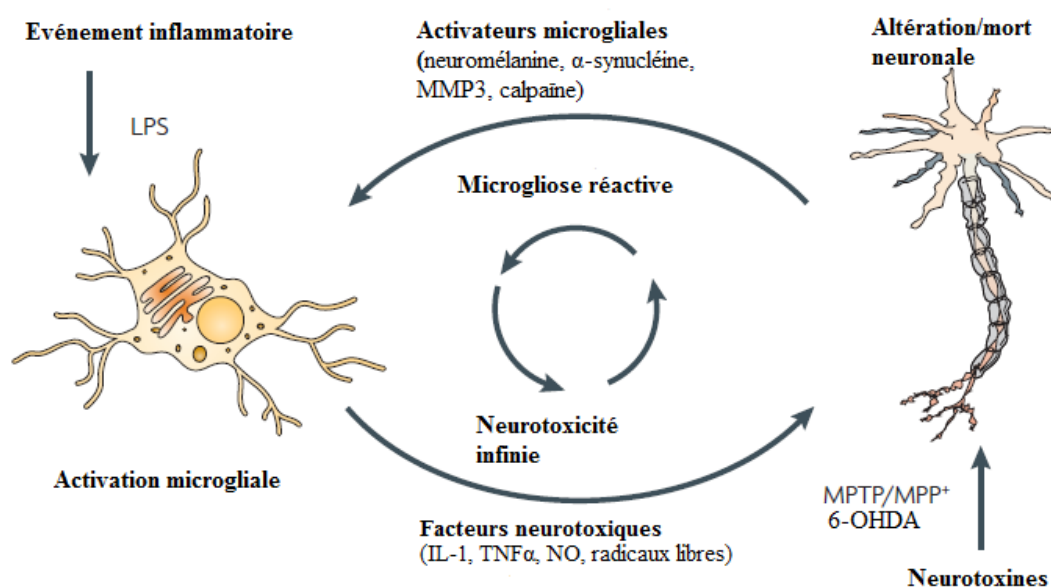


Figure 6 : Implication de l'inflammation dans la mort des neurones dopaminergiques. Hypothèse de travail. Adapté de (Block et al., 2007).

Dans cette hypothèse de travail, les cellules microgliales activées par les facteurs libérés lors de la mort des neurones dopaminergiques produiraient des métabolites toxiques,

entraînant la dégénérescence de nouveaux neurones. Une activation de la microglie, connue pour libérer des radicaux libres, a été observée dans des modèles animaux de la MP basés sur l'injection de MPTP (Gao et al., 2002, 2003; Liberatore et al., 1999; McGeer et al., 2003; Wu et al., 2002, 2003) ou de 6-OHDA (Cicchetti et al., 2002; Depino et al., 2003; He et al., 2001). Parmi les molécules sécrétées par les neurones en cours de dégénérescence, on note la neuromélanine (Wilms et al., 2003; Zecca et al., 1996; Zhang et al., 2011), l' α -synucléine (Zhang et al., 2005), la calpaïne (Levesque et al., 2010), ainsi que la forme active de MMP3, une protéinase qui dégrade la matrice extracellulaire (Kim et al., 2005, 2007). En retour, les cellules microgliales produiraient des facteurs inflammatoires neurotoxiques (Block and Hong, 2005; Block et al., 2007) dont le monoxyde d'azote (Hunot et al., 1996), le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 (Sriram et al., 2002).

I-1.5. Les stratégies thérapeutiques

I-1.5.1. Les traitements pharmacologiques

Actuellement, les traitements pharmacologiques administrés aux patients sont purement symptomatiques. **Figure 7.**

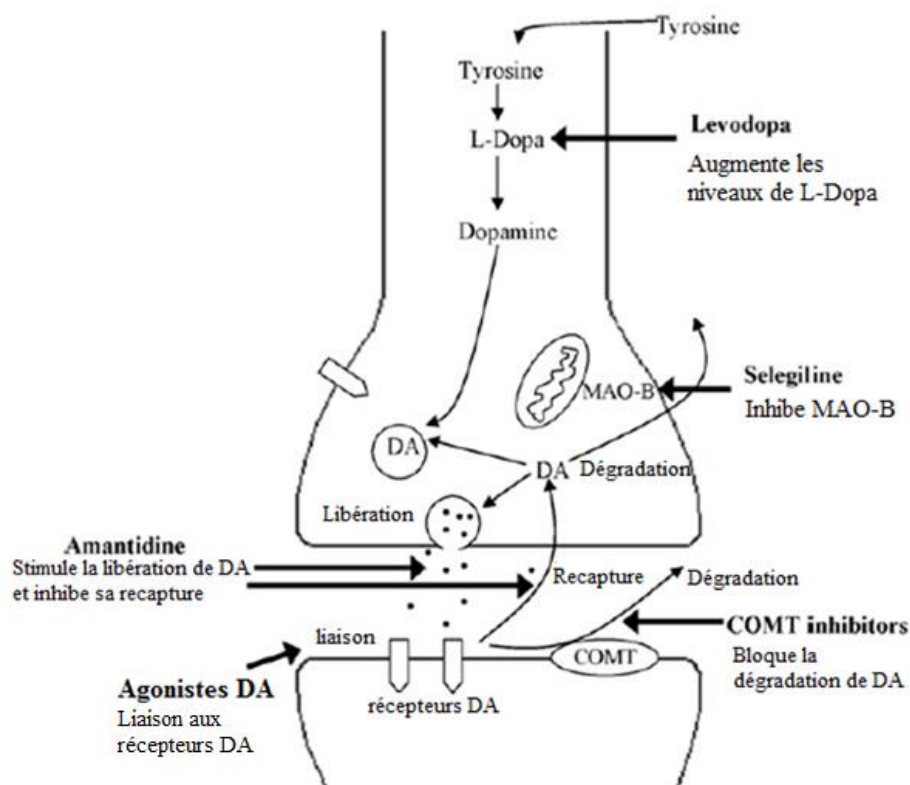


Figure 7 : Sites d'action des différents traitements pharmacologiques pour la MP. Adapté de (Singh et al., 2007).

Le traitement le plus communément prescrit est l'administration de lévodopa ou L-dopa, un précurseur de la dopamine capable de traverser la BHE. Il est usuellement prescrit avec un inhibiteur de la décarboxylase périphérique pour prévenir la formation de dopamine en périphérie, et avec des inhibiteurs de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) pour éviter une trop rapide métabolisation (Burch and Sheerin, 2005). Ce traitement réduit très efficacement les symptômes moteurs (Koller et al., 1999), mais après 5 ans de thérapie, des fluctuations de la réponse motrice et des mouvements involontaires appelés dyskinésies peuvent apparaître (Hely et al., 1994; Lang and Lozano, 1998). L'utilisation de l'Amantadine, une molécule capable d'activer la libération de dopamine et de bloquer sa recapture, peut réduire la sévérité des dyskinésies mais des problèmes mentaux peuvent subvenir (Singh et al., 2007; Thobois et al., 2005). Une autre thérapie envisagée est la prise d'agonistes dopaminergiques agissant sur les récepteurs dopaminergiques post-synaptiques. Ces molécules, qui ont une demi-vie plus longue, produisent moins de dyskinésies mais leur bénéfice symptomatique est moindre comparé à un traitement par la lévodopa (Burch and Sheerin, 2005; Schapira, 2002). Des inhibiteurs de la MAO-B, comme la selegiline, qui réduisent le métabolisme intraneuronal de la dopamine et augmentent son taux endogène,

apportent eux aussi des améliorations cliniques. Ils peuvent être prescrits en complément de la lévodopa afin d'en réduire sa dose (Pålhagen et al., 2006).

I-1.5.2. Interventions chirurgicales

Les premières interventions neurochirurgicales consistaient en des ablations de certaines zones du cerveau, telles que le pallidum ou le thalamus. La pallidotomie a ainsi montré une diminution des symptômes moteurs, ainsi que des dyskinésies (Dogali et al., 1995; Kishore et al., 1997; Lang et al., 1997; Samuel et al., 1998). Ces opérations, bien que tolérées, entraînent des risques d'hémorragies intracrâniennes (Samuel et al., 1998), des lésions permanentes de la capsule interne ou du tractus optique ainsi que, dans certains cas d'opération en bilatérale, un déclin de la fonction cognitive et des changements comportementaux (Scott et al., 1998). L'apparition de la stimulation cérébrale profonde est alors apparue comme une alternative prometteuse. Des électrodes introduites par stéréotaxie dans le cerveau sont reliées à un stimulateur placé sous la clavicule. **Figure 8.** Cette approche a pour avantage d'être réversible, adaptable à l'évolution de la maladie, avec peu d'effets secondaires. La stimulation peut être mono ou bilatérale, et différentes zones ont été testées afin de choisir celle qui pouvait permettre les meilleurs bénéfices. La stimulation du noyau ventral intermédiaire du thalamus permet de contrôler les tremblements et de réduire les dyskinésies (Caparros-Lefebvre et al., 1993) mais elle n'élimine pas les bradykinésies. La stimulation du globus pallidus interne permet, quant à elle, de contrôler les dyskinésies et les fluctuations motrices (Pahwa et al., 1997; Volkmann et al., 1998). En fait, les meilleurs résultats ont été obtenus en stimulant le noyau sous-thalamique. Cette approche réduit fortement les bradykinésies et permet aux patients de limiter leur traitement par lévodopa (Krack et al., 1998, 2003; Limousin et al., 1995, 1998). Cette thérapie n'est cependant accessible qu'à un faible nombre de patients. En effet, les critères d'inclusion sont très stricts, excluant les patients qui n'ont pas une bonne réponse à la lévodopa, qui présentent un tremblement en symptôme primaire, une maladie mentale. Ainsi, seulement, 5-10% des patients bénéficient de la stimulation profonde (Singh et al., 2007).

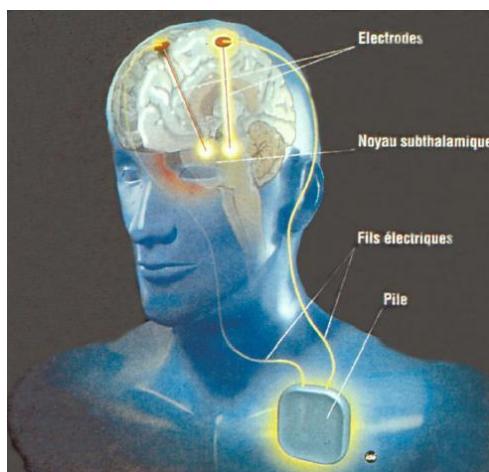


Figure 8 : La stimulation cérébrale profonde. Des électrodes implantées dans le cerveau sont reliées à une pile placée sous la clavicule qui va générer des impulsions électriques. Adapté de <http://www.utc.fr>.

I-1.5.3. Stratégies de neuroprotection

▪ Thérapie anti-inflammatoire

Le rôle de l'inflammation dans la pathogénèse de la MP suggère que des traitements par des anti-inflammatoires ou des inhibiteurs de la microglie pourraient être bénéfiques pour retarder ou prévenir la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Des anti-inflammatoires stéroïdiens tels que le dexaméthasone ont été décrits comme ayant des effets neuroprotecteurs dans des modèles rongeurs de la MP (Castaño et al., 2002) mais leurs effets secondaires ne permettent pas de les envisager pour un traitement à long terme. La minocycline, un inhibiteur de la microglie connue pour ses effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs (Kim and Suh, 2009), a aussi été rapportée comme prévenant la neurodégénérescence dopaminergique dans des modèles de MP (Du et al., 2001; He et al., 2001; Quintero et al., 2006; Tomás-Camardiel et al., 2004; Wu et al., 2002). Cependant, son utilisation lors d'essais cliniques s'est avérée provoquer de sévères effets secondaires (NINDS NET-PD Investigators, 2008).

▪ Facteurs neurotrophiques

Les facteurs neurotrophiques tels que le Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), capables de favoriser la survie et la régénération neuronale, sont considérés comme des molécules très intéressantes pour prévenir la dégénérescence des neurones

dopaminergiques. L'injection de GDNF dans des modèles animaux de la MP a en effet démontré un ralentissement de la perte neuronale dopaminergique (Choi-Lundberg et al., 1997), ainsi que des effets sur la récupération motrice corrélée à un niveau de dopamine augmenté (Gash et al., 1996; Kordower et al., 2000).

L'administration en intra-cérébroventriculaire de GDNF chez des patients, par l'intermédiaire d'un lentivirus, n'a pas montré d'amélioration motrice et des désagréments biologiques ont été rapportés. Une des hypothèses avancées fut que la méthode d'injection ne permettait pas aux molécules de GDNF d'atteindre les cellules cibles (Nutt et al., 2003). L'administration de GDNF directement dans le putamen de patients parkinsoniens à l'aide de pompes aurait, quant à elle, permis une augmentation du taux de dopamine, une récupération motrice ainsi qu'une diminution des dyskinésies lors d'essais cliniques de phase I (Gill et al., 2003) et II (Patel et al., 2005). Une étude clinique de phase II basée sur l'administration de GDNF a cependant été stoppée en raison du manque d'efficacité de la molécule (Lang et al., 2006). De même, des essais cliniques de phase II basés sur l'injection de neurturine, un facteur neurotrophique de la famille du GDNF, n'ont pas montré d'effets bénéfiques notoires (Marks et al., 2010), même si quelques bénéfices moteurs avaient été observés en phase I (Marks et al., 2008). Un traitement par des facteurs neurotrophiques à des stades précoces de la maladie pourrait être bénéfique, mais cela nécessite un diagnostic plus précoce.

I-1.5.4. La thérapie cellulaire

Les premiers essais de thérapie cellulaire ont été envisagés dans le but de transplanter des tissus produisant de la dopamine afin de restaurer un niveau physiologique de ce neurotransmetteur. Le bénéfice de ces greffes a été évalué à l'aide de différents outils tels que des tests comportementaux des fonctions motrices, des analyses histologiques des cerveaux ainsi que la tomographie par émission de positons (TEP) avec le marqueur du métabolisme de la dopamine [18F] fluorodopa, dont la mesure est corrélée à la densité cellulaire de neurones dopaminergiques (TH+) de la substance noire et à la concentration de dopamine striatale.

I-2. Les différentes stratégies de transplantation

I-2.1. L'autotransplantation

I-2.1.1. La médullosurrénale

Les premiers tissus utilisés l'ont été dans une optique d'autotransplantation avec des greffes de cellules issues de la médullosurrénale, un tissu riche en catécholamines et notamment en dopamine. La transplantation de ces cellules dans un modèle 6-OHDA de la MP a démontré une diminution du comportement rotatoire des rats (Freed et al., 1981), ce qui a conduit aux premiers essais réalisés chez deux patients parkinsoniens où une amélioration des fonctions motrices (Madrazo et al., 1987) fut observée. Cependant, les études cliniques suivantes rapportèrent un bénéfice modeste (Goetz et al., 1989, 1991; Lindvall et al., 1987; Olanow et al., 1990), avec des effets transitoires qui disparaissaient au bout de 18 mois (Goetz et al., 1991; Olanow et al., 1990). L'observation des cerveaux post mortem a de plus révélé une pauvre survie des cellules positives pour la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme impliquée dans la synthèse dopaminergique (Kordower et al., 1991), qui a été confirmée 16 ans après la greffe (Kompoliti et al., 2007). Outre cette faible efficacité à long terme, cette approche a pour inconvénient une morbidité élevée post-opératoire, suite à la procédure neurochirurgicale combinée à l'ouverture de l'abdomen pour récupérer la médulla (Goetz et al., 1989, 1991).

I-2.1.2. Le corps carotidien

Les cellules du corps carotidien offrent une autre source cellulaire pour l'autotransplantation. Le corps carotidien est un organe du système nerveux périphérique composé de clusters de cellules « glomus neuron like » qui sécrètent des niveaux importants de dopamine en réponse à une hypoxie (Espejo et al., 1998) et de GDNF (Toledo-Aral et al., 2002)(Toledo-Aral et al., 2003). La greffe de ces cellules dans le striatum de rats (Espejo et al., 1998; Toledo-Aral et al., 2002) et de singes (Luquin et al., 1999) modèles de la MP, a montré une longue survie, une croissance des fibres avec sécrétion de dopamine, une action neurotrophique sur les neurones nigrostriataux de l'hôte ainsi qu'une amélioration fonctionnelle. Des études cliniques ont aussi démontré une amélioration clinique (Arjona et

al., 2003; Minguez-Castellanos et al., 2007) mais les analyses TEP ne montrent pas d'augmentation de la capture striatale du [18F] fluorodopa (Minguez-Castellanos et al., 2007).

I-2.2. L'allogreffe

I-2.2.1. L'expérimentation animale

Les premiers essais de transplantation de neuroblastes dopaminergiques fœtaux allogéniques ont débuté vers la fin des années 70 (Dunnett et al., 2001) avec l'objectif de déterminer la meilleure source de cellules dopaminergiques et les sites d'implantation optimaux. Il est apparu que les transplantations de cellules issues du mésencéphale ventral (MV) fœtal qui contient la substance noire en formation, produisaient les meilleurs résultats (Hudson et al., 1994). Des greffes réalisées dans le striatum de rats lésés par la 6-OHDA ont montré que les cellules issues du mésencéphale ventral fœtal humain de 7 ou 9 semaines avaient une bonne survie, présentaient une bonne croissance neuritique et permettaient une récupération fonctionnelle (Brundin et al., 1986; Kondoh et al., 1996). A ce propos, il est à noter que les neuroblastes n'ont apparemment pas une poussée neuritique suffisante pour réinnervier le striatum après transplantation dans la SN chez l'adulte (Isacson and Deacon, 1997). Une récupération fonctionnelle associée à la survie des neurones transplantés avait auparavant été démontrée dans des modèles rongeurs de la MP après transplantation intrastriatale de neuroblastes fœtaux de rats âgés de 14-16 semaines (Björklund et al., 1981; Dunnett et al., 1981; Freund et al., 1985; Hudson et al., 1994; Nikkhah et al., 1994; Perlow et al., 1979). De leur côté, Freund et al., mirent en évidence la formation de synapses entre les neurones greffés et les neurones de l'hôte (Freund et al., 1985). Des résultats similaires ont été obtenus lors d'allogreffe chez des modèles primates non humains (PNH) (Annett et al., 1994, 1997).

I-2.2.2. Les essais cliniques

Les premiers essais cliniques ont débuté vers la fin des années 80 (Dunnett et al., 2001) avec la transplantation dans le cerveau de patients parkinsoniens de mésencéphales ventraux issus d'interruption volontaire de grossesse à 7-9 semaines post-conception. Plusieurs essais cliniques ouverts ont été réalisés en parallèle aux USA et en Europe chez des patients avec une MP idiopathique avancée. Les premiers résultats sur deux patients sont

apparus négatifs, les techniques d'implantations, le temps d'intervention ont alors été réévalués (Lindvall et al., 1988). Par la suite, des résultats cliniques positifs associés à une survie des transplants ont pu être observés lors de transplantations unilatérales dans le striatum (Defer et al., 1996; Freed et al., 1990, 1992; Kopyov et al., 1996; Lindvall et al., 1990, 1992, 1994; Piccini et al., 1999; Spencer et al., 1992; Wenning et al., 1997), bilatérales (Freed et al., 1990, 1992; Freeman et al., 1995; Hauser et al., 1999; Kopyov et al., 1996; Kordower et al., 1996; Peschanski et al., 1994; Piccini et al., 2000) et aussi lors de greffes séquentielles (Hagell et al., 1999). Des résultats équivalents ont été obtenus pour des patients avec une MP induite par l'injection de MPTP (Widner et al., 1992). Des analyses par tomographie à émission de positons (TEP) (**Figure 9**) (Freed et al., 1992; Freeman et al., 1995; Hagell et al., 1999; Hauser et al., 1999; Lindvall et al., 1990, 1994; Peschanski et al., 1994; Piccini et al., 1999, 2000; Remy et al., 1995; Wenning et al., 1997; Widner et al., 1992) montrent que l'implantation intrastriatale de neuroblastes mésencéphaliques restaure un niveau basal de dopamine, l'intensité de capture de la fluorodopa pouvant être corrélée à la récupération motrice (Remy et al., 1995).

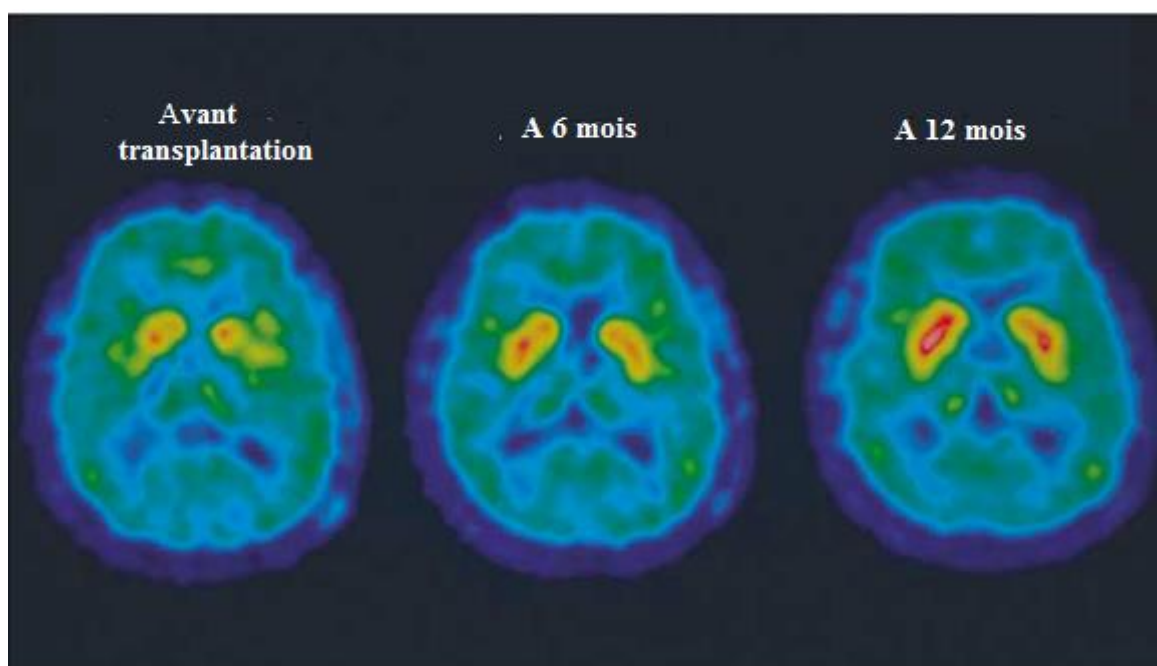


Figure 9 : TEP d'un patient parkinsonien avant et après la transplantation de cellules mésencéphaliques humaines. Une augmentation de la [18F] fluorodopa est observée après la greffe démontrant une production de dopamine dans le striatum. Adapté de (Kordower et al., 1995).

L'analyse histopathologique du cerveau d'un patient décédé d'une embolie pulmonaire 18 mois après la greffe a révélé la présence de neurones TH⁺ avec une

réinnervation du striatum (Kordower et al., 1995). Il est à noter que ce patient présentait une bonne récupération motrice, ainsi qu'une production de dopamine dans le striatum. Des signes cliniques corrélés à une production de dopamine ont été observés chez un patient jusqu'à 10 ans après la greffe (Piccini et al., 1999). Une survie des neurones dopaminergiques jusqu'à 14 ans après la greffe sans signe de neurodégénération a de plus été rapportée par Mendez et al., en 2008 (Mendez et al., 2008).

Ces premiers essais cliniques ouverts montraient des résultats très encourageants mais par la suite deux essais cliniques en double aveugle sont venus tempérer ces données. Un premier essai a été réalisé par Freed et al., sur 40 patients âgés de 34 à 75 ans. Des cellules mésencéphaliques ont été prélevées sur 4 fœtus de 7-8 semaines, cultivées puis greffées en bilatéral dans le putamen des patients parkinsoniens. Aucune différence dans les scores cliniques n'a été observée entre les patients transplantés et les contrôles un an après la greffe, même si les analyses par TEP montraient une survie des neurones dopaminergiques ainsi qu'une croissance des fibres dans la greffe. Par contre, Freed et al., ont quand même observé une amélioration clinique significative pour certains patients mais uniquement chez les plus jeunes (Freed et al., 2001). Le suivi des patients par Ma et al., démontra par la suite une continuation de l'amélioration clinique des patients à 2 ans qui fut maintenue jusqu'à 4 ans pour certains d'entre eux (Ma et al., 2010). Une autre étude fut réalisée par Olanow et al., chez 34 patients âgés de 30 à 75 ans avec une MP avancée. Les mésencéphales ventraux provenant d'un à 4 fœtus de 6-9 semaines, étaient conservés en milieu d'hibernation pendant 2 jours avant d'être transplantés. Les patients recevaient un traitement immunosuppresseur. Certains patients ont montré une amélioration à 6 et 9 mois, mais celle-ci ne persistait pas, notamment après l'arrêt du traitement immunosuppresseur. A 24 mois post-greffe, aucune différence significative n'a été rapportée entre les patients greffés et non greffés, même si une bonne survie des neurones et une réinnervation du striatum ont été observées lorsque les cellules étaient issues de 4 donneurs (Olanow et al., 2003).

I-2.2.3. Les limites de l'allogreffe

Plusieurs problèmes freinent le recours à des cellules embryonnaires ou fœtales d'origine humaine pour les thérapies cellulaires. Tout d'abord, d'un point de vue éthique, il est très difficile d'envisager à long terme une utilisation de fœtus humains issus d'interruption volontaire de grossesse (Boer, 1994). De plus, une greffe nécessitant l'utilisation de 2 à 6 fœtus par acte chirurgical, il apparaît très difficile d'organiser la logistique pour avoir au

moment de la greffe le nombre suffisant de donneurs (Brundin et al., 2010). En effet, peu de cellules survivent au processus de transplantation, une grande partie des cellules meurt lors de la préparation (Emgård et al., 2002) puis ensuite une majorité dégénère dès la première semaine (Emgård et al., 1999; Sortwell et al., 2000).

D'autre part, les protocoles cliniques diffèrent d'un essai à un autre, entraînant des résultats disparates. Les procédures de dissection, de stockage, de préparation des mésencéphales et d'implantation sont très hétérogènes. En effet, certaines études utilisent des tissus conservés à long terme en culture, d'autres des pièces de tissus ou des suspensions cellulaires. La cryopréservation des tissus par congélation a, pour sa part, montré une forte mortalité cellulaire et une pauvre survie des transplants (Sauer et al., 1992).

Un autre point important est l'apparition de dyskinésies. En effet, plusieurs essais ont démontré l'apparition de dyskinésies après des greffes de cellules fœtales (Freed et al., 2001; Hagell et al., 2002; Ma et al., 2002; Olanow et al., 2003, 2009b). Plusieurs hypothèses sont envisagées : la présence de dyskinésies provoquée par l'administration de la L-dopa avant la greffe, la réinnervation non homogène du putamen de l'hôte par les neurones greffés (Ma et al., 2002), le placement des cellules dans le striatum de l'hôte, la présence de neurones sérotoninergiques parmi les cellules mésencéphaliques à greffer (Barker et al., 2013; Brundin et al., 2010).

Un autre point souligné lors de l'analyse post mortem de certains cerveaux est l'apparition graduelle de corps de Lewy et de neurites de Lewy dans les greffes, après une dizaine d'années (Kordower et al., 2008a, 2008b; Li et al., 2008a). L'augmentation de l' α -synucléine cytoplasmique ainsi que la diminution des niveaux des transporteurs de la dopamine dans les neurones greffés plusieurs années après l'opération, suggèrent que ces neurones sont sujets aux changements dégénératifs au même titre que les neurones dopaminergiques de l'hôte (Kordower et al., 2008a, 2008b).

Enfin, l'allotransplantation ne permet pas de s'affranchir totalement de l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur. Freed et al., n'utilisaient pas d'immunosuppresseurs mais très peu d'amélioration motrice a été observée chez leurs groupes de patients (Freed et al., 2001). Piccini et al., ont quant à eux traité les patients durant 29 mois avant de suspendre les immunosuppresseurs (Piccini et al., 2005). Cet arrêt peut même être risqué puisque Olanow et al., ont observé une perte de récupération fonctionnelle lors de l'arrêt de l'immunosuppression (Olanow et al., 2003). Une réponse immunitaire de patients contre les cellules du donneur a clairement été explicitée dans une publication de Krystkowiak et al., qui

souligne l'intérêt du suivi des malades greffés et de l'éventuelle poursuite d'un traitement immunosuppresseur à long-terme (Krystkowiak et al., 2007).

Toutes ces disparités protocolaires ont conduit à la mise en place d'un nouveau programme clinique multicentrique international de transplantation dans la MP « TRANSEURO » qui a vu le jour en 2010. Cet essai permettra d'approfondir les critères de préparation des tissus, de la sélection des patients, la localisation de la greffe et des aspects post-transplantation comme l'importance de l'immunosuppression et la détermination des causes des dyskinésies (Evans et al., 2012).

I-2.3. La xénotransplantation de tissus porcins

I-2.3.1. Avantages

Suite aux problèmes posés par l'utilisation des fœtus humains, il est apparu nécessaire de se tourner vers d'autres sources cellulaires, avec notamment la possibilité de greffer des cellules d'une autre espèce. Les cellules d'origine porcine sont alors apparues comme la source la plus adéquate pour diverses raisons. Le porc est une espèce déjà étudiée pour la transplantation d'organe chez l'Homme comme le rein, le pancréas ou le cœur. Il est très facile d'élever des porcs, de contrôler leur reproduction et d'avoir en quantité suffisante des embryons porcins. Le temps de gestation de 3 mois, 3 semaines et 3 jours est un délai très court et une portée produit en moyenne une quinzaine d'embryons. De plus, les porcs peuvent être manipulés génétiquement pour faire face à d'éventuels problèmes infectieux ou immunologiques (Cascalho and Platt, 2001). Le cerveau de porc a une taille et un développement similaire au cerveau humain. Plusieurs études ont ainsi pu montrer que les neuroblastes issus de fœtus porcins émettaient des neurites de longueur similaire à celles observées chez l'Homme avec une extension dans le cerveau de l'hôte (Armstrong et al., 2002; Deacon et al., 1994; Isacson and Deacon, 1996; Isacson et al., 1995). D'un point de vue éthique, la population semble réceptive à l'utilisation du porc. Une étude suédoise de 1999 a en effet montré que 73% de la population générale était d'un avis positif à l'utilisation des cellules porcines dans la maladie de Parkinson.

I-2.3.2. Les risques (sanitaires et infectieux)

Un des risques sous jacent à l'utilisation de tissus porcins en transplantation chez l'homme est le risque infectieux zoonotique. Le contrôle des hébergements et la vaccination des porcs limitent fortement ce risque (Fishman, 1998). Les porcs utilisés en recherche expérimentale et clinique sont ainsi élevés dans des conditions EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés) et axéniques. Une grande attention est également portée aux rétrovirus endogènes porcins (PERV) qui une fois relargués par les cellules porcines peuvent infecter les cellules humaines *in vitro* (van der Laan et al., 2000; Patience et al., 1997; Wilson et al., 1998). Une infection par des PERV a été observée dans différents tissus après une greffe d'ilots pancréatiques porcins chez une souris NOD/SCID (van der Laan et al., 2000). Cependant une méta analyse regroupant des patients exposés à des tissus porcins n'a reporté aucune transmission de PERV plusieurs années après la transplantation (Paradis et al., 1999). De plus, une étude clinique basée sur la transplantation de cellules mésencéphaliques de porc chez des patients atteints de la MP n'a pas relevé de contamination rétrovirale (Schumacher et al., 2000). Une des solutions envisagées pour s'affranchir de ce problème est l'utilisation de porcs sans PERV ou avec des PERV inactivés, ou de préparer un vaccin contre les PERV (Fiebig et al., 2003).

I-2.3.3. L'expérimentation animale

Tout comme les neuroblastes d'origine humaine, les neuroblastes isolés du mésencéphale fœtal de porc survivent et se différencient en neurones TH après transplantation. Le prélèvement est réalisé à 27-28 jours de gestation (**Figure 10**) afin de s'assurer de l'immaturité des cellules et des tissus (HogenEsch et al., 2000; Molenaar et al., 1997). Comme leur équivalent humain, les neuroblastes porcins possèdent une capacité de croissance axonale sur de longues distances (Deacon et al., 1994; Thompson et al., 2005). De plus, Isacson et ses collaborateurs ont démontré qu'après transplantation dans le cerveau d'un rat adulte, la croissance axonale s'orientait vers les cibles cérébrales naturelles. Ainsi, les cellules astrogliales porcines migrent préférentiellement vers la matière blanche, alors que les cellules neuronales innervent la substance grise (Isacson et al., 1995). Cette équipe a également montré que des neurones porcins transplantés dans des régions homotypiques ou ectopiques d'un cerveau lésé de rat adulte, émettaient spontanément des axones vers leur site naturel d'innervation (Isacson and Deacon, 1996). Le cerveau adulte posséderait donc un

système de guidage axonal, conservé dans l'évolution, sur de longues distances que les neurones porcins emprunteraient pour atteindre leurs cibles.

L'expérimentation animale a permis de démontrer que des neuroblastes porcins transplantés dans un hôte xénogénique étaient tout à fait capables de s'intégrer et d'être fonctionnels. Ainsi, des neuroblastes porcins transplantés dans le cerveau de rats lésés par la 6-OHDA et traités par des immunosuppresseurs, se différencient en neurones TH⁺, réinnervent le striatum de leur hôte et assurent une récupération des fonctions motrices jusqu'à 19 semaines post-greffe (Galpern et al., 1996; Huffaker et al., 1989).

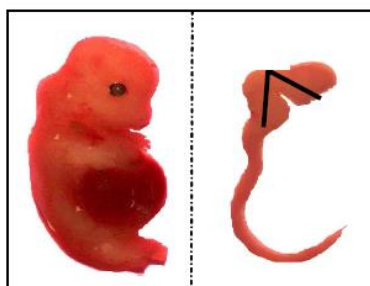


Figure 10 : Localisation du mésencéphale ventral chez un fœtus de porc à 27-28 jours de gestation.

I-2.3.4. Les essais cliniques

Au vu des résultats encourageants obtenus en expérimentation animale, et malgré le peu d'études réalisées, une équipe de chercheurs a décidé de passer au stade clinique.

La première étude clinique fut basée sur la transplantation unilatérale de tissus issus du mésencéphale ventral fœtal de porc (G25-G28) dans le striatum de 12 patients parkinsoniens. Six patients étaient traités avec de la cyclosporine A. Les six autres recevaient un tissu préalablement traité avec un anticorps monoclonal contre le CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de type I). La transplantation s'avéra bien tolérée, sans aucune contamination de la préparation ni de transmission de PERV. Cette étude suivie durant une année rapporta une amélioration motrice variable selon les patients. Trois patients obtinrent un bénéfice moteur de 30%, mais aucune augmentation significative de la capture de Fluorodopa n'a pu être mise en évidence par TEP (Schumacher et al., 2000). L'étude histologique post mortem du cerveau d'un patient, décédé suite à une embolie pulmonaire 7 mois après la greffe, a révélé la présence de 638 neurones dopaminergiques porcins alors que 12 millions de cellules porcines avaient été transplantées. Toutefois, ces neurones étaient bien différenciés,

assurant une innervation du parenchyme cérébral de l'hôte (Deacon et al., 1997; Fink et al., 2000). Malgré le traitement par la cyclosporine A, une infiltration lymphocytaire ainsi qu'une activation microgliale ont été observées au sein de la greffe. Cette observation suggère un environnement inflammatoire néfaste pour la greffe, qu'il faut améliorer pour assurer une survie à long terme des xénogreffes dans le cerveau.

La xénotransplantation est une alternative très prometteuse pour restaurer la synthèse dopaminergique et reconstruire en partie un réseau neuronal, tout en s'affranchissant des considérations éthiques et logistiques. Auparavant, diverses mises au point techniques doivent être assurées afin d'augmenter l'efficacité de cette approche thérapeutique. Ces mises au point doivent notamment être focalisées sur le problème du rejet, qui reste un frein majeur à la xénotransplantation, même si le cerveau bénéficie d'un environnement immunologique favorable.

II. Caractérisation du rejet des xénogreffes intracérébrales

Le système nerveux central (SNC) a longtemps été considéré comme un site immunoprivilégié, au même titre que les yeux, mais plusieurs arguments tendent à relativiser ce propos (Barker and Widner, 2004).

II-1. Le statut immunologique du système nerveux central

Medawar et al., furent les premiers à montrer que le SNC était particulier d'un point de vue immunologique. En effet, ils remarquèrent qu'un morceau de peau de lapin transplanté dans le cerveau d'un autre lapin était rejeté beaucoup moins rapidement que si la greffe était effectuée au niveau de la peau. (Medawar, 1948). Divers arguments sont avancés pour expliquer cette longue survie, comme l'absence de cellules présentatrices d'antigènes dites professionnelles (cellules dendritiques), la faible expression des molécules du CMH-I, l'absence de vaisseaux lymphatiques ainsi que la présence d'une barrière hémato-encéphalique.

II-1.1. La structure anatomique du SNC

II-1.1.1. Architecture

L'anatomie particulière et unique du SNC en fait un site aux relations spéciales, pouvant être considéré comme un environnement immunosuppresseur isolé par plusieurs barrières. Le SNC va ainsi être isolé et protégé par la boîte crânienne et les méninges qui regroupent trois membranes : la dure-mère, la membrane arachnoïde et la pie-mère. L'espace compris entre la membrane arachnoïde et la pie-mère est l'espace sous-arachnoïdien où circule le liquide céphalo-rachidien (LCR). **Figure 11.**

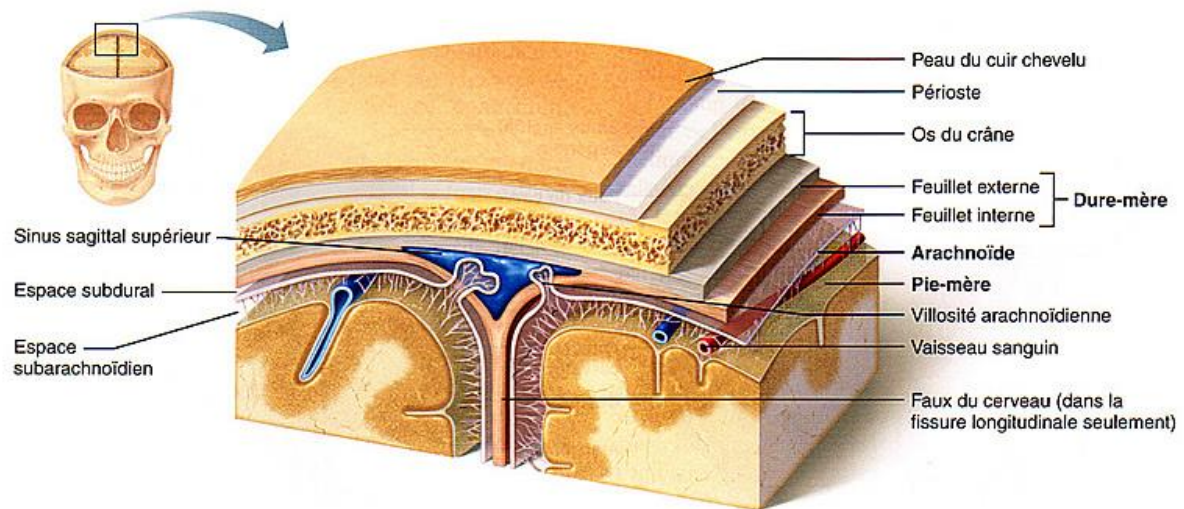


Figure 11 : Architecture du SNC. Adapté de <http://www.corpshumain.ca/>

Le SNC va être divisé en trois compartiments : le sang, le LCR et le tissu cérébral. Ils vont être séparés par trois barrières régulant les échanges : la barrière hémato-encéphalique (BHE) entre le sang et le tissu cérébral, l'épithélium du plexus choroïde entre le sang et le LCR ventriculaire et enfin, l'épithélium arachnoïde entre le sang et le LCR sous-arachnoïdien.

II-1.1.2. Structure et fonction de la BHE

▪ Structure de la BHE

La BHE est composée de plusieurs éléments constituant une interface entre le sang et le parenchyme cérébral. **Figure 12.**

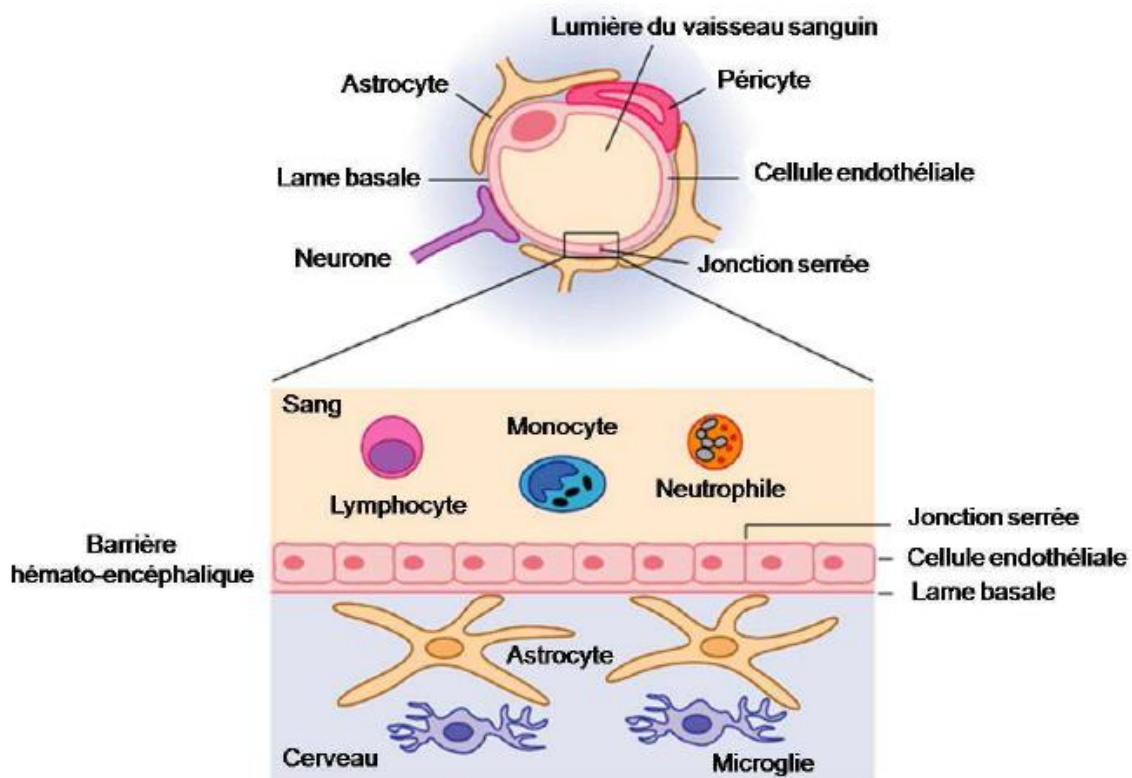


Figure 12 : Structure de la BHE. La BHE est constituée de cellules endothéliales aux jonctions serrées associées à la lame basale qui bordent les vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales interagissent avec différents éléments dont les péricytes, les astrocytes et les neurones périvasculaires. Lorsqu'elle est intacte, la BHE forme, comme son nom l'indique, une véritable barrière pour le passage des molécules de la circulation sanguine. Adapté de <http://www.stanford.edu/>

Les cellules endothéliales qui constituent la BHE forment une monocouche continue qui borde la lumière des capillaires cérébraux. Les cellules ne sont séparées que par des jonctions intercellulaires serrées qui ont pour rôle de limiter le passage des molécules (Rubin and Staddon, 1999; Saunders et al., 1999). Les cellules endothéliales de la BHE diffèrent des autres cellules endothéliales de l'organisme par différents points (Weiss et al., 2009) :

- L'absence de fenestration avec la présence de jonctions serrées intercellulaires
- Un nombre réduit de vésicules de pinocytose
- Un faible niveau de transcytose non spécifique et la diffusion paracellulaire de composants hydrophiles
- Un nombre élevé de mitochondries et donc une forte activité métabolique
- L'expression polarisée de transporteurs et de récepteurs membranaires

Les espaces intercellulaires endothéliaux sont constitués de deux types de jonction : les jonctions serrées et les jonctions d'adhérence. **Figure 13.**

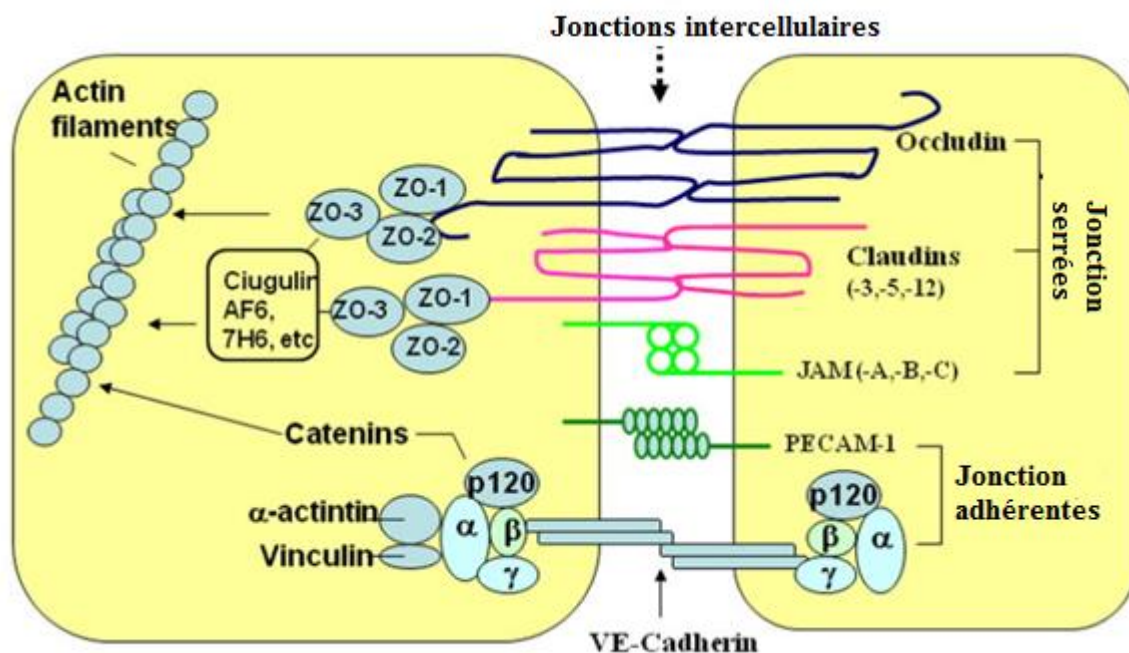


Figure 13 : Composition des jonctions intercellulaires endothéliales de la BHE. Adapté de (Jin et al., 2010).

Les jonction serrées sont composées de trois types de protéines transmembranaires : les occludines, les claudines (3, 5, 12) (Furuse et al., 1999) et des molécules d'adhésion jonctionnelle JAM (junction associated molecules) a,b,c appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Martin-Padura et al., 1998; Petty and Lo, 2002). Ces molécules peuvent se lier avec des protéines cytoplasmiques accessoires : ZO-1,2,3 (zona occludens protein), cinguline (Cordenonsi et al., 1999; Petty and Lo, 2002). Tout ce complexe protéique peut se lier au cytosquelette d'actine. Les jonctions d'adhérence comportent la VE-cadhérine (Vascular Endothelial) et des protéines caténines (Jin et al., 2010; Petty and Lo, 2002). Les composants cytoplasmiques de ces deux jonctions peuvent aussi interagir entre eux (Matter and Balda, 2003).

Plusieurs molécules interagissent avec les cellules endothéliales : les péricytes, les neurones et les cellules gliales comme les astrocytes. L'ensemble va former avec la lame basale, une unité neurovasculaire permettant de contrôler l'intégrité de la BHE (Weiss et al., 2009). Le rôle des astrocytes dans la formation et le maintien de la BHE est bien admis (Bush et al., 1999; Janzer and Raff, 1987). Les pieds astrocytaires qui recouvrent la lame basale, combinés aux cellules microgliales, forment une barrière gliale le long de la membrane

basale. Plusieurs molécules sécrétées par les astrocytes contribuent à l'intégrité de la BHE comme le GDNF, l'angiopoïétine-1 (Hori et al., 2004) et l'angiotensine II (Wosik et al., 2007).

Les péricytes retenues dans l'espace périvasculaire par la lame basale ont aussi un rôle dans l'intégrité structurale (Ramsauer et al., 2002), la régulation et la perméabilité de la BHE (Armulik et al., 2010), la régulation du flux sanguin ainsi que dans la croissance et la différenciation des cellules endothéliales (Hirschi and D'Amore, 1996).

▪ Fonction de la BHE

La fonction principale de la BHE est de maintenir un environnement propice au bon fonctionnement des neurones. Elle contrôle l'homéostasie cérébrale en régulant le passage des molécules entre le sang et le parenchyme cérébral. Le passage au travers de la BHE est déterminé par le poids moléculaire, la charge et le coefficient de solubilité lipidique des molécules (Saunders et al., 1999). Plusieurs mécanismes de transport sont observés. **Figure 14.**

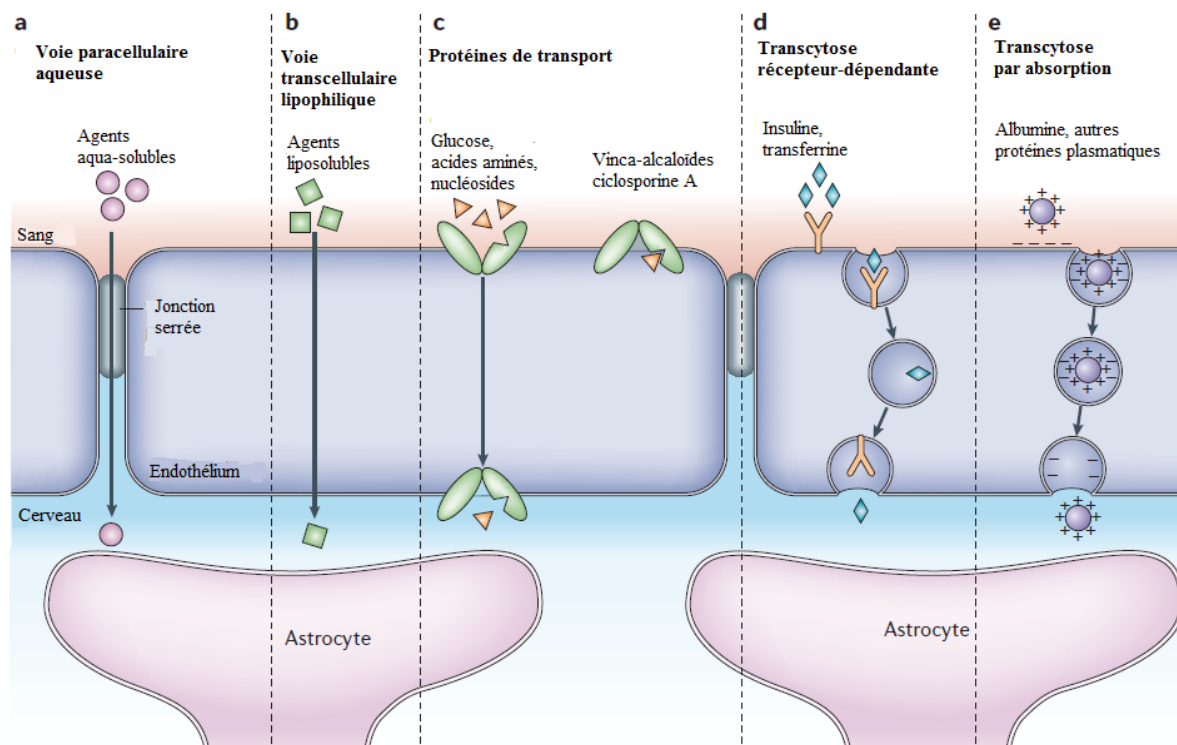


Figure 14 : Les différentes voies de transport au travers de la BHE. Adapté de (Abbott et al., 2006).

- a) La voie paracellulaire aqueuse : les molécules hydrosolubles empruntent cette voie au travers des jonctions serrées.
 - b) La voie transcellulaire : seules les petites molécules comme l'oxygène, le CO₂ ou les agents liposolubles de faible poids moléculaire traversent aisément les lipides membranaires par un transport passif.
 - c) Les protéines de transport : les molécules hydrophiles comme les nutriments (glucose, acides aminés, nucléosides) empruntent le système de transport spécifique polarisé qui exclut les composés non désirés. Les transporteurs GLUT permettent ainsi l'entrée du glucose (Cremer et al., 1983; Vannucci et al., 1997). Certains transporteurs ont, pour leur part, la fonction de rejeter les composés toxiques dans la circulation sanguine (de Lange, 2004). La BHE maintient l'homéostasie en régulant la composition du fluide extracellulaire et le flux d'acide aminés dans le cerveau (Hawkins et al., 2006).
 - d) Les plus grandes molécules hydrophiles comme les peptides et les protéines sont généralement exclues. Certaines, comme l'insuline ou la transferrine, pénètrent tout de même dans le SNC par un transport appelé transcytose dépendant d'un récepteur.
 - e) Des molécules, comme l'albumine ou d'autres protéines plasmatiques naïves, pénètrent selon un mécanisme appelé : transcytose par absorption non spécifique.
- La BHE joue donc un rôle très important dans la limitation du trafic leucocytaire au sein du SNC.

II-1.2. La circulation leucocytaire

II-1.2.1. Le drainage lymphatique particulier

Dans les organes périphériques, la surveillance immune est assurée par le drainage de la lymphe qui transite au sein des ganglions lymphatiques. Le SNC étant dépourvu d'un tel réseau lymphatique, c'est le LCR qui joue un rôle équivalent à celui de la lymphe. **Figure 15.**

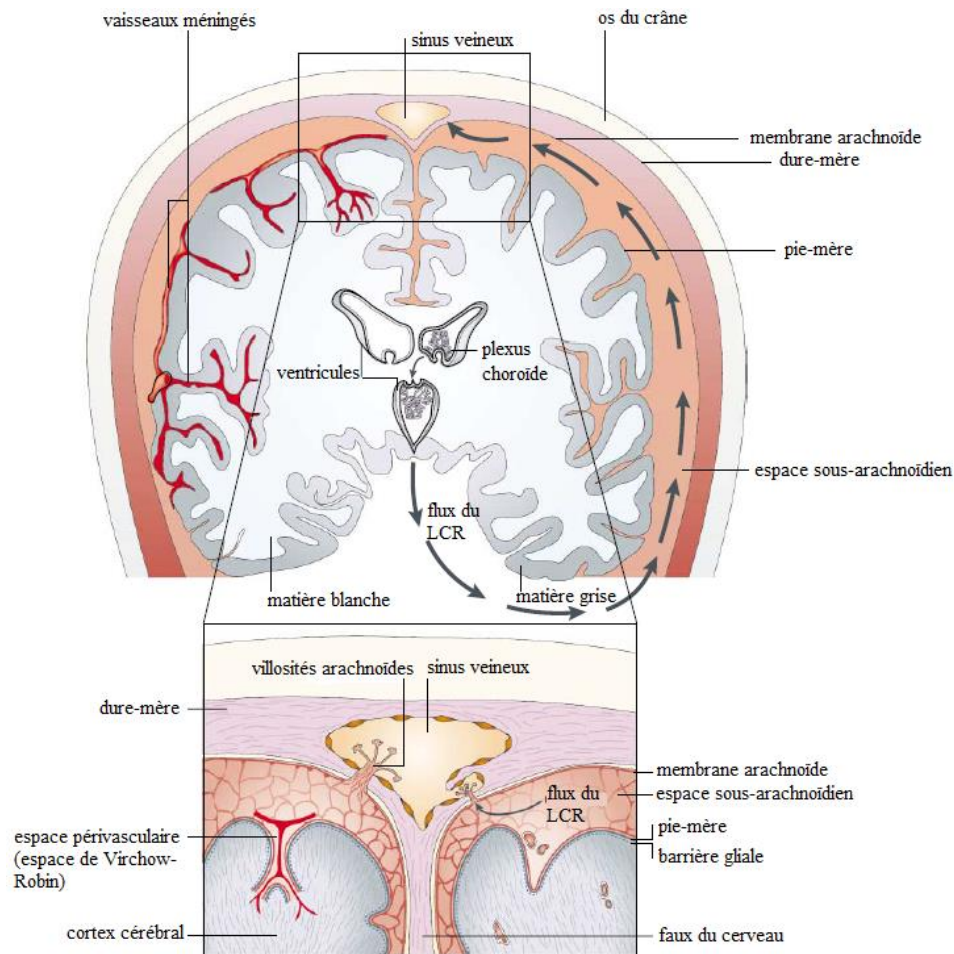


Figure 15 : La circulation lymphatique au sein du SNC. Adapté de (Ransohoff et al., 2003).

Le LCR, sécrété par le plexus choroïde localisé dans les ventricules, circule dans l'espace sous-arachnoïdien, pénètre dans le sang veineux à travers les villosités arachnoïdiennes de la membrane arachnoïde puis gagne la circulation sanguine et la rate (Johanson et al., 2008). Le LCR peut aussi être drainé au niveau de l'espace tissulaire intracrânien via les prolongements de l'espace sous-arachnoïdien le long des nerfs crâniens (Cserr and Knopf, 1992; Widner et al., 1987).

Il est à noter que les antigènes solubles présents dans le liquide interstitiel du parenchyme cérébral peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques profonds (**Figure 16**). Une telle migration a été mise en évidence par Cserr et al., qui avaient observé que l'injection d'antigènes dans le SNC initiait une production d'anticorps dans les ganglions et la rate (Cserr et al., 1992).

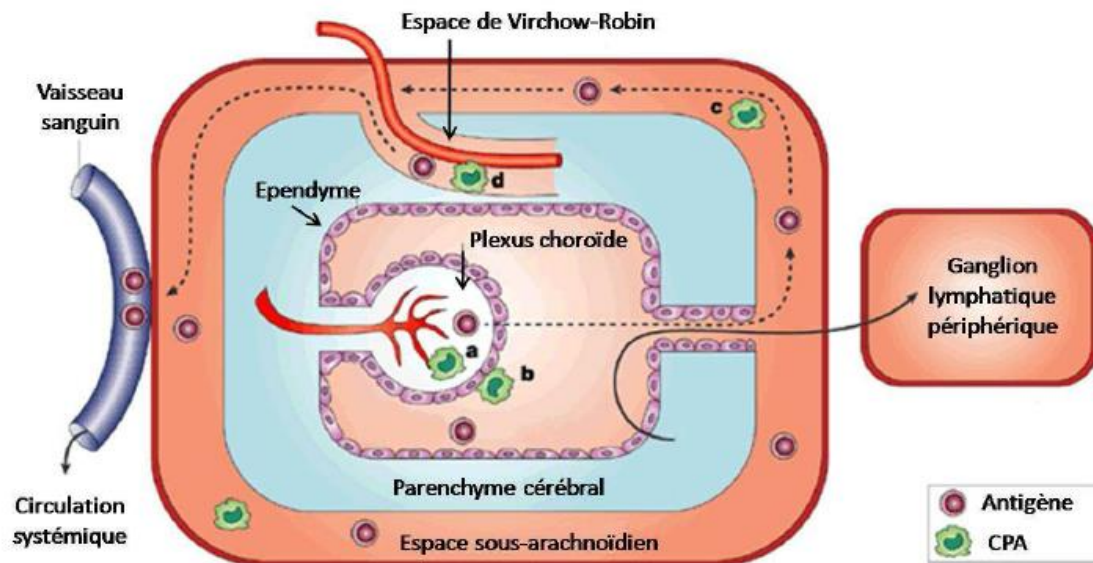


Figure 16 : Le drainage antigénique au sein du SNC. Adapté de (Ransohoff et al., 2003).

Les macromolécules antigéniques solubles présentes dans le liquide interstitiel transitent vers le LCR via la matière blanche à travers l'épendyme qui borde les ventricules, ou via la substance grise le long des espaces périvasculaires (espaces de Virchow-Robin). Les antigènes sont alors drainés vers les ganglions lymphatiques périphériques pour y fournir une stimulation antigénique.

L'espace périvasculaire est sous surveillance permanente afin de limiter l'infiltration des cellules immunes dans le parenchyme cérébral (Bechmann et al., 2001). Dans le cerveau d'un rat sain, des cellules dendritiques et des macrophages sont présents dans le plexus choroïde et les méninges (McMenamin, 1999). En revanche, dans un contexte inflammatoire, les cellules dendritiques peuvent être présentes dans le parenchyme cérébral (Matyszak and Perry, 1996) et migrer vers les ganglions lymphatiques cervicaux afin d'initier une réponse immune (Karman et al., 2004a, 2004b).

II-1.2.2. La migration leucocytaire

Plusieurs voies d'entrée sont utilisées par les leucocytes pour parvenir au SNC. Ils pénètrent par la BHE pour aller du sang à l'espace périvasculaire du parenchyme. Ils passent par le plexus choroïde ou les vaisseaux méningés de l'espace sous-arachnoïdien pour aller du sang au LCR (Man et al., 2007). Dans un cerveau intact, les cellules endothéliales (CE) de la BHE expriment peu les molécules d'adhésion nécessaires à la migration des leucocytes dans

le parenchyme cérébral. Cependant, lors d'une inflammation, les leucocytes peuvent passer au travers de la BHE par un phénomène d'extravasation (**Figure 17**). Les leucocytes se retrouvent alors dans l'espace périvasculaire par un système de migration à travers l'endothélium. Ce phénomène nécessite plusieurs heures contrairement à ce qui est observé pour d'autres organes vascularisés (Laschinger et al., 2002).

Cette migration s'effectue en quatre étapes :

- La **capture et le roulement** assuré par des sélectines et des intégrines.
- L'**activation** des leucocytes caractérisée par l'activation des intégrines.
- L'**arrêt** qui intervient suite à la liaison des intégrines à leurs ligands situés sur l'endothélium.
- La **diapédèse** correspondant à la transmigration endothéliale du leucocyte (Ley et al., 2007). **Figure 17**.

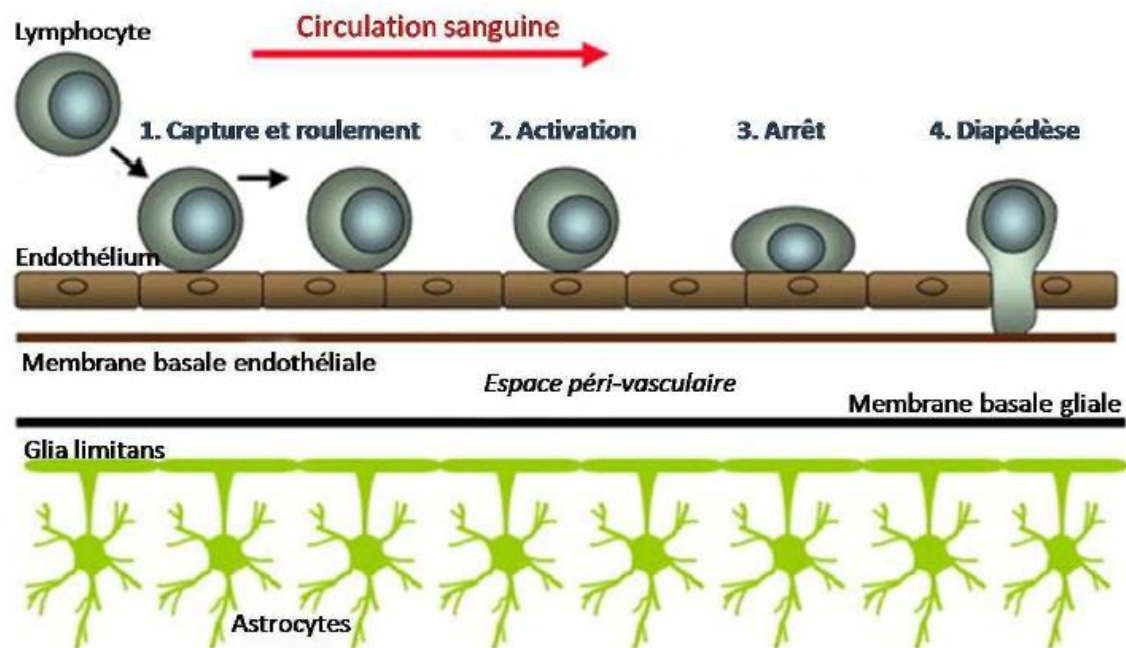


Figure 17 : Extravasation des leucocytes à travers la BHE. Adapté de (Constantin, 2008).

1. Capture et roulement : les leucocytes circulant dans les capillaires sanguins roulent sur l'endothélium entraînés par le flux sanguin. Les leucocytes adhèrent aux CE activées par des liaisons de faible affinité entre les sélectines et leur ligand glycoprotéique. Les leucocytes expriment la L-sélectine. L'E-selectine et la P-sélectine sont respectivement induites à la surface des CE dans les minutes et heures qui suivent le stimulus (Granger and Kubes, 1994). Les leucocytes scannent la surface endothéliale jusqu'à la détection de chimiokines.

2. L'activation : les chimiokines luminales immobilisées par l'association avec des glycosaminoglycannes reconnaissent les récepteurs aux chimiokines sur les leucocytes, ce qui induit des signaux conduisant au rapprochement et au changement conformationnel des intégrines des leucocytes. Ceci permet une adhésion de forte affinité entre les intégrines et leurs récepteurs sur les CE que sont les molécules ICAM-1, VCAM-1. Les leucocytes vont exprimer l'intégrine LFA-1 qui va se lier à ICAM-1 (Laschinger et al., 2002) et VLA-4 ou $\alpha 4$ -intégrine, le ligand de VCAM-1 (Vajkoczy et al., 2001).
3. L'arrêt : la liaison entre les intégrines et leur ligand provoque l'arrêt des leucocytes sur les CE au niveau d'une jonction inter-endothéliale.
4. Diapédèse : les leucocytes vont s'étendre et émettre des protusions enrichies en récepteurs de chimiokines afin d'inspecter l'environnement sous-luminal. Les chimiokines et leur gradient chimio-attractant vont guider les leucocytes pour leur extravasation dans l'espace périvasculaire. Le passage au travers de la glia limitans s'effectue, quant à lui, à l'aide de métalloprotéinases matricielles produites par les leucocytes.

En condition physiologique, peu de leucocytes pénètrent dans le SNC (Hickey, 1999). En revanche, en cas de réaction immunitaire systémique, un grand nombre de lymphocytes T (LT) peut traverser la BHE (Hickey and Kimura, 1987). La migration des LT nécessite leur activation, un phénomène indépendant de la compatibilité du CMH des cellules T avec l'hôte, du phénotype des LT, de la présence dans le SNC de l'antigène recherché, de la nature antigénique ou du potentiel pathogénique des cellules (Hickey, 1999). Une stimulation antigénique récente semble suffisante (Fritz et al., 2000). Néanmoins, le SNC reste un environnement hostile à la survie des LT. En effet, une grande partie des LT activés qui pénètre dans le tissu nerveux va rapidement dégénérer (Pender, 2007). Les cellules T infiltrantes sont détruites par apoptose dépendamment ou non d'une reconnaissance antigénique (Bauer et al., 1998). Un des mécanismes impliqués dans ce phénomène est la voie Fas/FasL (Suvannavejh et al., 2000). Les neurones, la microglie et les astrocytes expriment FasL (CD95L) induisant l'apoptose des cellules T activées qui expriment le récepteur Fas/Apo1 (CD95) (Bechmann et al., 1999; Choi and Benveniste, 2004; Flügel et al., 2000). D'autre part, plusieurs cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et l'IL-10 libérées dans le milieu interstitiel suite à l'apoptose renforcent la régulation immune (Chen et al., 1998; Li et al., 2000).

Les cellules B sont, pour leur part, normalement absentes du parenchyme cérébral. Par contre, lorsqu'un antigène est infusé dans le SNC, les cellules B spécifiques de cet antigène

sont activées, traversent la BHE, se différencient en plasmocytes et sécrètent des anticorps dans le liquide interstitiel (Knopf et al., 1998).

II-1.3. Les cellules immunocompétentes du SNC

Le parenchyme cérébral est dépourvu de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) usuelles telles que les cellules dendritiques (Perry, 1998). Cependant, d'autres cellules comme la microglie peuvent être apparentées à des CPA capables de présentation antigénique.

II-1.3.1. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont d'origine mésodermique. Durant le développement embryonnaire, elles prolifèrent activement puis entrent dans le SNC (Alliot et al., 1999). Dans un cerveau sain adulte, les cellules possèdent une morphologie ramifiée avec une faible expression des molécules CD14, CD45, CD11c, du récepteur au fragment Fc (Becher and Antel, 1996; Carson et al., 1998), de CD4 (Perry and Gordon, 1987) et du CMH-II (Perry, 1998; Ulvestad et al., 1994a). Elles sont alors considérées comme immatures. Suite à une inflammation, les cellules vont être activées et arborer un phénotype macrophagique (Kreutzberg, 1996). C'est la raison pour laquelle elles sont considérées comme les macrophages du SNC. **Figure 18.**

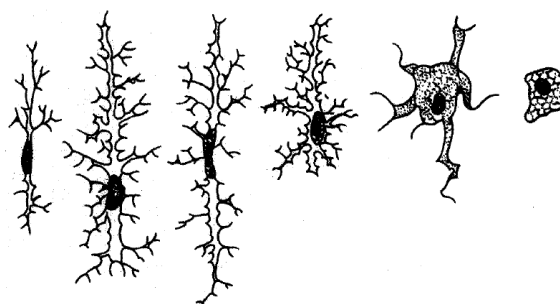


Figure 18 : Transformation d'une microglie résidente ramifiée en une microglie activée au phénotype amiboïde macrophagique. Adapté de (Kreutzberg, 1996).

Lors d'événements inflammatoires dans le SNC, la microglie va surexprimer le CMH-II, ce qui va lui permettre de participer à la présentation antigénique (Sedgwick et al., 1998; Ulvestad et al., 1994a, 1994b). Les molécules de co-stimulation CD40, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) vont également être surexprimées, ce qui leur permet d'activer des cellules T naïves ou

mémoires présentes dans le parenchyme cérébral (Aloisi, 2001; Becher and Antel, 1996). Il est à noter que la microglie peut induire et réguler les réponses de type Th1 et Th2 (Aloisi et al., 1998, 1999, 2000a). En parallèle, la microglie va synthétiser des cytokines pro-inflammatoires mais également des chimiokines (Hanisch, 2002). Les cytokines vont accentuer le phénomène inflammatoire en augmentant la production de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales (Pober et al., 1986) et la perméabilité de la BHE (Brett et al., 1989). Ce phénomène, associé au pouvoir attractif des chimiokines, va favoriser le recrutement des leucocytes dans le SNC. De plus, les cellules microgliales sécrètent des metalloprotéinases nécessaires au passage des leucocytes au travers de la glia limitans (Cross and Woodroffe, 1999).

Outre leur activité pro-inflammatoire, les cellules microgliales produisent des facteurs neurotrophiques suggérant un rôle neuroprotecteur de ces cellules au sein du SNC (Block and Hong, 2005; Elkabes et al., 1996; Nakajima et al., 2001).

II-1.3.2. Les macrophages périvasculaires

Les macrophages périvasculaires diffèrent de la microglie par une plus grande expression des marqueurs CD45, CD14 et CMH-II (Becher and Antel, 1996; Carson et al., 1998). Ils ont également la particularité d'avoir une activité phagocytaire même au repos (Mato et al., 1996). Les macrophages périvasculaires vont ainsi pouvoir stimuler les cellules T CD4⁺ de manière plus efficace que la microglie résidente (Ford et al., 1996).

La microglie périvasculaire est idéalement située entre les vaisseaux sanguins et le parenchyme cérébral pour une présentation antigénique aux LT ainsi que pour la re-stimulation des LT activés en périphérie (Hickey and Kimura, 1988; Streit, 2002).

II-1.3.3. Les astrocytes

Les astrocytes forment la principale population gliale du SNC. Ils assurent différentes fonctions comme le support métabolique pour les neurones, le relargage de neurotransmetteurs, la production de facteurs neurotrophiques, la régulation de l'homéostasie ionique, l'induction et le maintien de la BHE. Leur implication dans la régulation de la réponse immune innée a aussi pu être démontrée. Ainsi, ils expriment les PRR, les récepteurs au mannose et du complément. Les astrocytes vont donc avoir un double rôle entre l'inflammation et la régénération tissulaire, avec la sécrétion de molécules pro et anti-

inflammatoires, de chimiokines et de facteurs neurotrophiques. Elles vont alors, d'une part amplifier la réponse innée locale et, d'autre part, en augmentant la perméabilité de la BHE, l'attraction des cellules immunes, l'activation et la prolifération de la microglie, supporter une réponse adaptative (Farina et al., 2007).

Contrairement aux cellules microgliales, l'implication des astrocytes dans la présentation antigénique est très controversée. Quelques équipes de recherche ont montré qu'*in vitro*, les astrocytes activés pouvaient exprimer les molécules d'adhésions ICAM-1, des molécules CMH-II et les molécules de co-stimulation B7.1 et B7.2, suggérant que les astrocytes auraient une capacité de présentation antigénique et de stimulation des cellules T naïves et mémoires (Aloisi et al., 1998; Fontana et al., 1984; Nikcevich et al., 1997; Shrikant et al., 1995; Soos et al., 1998; Tan et al., 1998; Wong et al., 1984). En revanche, d'autres équipes soutiennent que l'expression de CMH-II et des molécules de co-stimulation par les astrocytes serait un évènement très rare (Matsumoto et al., 1989) et que les astrocytes n'auraient pas la capacité d'induire une présentation antigénique et la prolifération des cellules T (Cash and Rott, 1994; Cross and Ku, 2000).

Les travaux d'Aloisi et al., ont conduit à l'hypothèse que les astrocytes ne permettraient pas une activation de Th1 mais interviendraient dans la re-stimulation Th2 (Aloisi et al., 1998, 1999, 2000b) avec notamment la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires.

Selon Hailer et al., les astrocytes sécrèteraient des facteurs solubles capables de désactiver les macrophages en inhibant l'expression des molécules d'adhésion et du CMH-II. En inhibant l'activité de CPA des macrophages, les astrocytes auraient plutôt un rôle immunorégulateur (Hailer et al., 1998).

II-2. Le rejet des xénogreffes intracérébrales

Un des problèmes majeurs de la xénogreffe intracérébrale est le rejet. En effet, des neurones xénogéniques implantés dans un cerveau sont systématiquement rejetés, même si la réponse immune est plus lente que dans le reste de l'organisme (Brevig et al., 2000; Duan et al., 1995; Finsen et al., 1991; Larsson and Widner, 2000; Larsson et al., 2001a; Michel et al., 2006; Rémy et al., 2001; Wood et al., 1996). Une méta analyse a montré que le taux de survie d'une xénogreffe de cellules neurales porcines dans le cerveau de rat était inférieur à 7% sans traitement par la cyclosporine A (Pakzaban and Isacson, 1994).

II-2.1. L'absence de rejet hyper aigu

Les xénogreffes entre espèces relativement distantes d'un point de vue phylogénique appelés discordantes (ex : du porc à l'homme), sont distinguées des xénogreffes concordantes entre espèces plus proches (ex : du primate à l'homme). Cette distinction se traduit par des variations dans la réponse immune (Auchincloss and Sachs, 1998).

Lors d'une xénogreffe discordante d'un organe vascularisé, le rejet intervient dans les minutes ou les heures qui suivent l'implantation. Ce rejet est fortement lié à un niveau élevé de xénoanticorps naturels pré-formés présents dans le sérum de l'Homme et de certains primates non humains (PNH). Un grand nombre de ces anticorps est dirigé contre l'épitope Gal $\alpha(1,3)$ Gal présent à la surface de nombreuses cellules de mammifères, notamment les cellules endothéliales (Galili, 1993; Galili et al., 1984, 1993; Sandrin et al., 1993). L'interaction des anticorps anti-gal avec leur épitope conduit à une activation du complément et à un rejet hyper aigu caractérisé par une hémorragie, une thrombose intravasculaire, puis l'ischémie et la nécrose rapide du greffon (Collins et al., 1995; Dalmaso et al., 1992). Pourtant, ce type de rejet n'est pas observé dans le cas de xénogreffes intracérébrales de cellules neurales porcines. Cela s'explique par le fait que la greffe est réalisée avec une suspension cellulaire qui contrairement à un organe ne contient pas de vaisseaux intacts.

II-2.2. Le rejet cellulaire

Le rejet cellulaire fait intervenir différents effecteurs que sont les cellules T, les phagocytes et les cellules NK (natural killer). La réponse cellulaire suite à une xénogreffe dans le cerveau est très bien décrite dans la littérature.

II-2.2.1. Implication des cellules microgliales

Les cellules microgliales/macrophages périvasculaires font partie des cellules présentatrices d'antigènes capables d'activer les cellules T naïves ou mémoires dans un contexte inflammatoire (Aloisi et al., 2000b). Elles sont donc tout à fait susceptibles de contribuer au rejet cellulaire en cas de xénogreffes intracérébrales. Leur possible contribution a été confortée par les expériences de Brevig et al., qui montrent que la présence de cellules microgliales/macrophages exprimant les molécules CMH-I et CMH-II dans la suspension de

cellules neurales porcines suffit à induire la prolifération des cellules T humaines (Brevig et al., 1997, 1999). Cet effet est inhibé par un traitement avec du sérum humain ou avec des anticorps anti-gal et du complément (Brevig et al., 1997, 2001). Un autre point important est que les cellules microgliales vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines susceptibles d'induire la réponse immune. Dès les premiers jours qui suivent la transplantation de neurones xénogéniques, une activation microgliale se met place avec notamment l'expression de MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), une chimiokine connue pour son rôle dans la migration leucocytaire au sein du SNC (Melchior et al., 2002). Cette réponse précoce n'entraîne cependant aucune infiltration lymphocytaire significative (Melchior et al., 2002; Rémy et al., 2001). Une seconde activation des cellules microgliales est observée vers 5 à 7 semaines alors que le processus de rejet devient visible (Duan et al., 1995; Larsson et al., 2001a; Michel-Monigadon et al., 2010; Rémy et al., 2001). **Figure 21.** Une accumulation des transcrits codants pour des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6, TNF α , IFN γ et des chimiokines comme MCP-1 et RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) est alors observée (Melchior et al., 2002). L'IL-1 est impliquée dans la médiation de la mort neuronale (Loddick et al., 1998; Rothwell et al., 1997), l'IL-6 dans l'initiation et la coordination des réponses inflammatoires (Hanisch, 2002), l'IFN γ dans la surexpression des molécules CMH-I, II et la polarisation de la réponse Th1/Th2. La synthèse de TNF α va, pour sa part, entretenir l'activation autocrine microgliale et accentuer la destruction neuronale, via le relargage du glutamate par les astrocytes (Bezzi et al., 2001). Le TNF α comme l'IL-1 augmente l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales vasculaires (Pober et al., 1986) et la perméabilité de la BHE (Brett et al., 1989), ce qui favorise le recrutement des leucocytes dans le parenchyme cérébral. L'IFN γ sécrété par les cellules T a aussi un rôle majeur dans l'activation des cellules microgliales en CPA (Aloisi et al., 2000a).

L'activation microgliale observée dans le cerveau lors d'une xénogreffe contribue très probablement à la présentation antigénique, au recrutement des cellules immunes et/ou aux processus inflammatoires observés au moment du rejet.

II-2.2.2. Implication des astrocytes

Une astrogliose est observée au sein même de la greffe dans les premiers jours qui suivent la transplantation ainsi qu'au moment du rejet (Michel et al., 2006). Les astrocytes activés produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF α et

l'IL-6 qui peuvent jouer un rôle essentiel dans l'initiation et le maintien de la réponse immune. Les astrocytes activés produisent également du G-CSF et GM-CSF qui sont des facteurs importants pour le recrutement et l'activation des cellules immunes comme la microglie (Aschner, 1998).

II-2.2.3. Rôle des cellules NK

Les cellules NK sont les cellules effectrices de la réponse innée. Comme elles expriment le récepteur capable de reconnaître le fragment Fc des immunoglobulines, elles peuvent se lier au complexe antigène-anticorps et induire une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity) via la sécrétion de perforines et granzymes. Elles peuvent aussi induire l'apoptose par contact cellulaire via la liaison Fas/FasL.

En 1999, Sumitran et al., ont montré que les cellules NK humaines étaient tout à fait capables de lyser les cellules neurales porcines, soit après activation par l'IL-2, soit en présence d'anticorps naturels du sérum humain (Sumitran et al., 1999a). Leur participation au rejet d'une xénogreffe intracérébrale semble toutefois peu probable, car des cellules NK ont rarement été détectées dans les cerveaux greffés (Rémy et al., 2001) et l'absence de ces cellules ne prolonge pas la survie de la greffe (Larsson et al., 2001b).

II-2.2.4. Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les CPA « professionnelles » de l'organisme, en assurant la capture de l'antigène et la présentation antigénique. Dans un cerveau de rat sain, elles sont localisées dans le plexus choroïde et les méninges (McMenamin, 1999). En cas de xénogreffe intracérébrale, on les détecte au sein de la greffe durant les quelques jours qui suivent la transplantation et au moment du rejet (Michel et al., 2006). **Figure 21.** Ce timing combiné à la fonction de CPA des cellules dendritiques a conduit à l'hypothèse que lors de leur premier contact avec les cellules neurales porcines, ces cellules initieraient une réponse cellulaire en présentant les antigènes porcins aux cellules T naïves présentes dans les organes lymphoïdes, puis elles infiltreraient à nouveau le greffon au moment du rejet car les LT ont besoin d'être réactivés pour avoir une activité optimale (Michel et al., 2006). A ce propos, il a été montré que les cellules dendritiques présentes dans le LCR pouvaient migrer jusqu'aux

organes lymphoïdes secondaires afin de présenter un antigène aux cellules T naïves (Karman et al., 2004a, 2004b) et aux cellules B (Hatterer et al., 2006).

II-2.2.5. Rôle des cellules T

Le rôle des cellules T dans le rejet cellulaire est déterminant et plusieurs éléments mettent en avant leur implication dans le rejet d'une xénogreffe intracérébrale de cellules neurales. Tout d'abord, les cellules du mésencéphale ventral de porc, une fois mises en culture, induisent la prolifération des cellules T humaines (Brevig et al., 1997). Ensuite, l'utilisation de drogues immunosuppressives comme la cyclosporine A connue pour supprimer la réponse T, entraîne une augmentation de la survie de la xénogreffe (Brundin et al., 1989; Pakzaban and Isacson, 1994). D'autre part, le traitement des animaux receveurs avec des anticorps dirigés contre les cellules T comme l'anti-fragment $\alpha\beta$ du récepteur des cellules T (anti-TCR $\alpha\beta$), l'anti-CD2 (Okura et al., 1997) ou l'anti-récepteur à l'IL-2 (Honey et al., 1990), prévient le rejet. Ces observations sont bien sûr associées au fait qu'une infiltration massive du greffon par les LT précède le rejet définitif des cellules greffées (Duan et al., 1995; Larsson et al., 2001a; Michel et al., 2006; Michel-Monigadon et al., 2010; Rémy et al., 2001). **Figure 21.** Parmi les LT, on distingue deux types de sous-populations :

- **Les cellules T CD4**

Les lymphocytes T CD4⁺ ont pour particularité de reconnaître des peptides antigéniques présentés par des molécules CMH-II exprimées à la surface des CPA (Kalish, 1995). Ils ont une fonction auxiliaire dans la réponse immune d'où leur nom lymphocytes T auxiliaires ou T helper (Th). Les cellules T CD4⁺ sont les premières à reconnaître un agent étranger. Grâce à la sécrétion de cytokines, elles activent les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ainsi que les lymphocytes B qui produisent les anticorps. Elles exercent également des effets autocrines sur les cellules CD4⁺ et des effets paracrines sur les cellules microgliales/macrophages. L'activation des LT CD4⁺ permet donc le recrutement de nombreuses cellules effectrices. Leur implication dans le rejet des xénogreffes intracérébrales a été démontrée par la longue survie observée lors d'une déplétion des cellules CD4⁺ (Wood et al., 1996). De même, une xénotransplantation de neurones dans le cerveau d'une souris déficiente en CMH-II permet une survie prolongée de la greffe (Duan et al., 2002).

De par leur profil de sécrétion cytokinique, on distingue deux sous-populations de cellules CD4⁺ appelées Th1 et Th2 (Mosmann et al., 1986). **Figure 19.**

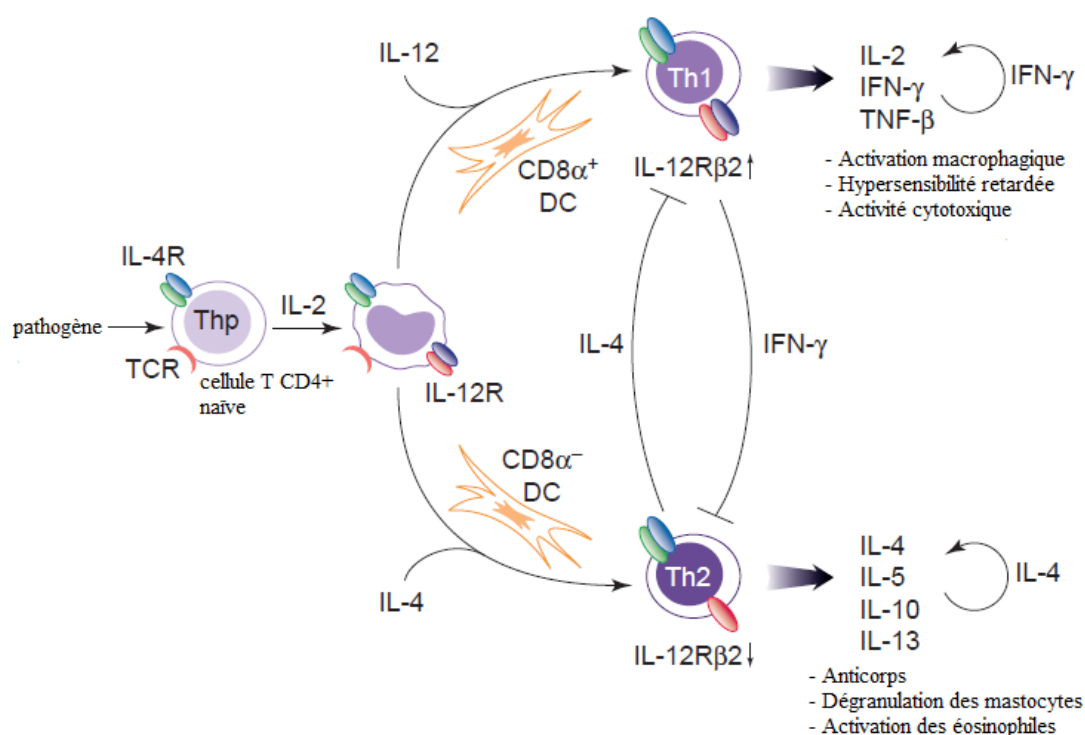


Figure 19 : La différenciation des cellules T CD4⁺ en Th1 et Th2. Adapté de (Rengarajan et al., 2000).

Les cellules T CD4 naïves sont activées via le TCR lors de la liaison avec un antigène présenté par les CPA. Les cellules Th prolifèrent, sécrètent de l'IL-2 et expriment le récepteur à l'IL-12, devenant alors des cellules Th0. La polarisation en Th1 s'effectue lors de l'activation du récepteur à l'IL-12 et du contact avec des cellules dendritiques CD8⁺. Les cellules Th1 induisent principalement une réponse immune cellulaire. Elles sont impliquées dans des réactions inflammatoires de type hypersensibilité retardée provoquées par les macrophages. L'activation du récepteur de l'IL-4 et le contact avec des cellules dendritiques CD8⁻ induisent une différenciation en cellules Th2. Les cellules Th2 favorisent une réponse de type humorale avec notamment la sécrétion d'anticorps. Les cellules Th2 sont également impliquées dans les réponses allergiques. L'analyse des cytokines lors du rejet de xénogreffes porcines dans le striatum de rat suggère une contribution majeure des cellules Th1 (Melchior et al., 2002).

- Les cellules T CD8

Les cellules T CD8⁺ reconnaissent des peptides présentés par des molécules CMH-I (Kalish, 1995). Elles peuvent sécréter des cytokines mais elles induisent généralement la lyse directe des cellules cibles, d'où leur nom de lymphocytes T cytotoxiques (LTc). Cette lyse s'effectue suite à une interaction Fas/FasL ou bien encore, grâce à des perforines/granzymes (Sad et al., 1996).

Les neurones n'expriment pas constitutivement le CMH-I (Neumann et al., 1995, 1997) et sont réfractaires à leur induction par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ . Ils ne peuvent donc pas être détruits directement par les LTc, ce qui les rend d'ailleurs sensibles aux infections virales persistantes (Joly et al., 1991). Cependant, cette absence d'induction ne concernerait que les neurones électriquement actifs. En présence d'IFN γ , les neurones fonctionnellement détériorés pourraient exprimer le CMH-I et interagir avec les LTc (Neumann et al., 1995, 1997).

Dans le cas des xénogreffes neurales, la déplétion des LT CD8⁺ (Wood et al., 1996) ou l'utilisation de souris receveuses déficientes en molécules du CMH-I (Duan et al., 2002), ne permet pas une meilleure survie du transplant, suggérant un rôle mineur des LT CD8⁺ dans le rejet.

- Mécanisme d'activation des cellules T

Le premier contact entre la cellule T et les CPA s'effectue par l'intermédiaire de molécules d'adhésion. L'activation complète des LT nécessite deux types de signaux. **Figure 20.**

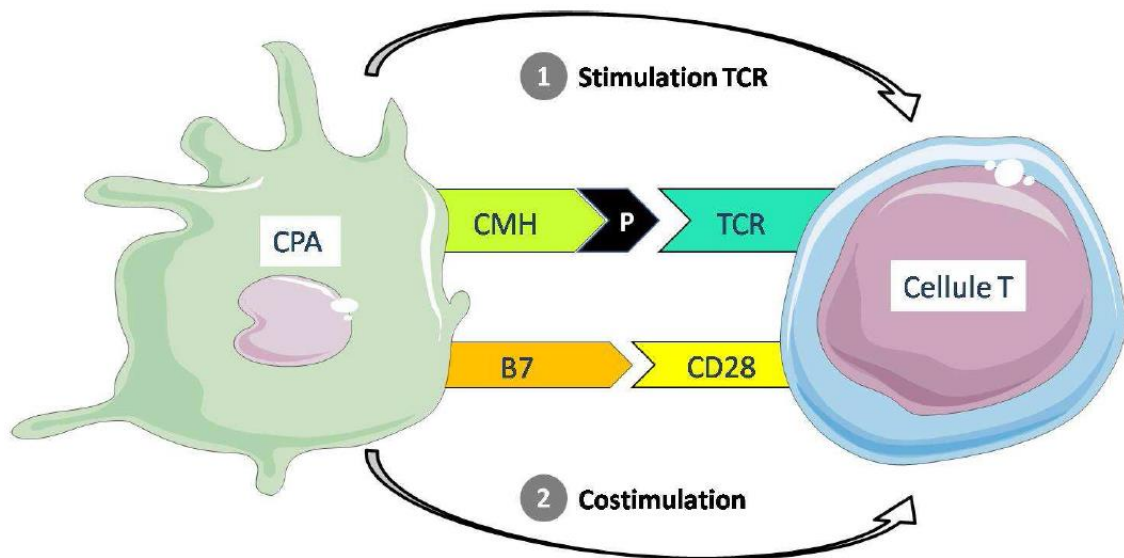


Figure 20 : Mécanisme d'activation des cellules T.

Le premier signal, l'interaction entre le récepteur des cellules T (TCR) et le complexe CMH-peptide de la CPA conduit à un signal de faible intensité qui induit une première réponse effectrice comme par exemple, la production de cytokines. Cette interaction bloque la prolifération clonale du LT susceptible d'induire son apoptose (Russell et al., 1991). Le site d'interaction est appelé « synapse immunologique » (Grakoui et al., 1999). Un second signal, appelé signal de costimulation, est en fait nécessaire pour compléter l'activation. Ce signal est notamment induit par l'interaction entre la molécule CD28 présente à la surface des LT et les molécules CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2), présentes à la surface des CPA. Cette interaction permet l'activation complète des LT (Lanzavecchia, 1997; Lenschow et al., 1996). Ce signal fait aussi intervenir des molécules d'adhésion (LFA-1/ICAM) et des molécules accessoires (CD2/LFA-3) pour stabiliser l'interaction T/CPA.

Le blocage du signal de co-stimulation par des anticorps bloquants (Larsson et al., 2003), ou par l'expression de CTLA4-Ig (Martin et al., 2005), a été envisagé pour limiter la prolifération des LT et augmenter la survie des xénogreffes neurales porcines. La molécule CTLA4-Ig, une protéine de fusion, peut en effet bloquer le signal de costimulation en se liant à B7 (Linsley et al., 1991).

II-2.2.6. Cinétique de l'infiltration des cellules immunes dans une xénogreffe intracérébrale de cellules neurales porcines

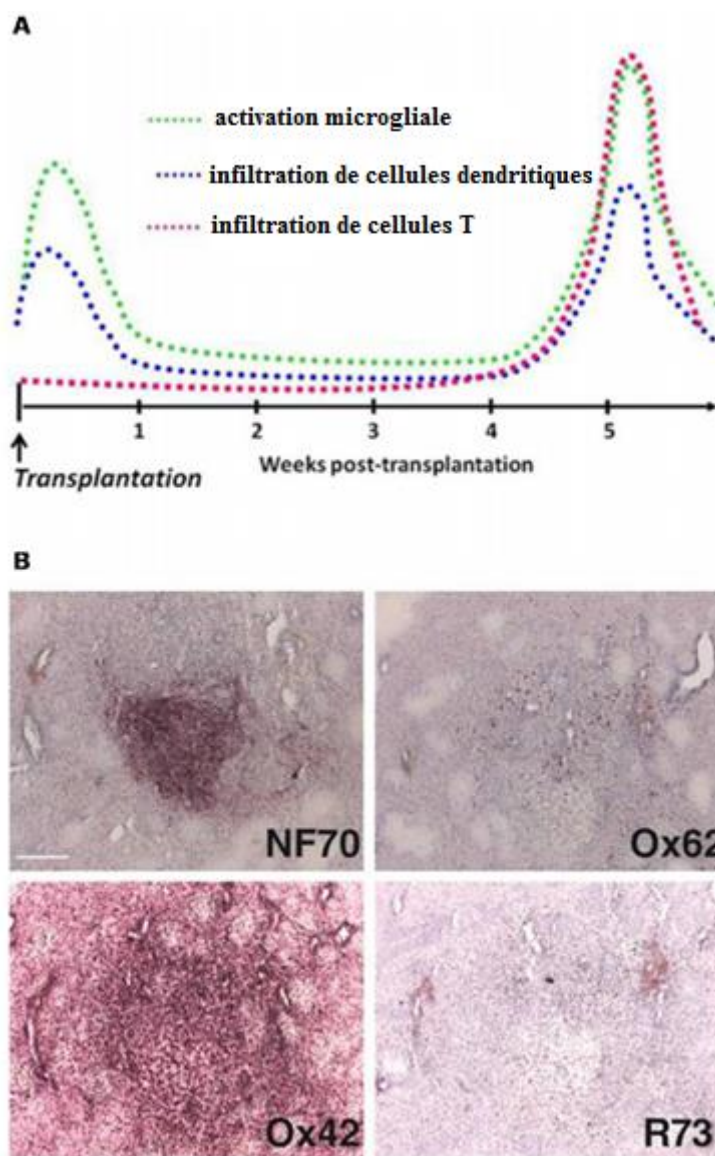


Figure 21 : Profil d'infiltration des cellules immunes dans une greffe intrastriale de cellules du MV fœtal porcine chez le rat. Adapté de (Bonnamain et al., 2012).

A. Dans les jours qui suivent l'implantation des cellules, la présence d'un faible nombre de cellules dendritiques ainsi qu'une activation microgliale sont observées. Cette première activation disparaît, c'est la phase de latence qui précède l'étape de rejet. Ce rejet intervient autour de la 5^{ème} semaine post-greffe. Il est caractérisé par une forte activation microgliale et par une infiltration massive du greffon par des LT et des cellules dendritiques.

B. Analyses immunohistochimiques du greffon au moment du rejet. NF70 : neurones porcins, Ox62 : cellules dendritiques, Ox42 : cellules microgliales/macrophages, R73 : cellules T.

II-2.3. Le rejet humoral : un rôle encore peu décrit

La réponse immune humorale est le second type de réponse susceptible de conduire au rejet d'une greffe. Cette réponse est liée à l'activation des cellules B productrices d'anticorps.

II-2.3.1. Le système du complément

Le système du complément a un rôle central dans la réponse immune innée en assurant la défense de l'hôte contre des pathogènes. Trois voies activent le système du complément : la voie classique du complément, la voie alterne du complément et la voie des lectines (MBP) liant les résidus mannose des membranes bactériennes. **Tableau 2.**

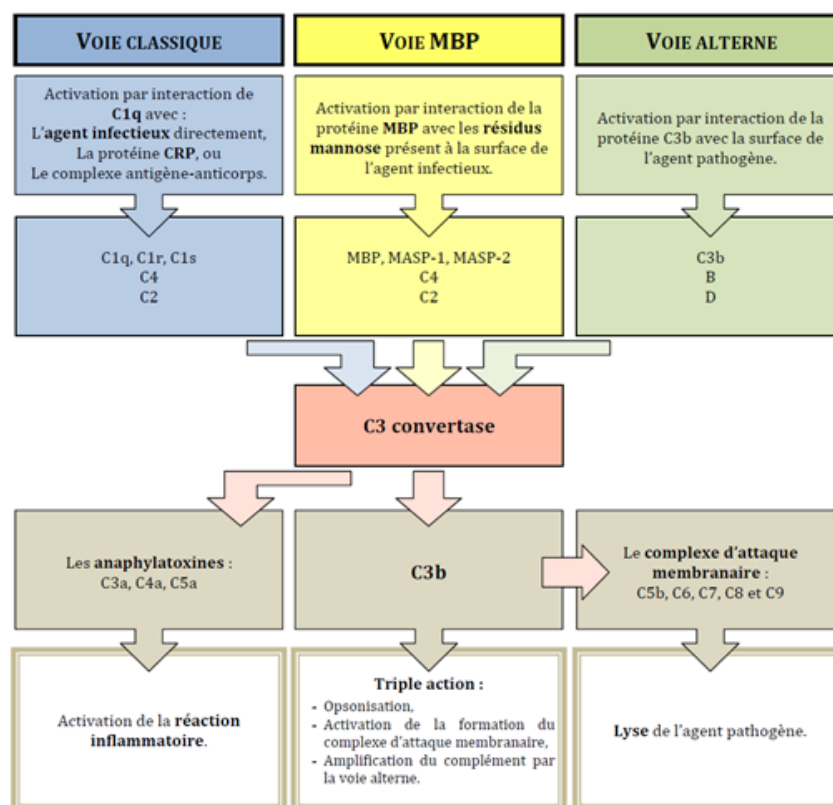


Tableau 2 : Les différentes voies d'activation du complément. Adapté de <http://www.cours-pharmacie.com>. Les trois voies conduisent à l'activation de C3 convertase et à la libération des composants du complément.

Dans le SNC, le système du complément est impliqué dans les activités cytotoxiques et cytolytiques à travers la formation du complexe d'attaque membranaire (complexe C5b-9) sur les membranes des cellules cibles. Il peut jouer aussi un rôle dans le remodelage et la

réparation du tissu cérébral. Les neurones, astrocytes, cellules microgliales et oligodendrocytes expriment les protéines du complément et les neurones sont particulièrement sensibles aux dommages induits par le complément (Gasque et al., 2000; Lucas et al., 2006). Une des hypothèses formulées serait que les débris cellulaires et les cellules apoptotiques recouverts de molécules du complément (C1q et fragment C3), seraient reconnus et éliminés par les macrophages/cellules microgliales exprimant des récepteurs du complément (C1qRp, CR3, CR4) (Gasque et al., 2000).

In vitro, il a été montré que les facteurs de complément humain provoquaient la lyse des cellules neurales porcines après liaison à des anticorps (Sumitran et al., 1999b). Un rôle du complément dans le rejet de xénogreffes neurales a été suggéré par Barker et al., qui montre qu'une déplétion du complément par l'injection du facteur de venin de cobra durant 7 jours prolonge la survie des cellules transplantées, mais cet effet est transitoire et la greffe est finalement rejetée (Barker et al., 2000).

II-2.3.2. Rôle des anticorps

- **Production par les cellules B**

Les cellules B subissent une première différenciation dans la moelle osseuse, puis elles migrent dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate, les ganglions lymphatiques où elles se différencient en cellules mémoires ou en plasmocytes (Janeway et al., 1987).

Figure 22.

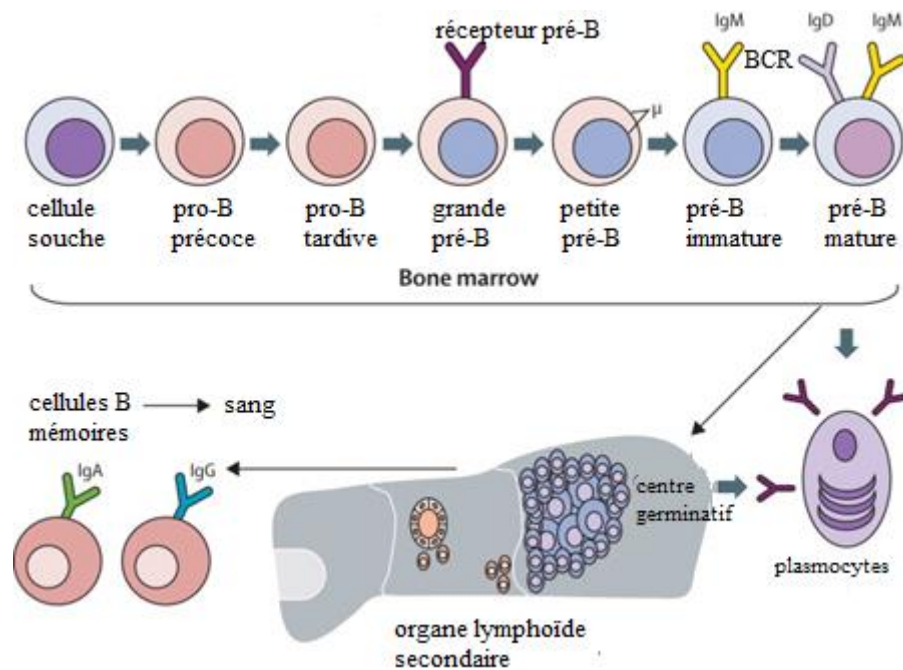


Figure 22 : Développement et différenciation des cellules B. Adapté de (Park et al., 2008c).

Les cellules B se différencient selon deux phases (Monson, 2008) :

- une phase indépendante des antigènes qui se déroule dans la moelle osseuse : les cellules B dérivées des cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules B matures par une chronologie de recombinaisons des gènes des immunoglobulines. Ce qui aboutit à la constitution d'un récepteur B (BCR) pour l'antigène, spécifique pour chaque LB.
- une phase dépendante des antigènes qui se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires : lorsque les cellules B par l'intermédiaire du BCR rencontrent un antigène spécifique, elles s'activent et peuvent présenter l'antigène à un LT. Elles forment alors des centres germinatifs dans lesquels elles prolifèrent. Puis elles se différencient en plasmocytes producteurs d'anticorps ou en cellules B mémoires.

▪ Structure des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines qui ont une structure tertiaire qui leur permet de reconnaître et de fixer de manière spécifique des antigènes. **Figure 23.**

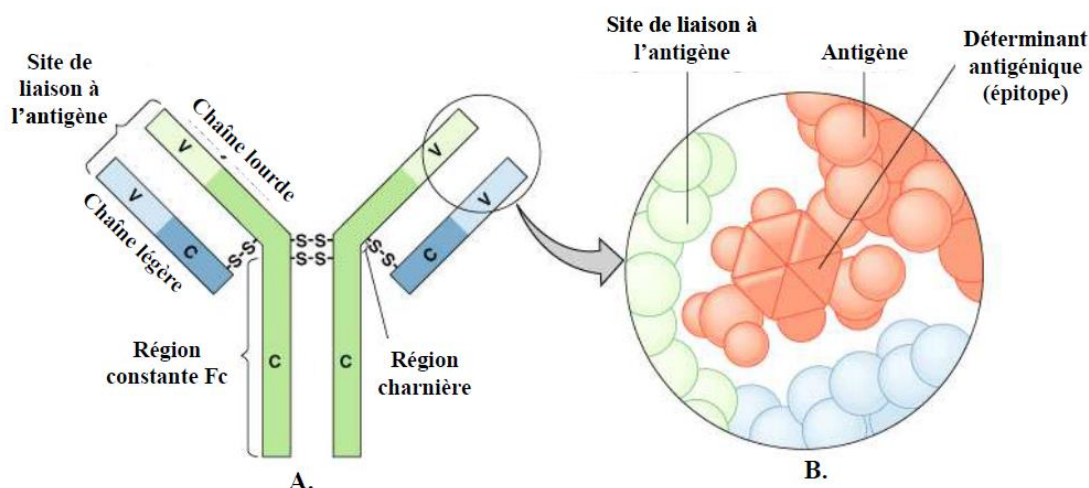


Figure 23 : Structure d'une immunoglobuline.

Les immunoglobulines sont constituées d'une chaîne lourde (verte) et d'une chaîne légère (bleue) reliées entre elles par des ponts disulfures intra et inter-chaînes, assurant la flexibilité de la molécule. Chaque chaîne possède des domaines constants et des domaines variables. Les régions constantes Fc sont caractérisées par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre. Elles interviennent dans l'activation du complément. L'association entre le domaine variable de la chaîne lourde et celui de la chaîne légère adjacente constitue le site de liaison à l'antigène (paratope). Il existe 5 classes ou isotypes d'anticorps classés selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes : Immunoglobuline M (initie la voie classique d'activation du complément), IgD (activation des lymphocytes B), IgE (réponses immunitaires allergiques, neutralisation des parasites), IgA (neutralisation des bactéries, virus) et IgG, la plus abondante (neutralisation des toxines, virus, bactéries, activation du complément). Les anticorps ont pour fonction la liaison à l'antigène, l'activation du complément et l'activation de cellules immunocompétentes (ADCC).

▪ Rôle des anticorps dans le rejet

Un rôle des anticorps dans le rejet de xénogreffes discordantes prend son sens par la présence dans le sérum humain de xénoanticorps naturels comme notamment l'anti-Gal dirigé contre l'épitope Gal $\alpha(1,3)$ Gal (Galili, 1993; Galili et al., 1984, 1993; Sandrin et al., 1993). C'est ainsi qu'ont été créés des porcs déficients pour l' α -1,3 galactosyltransférase, l'enzyme responsable de l'expression de l' α -gal (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002b; Phelps et al., 2003). Les tissus mésencéphaliques issus de cerveaux fœtaux porcins expriment également l'épitope

α -gal (Harrower et al., 2002), ouvrant la possibilité d'une attaque des cellules par des anticorps anti-Gal. Cependant, un sérum humain déplété en anticorps anti-gal lyse les cellules mésencéphaliques alors que cette opération prévient la lyse des cellules endothéliales aortiques porcines. Cette observation suggère la présence dans le sérum d'autres anticorps naturels capables de reconnaître des épitopes spécifiques à la surface des cellules du mésencéphale ventral fœtal porcin (Harrower et al., 2002; Sumitran et al., 1999b).

Concernant la présence d'anticorps au sein des xénogreffes, il est à noter que les premiers jours suivant la xénotransplantation neuronale, les anticorps peuvent pénétrer dans le parenchyme cérébral suite à la rupture de la BHE. La BHE restant ouverte de une à deux semaines (Brundin et al., 1989). C'est pourquoi Barker et al., observent une infiltration d'IgM au sein de la greffe les dix premiers jours suivant la transplantation. Par contre, aucune détection systémique d'anticorps n'est visualisée (Barker et al., 2000) et aucun rejet humoral ne se met en place. L'implication des anticorps dans le rejet de la greffe fut suggérée par l'étude de Larsson et al., où ils observaient une survie prolongée de la greffe dans le cerveau de souris déficientes en immunoglobulines (Larsson et al., 1999). Cette hypothèse est confortée par le fait que les anticorps possèdent la capacité de pénétrer dans le parenchyme cérébral lorsque la BHE est intacte. En effet, lors de l'injection intrathécale d'un antigène, celui-ci peut être drainé aux ganglions lymphatiques et provoquer une réponse humorale (Cserr et al., 1992). De plus, les cellules B activées peuvent aussi migrer au cerveau et synthétiser l'anticorps spécifique de l'antigène (Knopf et al., 1998).

Cependant, le rôle de la fonction des anticorps et de leurs mécanismes dans le rejet des cellules neurales fœtales porcines est encore peu clair et reste à préciser.

L'importance de caractériser le rejet est essentielle pour déterminer les moyens de le limiter. Les immunosuppresseurs sont couramment employés en xénotransplantation, mais leur action n'est que transitoire et plusieurs effets secondaires apparaissent. En effet, ces drogues étant injectées dans la circulation systémique, une néphrotoxicité ainsi que l'apparition de lymphomes sont constatées. Il est donc important d'essayer de trouver une immunosuppression à l'action locale et, dans ce contexte, l'emploi des cellules souches apparaît encourageant.

III. Les cellules souches comme source cellulaire : propriétés trophiques et immunorégulatrices

III-1. Caractéristiques des cellules souches

III-1.1. Propriétés

Les cellules souches possèdent plusieurs propriétés qui les définissent et en font une source cellulaire attractive pour la médecine régénérative. Ce sont des cellules immatures capables de se diviser, de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier en différents lignages cellulaires tissus spécifiques. Elles peuvent être classées en différents types selon leur origine spatio-temporelle et leur potentiel de différenciation (potence) **Figure 24** :

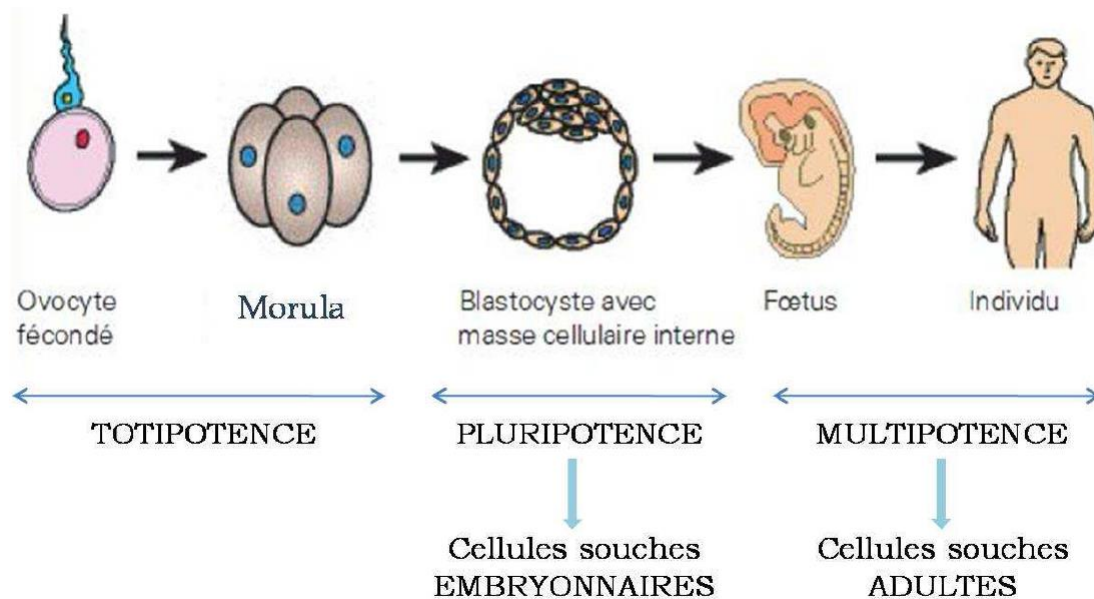


Figure 24 : Les différents types de cellules souches.

- Les cellules souches totipotentes : ces cellules peuvent se différencier en tous les types cellulaires, embryonniques et extra-embryonniques. Elles sont présentes du stade zygote jusqu'au stade « 8 cellules » de la morula.
- Les cellules souches pluripotentes : elles sont issues de la masse interne du blastocyste et correspondent aux cellules souches embryonnaires. Elles peuvent générer les cellules des trois lignées germinales : endodermique, mésodermique, ectodermique

mais ne peuvent plus générer les cellules des annexes embryonnaires. Les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS) issues de la reprogrammation de cellules somatiques adultes font aussi partie de cette catégorie.

- Les cellules souches multipotentes : elles vont se différencier en cellules d'une seule et même lignée germinale, soit endodermique, soit mésodermique, soit ectodermique. Ce sont des cellules présentes chez le fœtus mais également dans certaines niches de l'organisme adulte.
- Les cellules souches unipotentes : elles ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire.

III-1.2. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) extraites du blastocyste possèdent un potentiel d'auto-renouvellement, de prolifération à long terme, permettant d'obtenir une expansion en culture illimitée. Elles peuvent se différencier dans toutes les cellules de l'organisme issues des trois feuillets germinaux embryonnaires. Les CSE peuvent alors être expansées en culture pendant de longues périodes tout en gardant leur pluripotence, leur capacité de prolifération et un caryotype normal (Amit et al., 2000; Suemori et al., 2001; Xu et al., 2001). Elles ont pour la première fois été isolées de la masse interne du blastocyste de souris en 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Isolées du blastocyste et placées dans une boîte de culture contenant des fibroblastes de souris irradiés ayant un rôle de cellules nourricières (feeders), les cellules vont alors pousser dans un milieu supplémenté en sérum et en facteur de croissance afin d'établir une lignée de CSE maintenues à un stade indifférencié et pluripotent. **Figure 25.** L'un des facteurs utilisés pour le maintien de l'auto-renouvellement des CSE murines est le LIF (facteur inhibiteur de leucémie), qui peut alors se substituer à l'utilisation de feeders (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988).

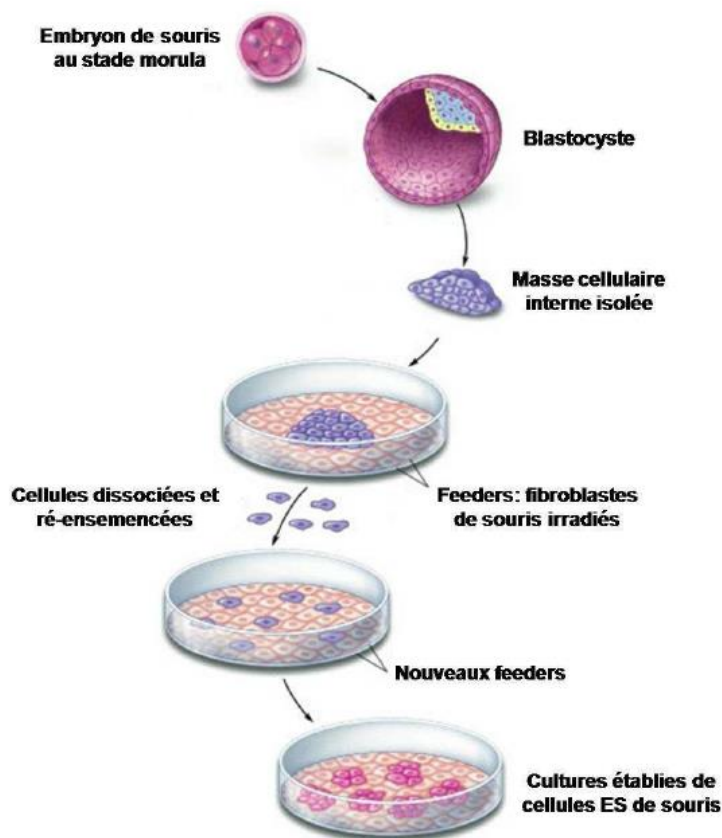


Figure 25 : Etapes pour l'établissement d'une culture de CSE. Adapté de news-medical.net

Les CSE ne furent isolées que très récemment des blastocystes de rat (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008b) mais la première lignée humaine fut établie en 1998 par Thomson et al., (Thomson et al., 1998).

L'intérêt des CSE pour la thérapie restauratrice réside dans leur capacité à générer tous les types cellulaires présents dans un organisme, notamment les neurones. A l'aide de protocoles de culture très spécifiques, des précurseurs neuronaux puis des neurones matures fonctionnels ont été obtenus à partir de CSE (Bain et al., 1995; Carpenter et al., 2001; Fraichard et al., 1995; Goetz et al., 2006; Ko et al., 2007; Kozubenko et al., 2010; Li et al., 1998; Reubinoff et al., 2001; Sonntag et al., 2007; Ying et al., 2003; Zhang et al., 2001). Leur intérêt en thérapie restauratrice a été testé en transplantant des CSE de souris (Bjorklund et al., 2002) ou des cellules progénitrices neuronales dérivées de CSE humaines (Iacovitti et al., 2007; Ko et al., 2007, 2009) dans le cerveau d'un rat modèle de la MP. Les auteurs ont rapporté une survie et une différenciation dopaminergique des cellules, corrélées à une récupération fonctionnelle des rats. Ceci a été observé jusqu'à un an post-greffe (Geeta et al., 2008). D'autres études tempèrent ces résultats en ne démontrant aucune ou une faible récupération fonctionnelle liée à un faible taux de différenciation des cellules en neurones

dopaminergiques (Brederlau et al., 2006; Ben-Hur et al., 2004). Plusieurs équipes ont alors essayé d'accentuer la différenciation dopaminergique avant transplantation, en cultivant les cellules en présence de cellules stromales (feeders) et de facteurs trophiques (Buytaert-Hoefen et al., 2004; Correia et al., 2007; Iacovitti et al., 2007; Kawasaki et al., 2000, 2002; Lee et al., 2000; Morizane et al., 2002; Shimada et al., 2009; Takagi et al., 2005), et/ou de facteurs de différenciation dopaminergique (Barberi et al., 2003; Cho et al., 2008; Geeta et al., 2008; Kriks et al., 2011; Park et al., 2005, 2004; Perrier et al., 2004; Roy et al., 2006; Sanchez-Pernaute et al., 2008; Shimada et al., 2009; Yan et al., 2005; Zeng et al., 2004). Des manipulations génétiques basées sur la transduction de facteurs transcriptionnels impliqués dans le développement dopaminergique ont aussi été tentées (Chung et al., 2002; Friling et al., 2009; Hedlund et al., 2008; Kim et al., 2006, 2002; Martinat et al., 2006; Zhou et al., 2009). Selon les auteurs, la transplantation de ces dérivés de CSE enrichis en neurones dopaminergiques dans le cerveau de modèles rat (Cho et al., 2008; Friling et al., 2009; Hedlund et al., 2008; Kriks et al., 2011; Roy et al., 2006; Sanchez-Pernaute et al., 2008; Yang et al., 2008) ou souris (Barberi et al., 2003; Morizane et al., 2002) de la MP a conduit à une récupération fonctionnelle des animaux, liée à la présence d'un nombre important de neurones dopaminergiques au sein du greffon. Les mêmes approches réalisées avec des CSE issues de primates humains ou non humains et transplantées ont aussi démontré une survie des neurones TH⁺, une récupération fonctionnelle (Kriks et al., 2011) et une augmentation de la capture de fluorodopa par TEP (Doi et al., 2012; Takagi et al., 2005) chez des singes lésés par du MPTP. Il est cependant à noter que d'autres équipes n'ont pas observé de récupération motrice (Park et al., 2005).

Bien que les CSE offrent de nombreux atouts, plusieurs obstacles majeurs freinent leur utilisation en médecine régénératrice comme par exemple :

- le rejet : les CSE expriment faiblement le CMH-I mais l'augmentation de son expression au cours de la différenciation conduit à un risque de reconnaissance des cellules transplantées par les cellules T et à un rejet du greffon (Drukker et al., 2002). Selon les derniers résultats de Drukker et al., cette immunogénicité serait minime comparée aux cellules adultes (Drukker et al., 2006). Li et al., ont, quant à eux, montré que les CSE humaines n'induisaient pas de réponse immune lors de leur transplantation chez une souris immunocompétente. Ils ont également montré que les CSE humaines différenciées ou non différenciées ne provoquaient

pas la prolifération de cellules T humaines alloréactives et avaient même des propriétés immunorégulatrices (Li et al., 2004).

- le risque de tumeur : plusieurs travaux ont répertorié une instabilité phénotypique (Roy et al., 2006; Sonntag et al., 2007) et l'apparition de tératomes suite à la greffe de CSE (Doi et al., 2012). La différenciation des CSE avant transplantation a permis de diminuer le risque de tumorigénicité (Brederlau et al., 2006; Doi et al., 2012; Ko et al., 2009; Kozubenko et al., 2010), mais la survie des cellules est alors moindre et certaines de ces cellules gardent le potentiel de proliférer. Plusieurs solutions sont envisagées afin d'éliminer les cellules contaminantes pluripotentes comme l'insertion de gènes « suicide » (Jung et al., 2007; Schuldiner et al., 2003), une purification et sélection des cellules par FACS (Chung et al., 2006; Hedlund et al., 2008; Pruszk et al., 2007) ou l'utilisation d'agents apoptotiques (Bieberich et al., 2004).

- le problème éthique quant à l'utilisation d'embryons humains.

Ces données limitent donc l'utilisation des CSE pour des essais cliniques. Un travail important reste encore à faire pour contrôler l'efficacité et la sécurité de cette source cellulaire. Il est noter que l'utilisation *in vitro* des CSE peut être intéressante pour le criblage de molécules pharmaceutiques entre autres, mais un certain nombre de pays interdisent toujours la recherche sur ces cellules. La France vient quant à elle récemment de voter une loi autorisant la recherche sur les CSE augurant de belles perspectives dans l'approfondissement des connaissances de ces cellules et de collaborations internationales.

III-1.3. Les cellules souches multipotentes

Bien qu'ayant un potentiel de prolifération et de différenciation plus restreint que les CSE, les cellules souches multipotentes posent moins de problèmes éthiques et de sécurité dans leur utilisation. Ces cellules peuvent être isolées chez le fœtus ou dans certains tissus de l'organisme adulte :

- Les cellules souches fœtales : ces cellules multipotentes sont présentes dans les organes du fœtus issus d'IVG mais aussi dans le sang du cordon ombilical (Buzańska et al., 2002; Rogers

and Casper, 2004) ou dans le liquide amniotique (Anker et al., 2003; Prusa et al., 2004; Tsai et al., 2004).

- Les cellules souches adultes somatiques : elles sont localisées dans plusieurs organes et tissus : intestin, peau, tissu hématopoïétique où elles fonctionnent en permanence, assurant un renouvellement constant pour l'homéostasie et la réparation des tissus endommagés tout en gardant un pool permanent de cellules souches. Elles peuvent aussi être retrouvées dans l'os, le cerveau, le muscle, le pancréas, le foie mais elles sont peu ou pas actives. (Coulombel, 2003).

III-2. Les cellules souches mésenchymateuses

III-2.1. Caractéristiques

La première description des cellules souches mésenchymateuses (CSM) a été réalisée en 1974 par Friedenstein et al., qui les décrit comme des cellules adhérentes issues de la moelle osseuse exhibant l'apparence de fibroblastes (Friedenstein et al., 1974). Elles furent tout d'abord dénommées CFU-F (colony forming unit fibroblastes) car elles proliféraient en formant des colonies. En 1988, elles furent décrites comme des cellules souches stromales capables d'auto-renouvellement et de multipotence (Owen, 1988), avant d'acquérir le terme de cellules souches mésenchymateuses (Caplan, 1991). Les CSM ont été initialement isolées de la moelle osseuse où elles ne représentent que 0,001–0,01% des cellules présentes. A présent, elles sont également isolées à partir de différents tissus comme par exemple, le sang de cordon, le sang, le tissu adipocytaire, les poumons, le placenta. Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules souches adultes multipotentes hétérogènes adhérentes au plastique, à la morphologie de fibroblastes capables de s'expandre en culture en formant de colonies. Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD90, CD73, CD105, CD71, CD44, CD271 et l'absence de marqueurs hématopoïétiques comme CD45, CD14, CD34 et de costimulation comme CD80, CD86, CD40 (Uccelli et al., 2008). Elles peuvent se différencier *in vitro* et *in vivo* en diverses cellules d'origine mésodermique que sont les fibroblastes, les ostéocytes, les chondrocytes et les adipocytes (Pittenger et al., 1999). Au début des années 2000, différents papiers indiquaient que les CSM pouvaient également générer des cellules des lignées endodermiques et ectodermiques par un phénomène appelé

transdifférenciation. **Figure 26.** Selon certains auteurs, il était possible d'induire leur différenciation en cellules neurales (Deng et al., 2006; Sanchez-Ramos et al., 2000; Tropel et al., 2006; Woodbury et al., 2000). Une récupération fonctionnelle et une production de dopamine dans des rats hémi-parkinsoniens ont même été détectées après transplantation de CSM induites vers le lignage neuronal par l'addition de facteurs ou par manipulation génétique (transduction de la TH) (Bouchez et al., 2008; Dezawa et al., 2004; Levy et al., 2008; Lu et al., 2005; Schwarz et al., 1999). Ce phénomène de transdifférenciation fait cependant l'objet de nombreuses controverses et aujourd'hui, un grand nombre de chercheurs s'accordent à dire que le phénomène est trop rare pour être utilisé (Castro et al., 2002; Thomas et al., 2011).

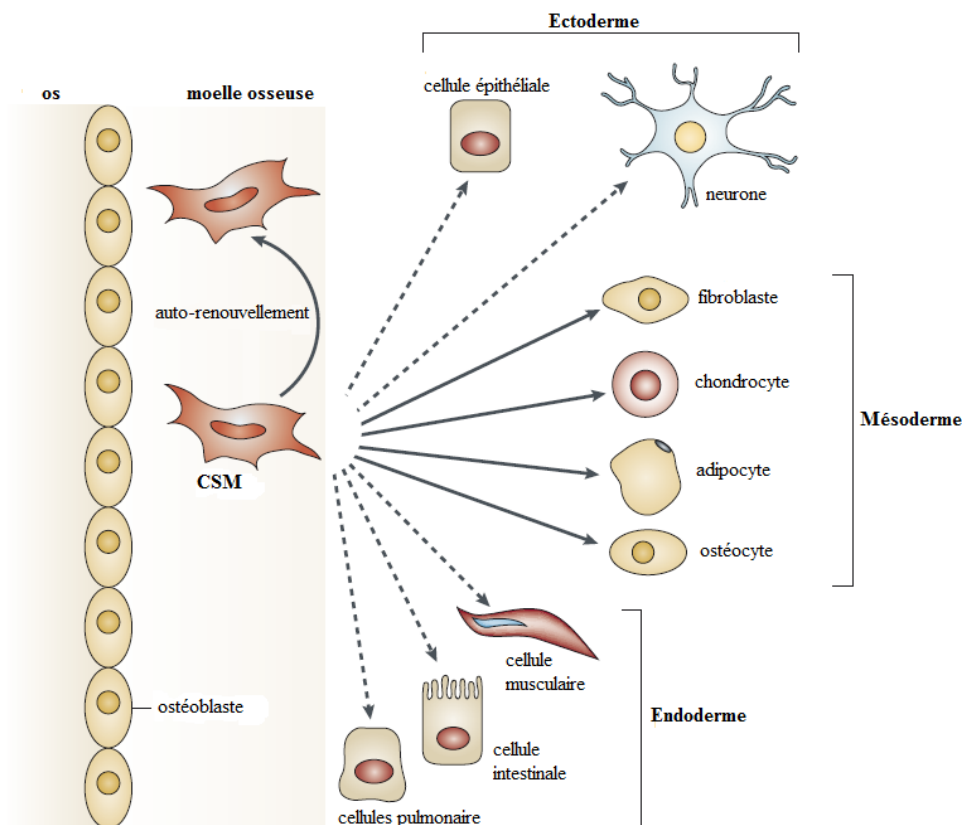


Figure 26 : Potentiel de différenciation des CSM. Adapté de (Uccelli et al., 2008).

Les CSM possèdent la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en cellules de la lignée mésodermique. Par un phénomène de transdifférenciation, les CSM pourraient se différencier en cellules des lignées ectodermique et endodermique mais ce phénomène est controversé.

III-2.2. Propriétés trophiques des CSM

Les premières études de transplantation des CSM ont pu mettre en évidence que les CSM avaient la capacité de migrer et de s'implanter dans le cerveau de rat (Azizi et al., 1998). Plusieurs équipes se sont alors intéressées à l'utilisation des CSM en transplantation intracérébrale et en particulier à leurs propriétés trophiques. Les études suivantes montrèrent que grâce à la sécrétion de facteurs neurotrophiques comme le GDNF et le BDNF, les CSM protégeaient les neurones et permettaient une récupération fonctionnelle dans des modèles rats de la MP (Blandini et al., 2010; Park et al., 2008a) et de la maladie de Huntington (Rossignol et al., 2011). Selon certains travaux basés sur un modèle d'ischémie cérébrale (Bao et al., 2011) ou de la MP (Park et al., 2012), les CSM seraient également capables d'induire une neurogénèse endogène et de protéger de l'apoptose les neurones nouvellement formés. De par leur facilité d'isolation et leur potentiel de prolifération, l'intérêt des CSM s'est alors porté sur la perspective de les utiliser en autotransplantation. En effet, les CSM peuvent être assez aisément prélevées au niveau de la crête iliaque du patient, expansées *in vitro* puis greffées dans le cerveau de ce même individu. Un essai clinique ouvert basé sur l'autotransplantation de CSM dans la zone sous-latéral ventriculaire de patients atteint de la MP a ainsi vu le jour. L'amélioration clinique s'est avérée assez marginale mais aucun effet néfaste, notamment la formation de tumeur, n'a été rapporté jusqu'à 12 mois post-greffe (Venkataramana et al., 2010). Une amélioration fonctionnelle sans apparition d'effets secondaires a toutefois été rapportée par Bang et al., mais cet essai clinique était basé sur la transplantation autologue de CSM dans le cerveau de patients ayant subi un infarctus cérébral (Bang et al., 2005). Un essai clinique récent mené par Venkataramana et al., de transplantation allogénique dans la ZSV de patient parkinsonien, a conforté l'idée que les CSM pouvaient avoir une fonction de neurogénèse et de neuroprotection. Cependant, leur action serait bénéfique pour des phases précoces de la maladie (Venkataramana et al., 2012).

III-2.3. Propriétés immunomodulatrices des CSM

En plus de leur capacité neurotrophique, les CSM présentent des propriétés immunosuppressives qui ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo*.

III-2.3.1. Etudes *in vitro*

Les CSM expriment constitutivement la molécule du CMH-I mais pas les molécules du CMH-II ou de costimulation (Le Blanc et al., 2003; Krampera et al., 2006; Rossignol et al., 2009; Selmani et al., 2008). Lors de leur exposition à des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , les molécules du CMH-I et II sont augmentées (Rafei et al., 2009; Tse et al., 2003) mais pas les molécules de costimulation (Tse et al., 2003). Différentes études *in vitro* ont révélé que les CSM avaient des fonctions immunomodulatrices sur différents types de cellules immunes :

- Les cellules dendritiques

Les CSM peuvent bloquer la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (CD), leur maturation et donc leur fonction de présentatrice d'antigène. Elles vont notamment empêcher les cellules dendritiques de sécréter l'IL-12 et inhiber l'expression des molécules de présentation antigénique et de costimulation (Beyth et al., 2005; Djouad et al., 2007; Jiang et al., 2005; Maccario et al., 2005; Nauta et al., 2006; Zhang et al., 2004) en interférant entre autre sur leur cycle cellulaire (Ramasamy et al., 2007). L'action des CSM sur les CD va entraîner une sécrétion d'IL-10 et une diminution de la synthèse de TNF α par les CD activées (Aggarwal and Pittenger, 2005). L'action inhibitrice des CSM sur les cellules dendritiques va avoir pour conséquence une diminution de l'activation et de la prolifération des cellules T.

- Les cellules T

Les CSM inhibent d'une manière dose-dépendante, la prolifération des cellules T induite par des alloantigènes ou des mitogènes (Bartholomew et al., 2002; Le Blanc et al., 2003; Lanz et al., 2010; Di Nicola et al., 2002; Rasmusson et al., 2005; Tse et al., 2003; Yang et al., 2009). Elles bloquent aussi bien la prolifération des lymphocytes CD4 $^{+}$ que CD8 $^{+}$ (Le Blanc et al., 2004; Krampera et al., 2006; Di Nicola et al., 2002; Ramasamy et al., 2008). Les CSM vont, de même, pouvoir inhiber la formation des lymphocytes T cytotoxiques (Rasmusson et al., 2003). Selon Glennie et al., les CSM inhiberaient la prolifération des LT en bloquant le cycle cellulaire des LT dans la phase G0/G1 (Glennie et al., 2005) mais sans affecter leur activation (Glennie et al., 2005; Ramasamy et al., 2008). Les CSM pourraient

également favoriser l'apparition de LT régulateurs (Aggarwal and Pittenger, 2005; Maccario et al., 2005; Ye et al., 2008) capables d'inhiber la prolifération d'autres LT effecteurs.

- Les cellules NK

Différentes expériences menées *in vitro* indiquent que les CSM seraient capables d'inhiber la prolifération et la capacité cytolytique des cellules NK (Krampera et al., 2006; Spaggiari et al., 2008). Leur présence aurait également pour effet une diminution de la libération d'IFN γ par les cellules NK (Aggarwal and Pittenger, 2005).

- Les cellules B

Les CSM n'induisent pas l'apoptose des cellules B mais arrêtent leur cycle cellulaire en phase G0/G1. Outre leur effet inhibiteur sur la prolifération des LB, les CSM inhibent également leur différenciation. La conséquence est une diminution de la production d'immunoglobulines (Asari et al., 2009; Corcione et al., 2006). Les CSM vont d'autre part diminuer l'expression des récepteurs aux chimiokines par les cellules B, altérant leur propriétés chimiotactiques (Corcione et al., 2006).

- Mécanismes immunosuppresseurs des CSM

Aggarwall et Pittenger ont défini une action immunosuppressive des CSM basée sur l'hypothèse d'un shift d'un environnement pro-inflammatoire en un environnement anti-inflammatoire en présence des CSM. Les CSM inhiberaient la sécrétion d'IFN γ et permettraient la libération d'IL-10 en influant sur la maturation et les fonctions présentatrices d'antigènes des cellules dendritiques. Les CSM diminueraient le niveau d'IFN γ en inhibant les voies des cellules Th1 et cellules NK, et augmenteraient la production d'IL-4 en favorisant la voie des cellules Th2 (Aggarwal and Pittenger, 2005). Cette hypothèse d'une inhibition du profil Th1 en faveur d'une polarisation Th2 fut aussi étayée par Bai et al., (Bai et al., 2009).

Plusieurs mécanismes impliquant des molécules hypothétiques et en particulier des facteurs solubles (Djouad et al., 2007; Di Nicola et al., 2002; Rasmusson et al., 2003; Tse et al., 2003; Yang et al., 2009) ont alors été envisagés dans l'action immunosuppressive des CSM et il semblerait que cela soit dépendant de l'espèce dont les CSM sont isolées (Lanz et al., 2010; Ren et al., 2009). **Figure 27.**

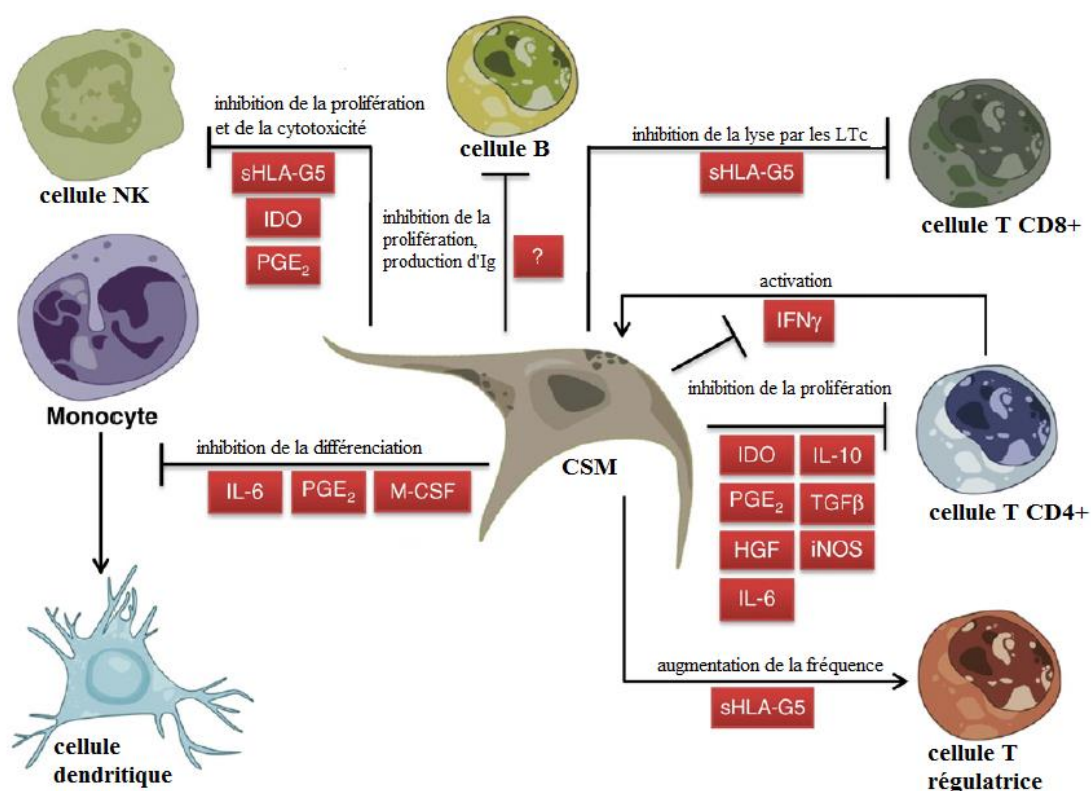


Figure 27 : Molécules hypothétiquement impliquées dans l'activité immunosuppressive des CSM. Adapté de (Ben-Ami et al., 2011).

L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les CSM de souris serait dépendante de l'action de l'oxyde nitrique par l'intermédiaire de la molécule iNOS (inducible nitric oxide synthase) (Ren et al., 2008, 2009; Sato et al., 2007), alors que IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) médierait l'action des CSM humaines et de PNH (Krampera et al., 2006; Meisel et al., 2004; Ren et al., 2009). De plus, un rôle de la prostaglandine E2 (PGE2) dans l'inhibition de la différenciation des cellules dendritiques et de la prolifération des LT par les CSM de rat et d'homme est suggéré (Aggarwal and Pittenger, 2005; Djouad et al., 2007; Spaggiari et al., 2009). PGE2 en synergie avec IDO serait aussi impliquée dans l'inhibition de la prolifération des cellules NK (Spaggiari et al., 2008). TGFβ1 et HGF (hepatocyte growth factor) sont également des molécules suspectées de jouer un rôle dans l'effet immunomodulateur des cellules humaines (Di Nicola et al., 2002) mais leur implication est controversée (Le Blanc et al., 2004; Tse et al., 2003). L'IL-10 (Yang et al., 2009) et HO1 (hème oxygénase 1) (Chabannes et al., 2007) ont également été citées pour leur possible action sur la prolifération des LT, ainsi que l'IL-6 dans l'inhibition de la différenciation des cellules dendritiques (Djouad et al., 2007). Selon Selmani et al., HLA-G5 sécrétée par les CSM humaines serait impliquée dans l'inhibition des fonctions des cellules cytotoxiques T et

NK et la sécrétion d'IFN. Cette molécule favoriserait également l'expansion de cellules T régulatrices et la sécrétion d'IL-10 (Selmani et al., 2008). Il est à noter que l'action des CSM est induite suite à l'action de cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ et est favorisée par la sécrétion de chimiokines par les CSM, permettant une migration des LT à leur proximité (Ren et al., 2008, 2009).

III-2.3.2. Etudes *in vivo*

L'activité immunosuppressive des CSM a également été mise en évidence *in vivo*. Ainsi, des CSM transplantées dans le cerveau d'un hôte allo ou xénogénique survivent jusqu'à 63 jours sans signe de réponse immune (Rossignol et al., 2009). Il a également été rapporté que la transplantation de CSM dans des modèles de maladie inflammatoire (EAE de la sclérose en plaque) atténuait les poussées inflammatoires et ainsi, réduisait la sévérité des symptômes cliniques (Bai et al., 2009; Gerdoni et al., 2007; Harris et al., 2012a; Kassis et al., 2008; Rafei et al., 2009; Zappia et al., 2005). Un effet bénéfique a également été observé dans un modèle de lésion cérébrale traumatique (Galindo et al., 2011). Les CSM favoriseraient la régénération des tissus, limiteraient l'infiltration des cellules immunes dans le SNC ainsi que la circulation de molécules pro-inflammatoires. La modulation de l'inflammation au niveau du site lésé permettrait de créer un environnement favorable à la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales endogènes (Bai et al., 2009; Galindo et al., 2011; Harris et al., 2012a) favorisant ainsi une régénération du tissu lésé. Les travaux de Kim et al., sur un modèle d'inflammation intracérébrale par le LPS, suggèrent que les CSM auraient un effet protecteur sur les neurones dopaminergiques en diminuant l'activation microgliale et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Kim et al., 2009e).

Par ailleurs, en cas d'inflammation locale, les CSM migreraient vers le site enflammé (Bai et al., 2009; Gerdoni et al., 2007; Kassis et al., 2008; Rafei et al., 2009; Zappia et al., 2005) mais également dans les organes lymphoïdes secondaires (Gerdoni et al., 2007; Kassis et al., 2008; Zappia et al., 2005).

De par leur propriétés neurotrophiques et immunomodulatoires, les CSM apparaissent comme de bonnes candidates à la transplantation intracérébrale. Mais d'autres types cellulaires comme les cellules souches/progénitrices neurales ont aussi des propriétés intéressantes.

III-3. Les cellules souches/progénitrices neurales

III-3.1. Propriétés

III-3.1.1. Caractéristiques des CSN

Il est aujourd'hui bien établi que le SNC fait l'objet d'un renouvellement cellulaire au cours de l'âge adulte. Ce processus est rendu possible grâce à l'existence, dans certaines régions du cerveau, de cellules souches résidentes : les cellules souches neurales (CSN) (Reynolds and Weiss, 1992). Les CSN sont une population de cellules multipotentes hétérogènes capables d'auto-renouvellement et de prolifération. Elles peuvent générer les trois types cellulaires principaux du SNC que sont les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. **Figure 28.**

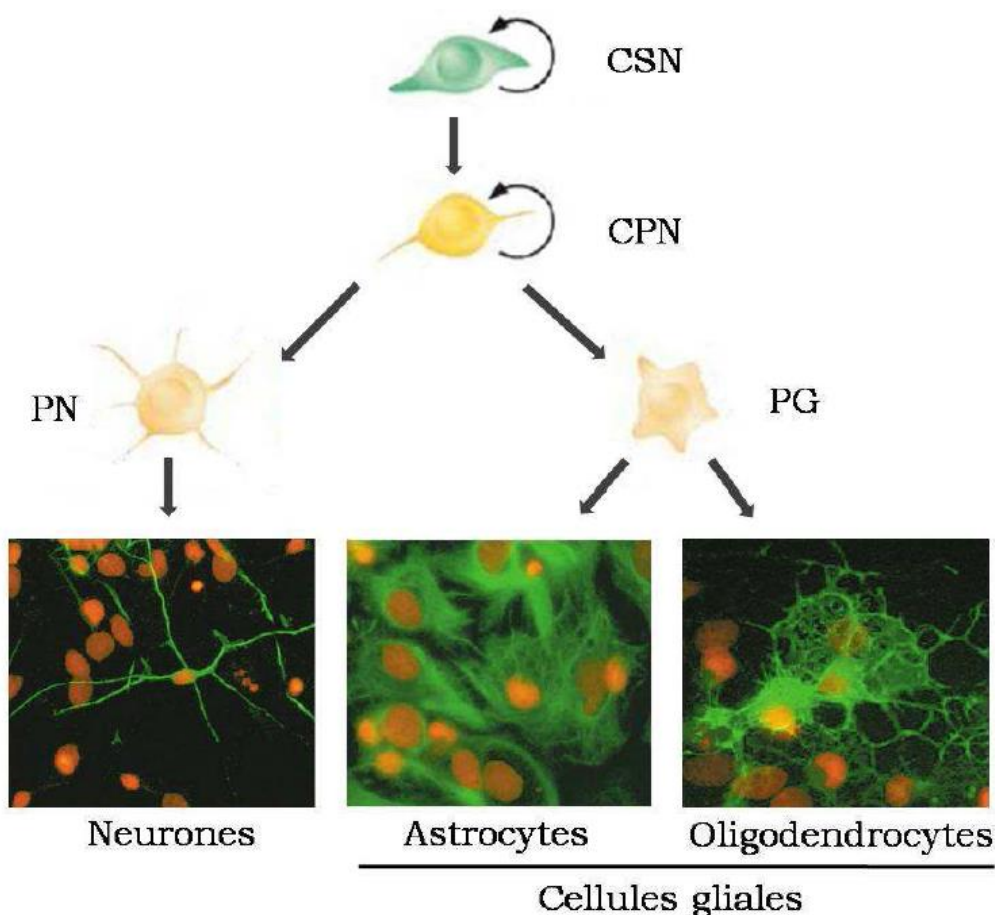


Figure 28 : Caractéristiques des cellules souches neurales. Adapté de (Gage, 2000). Une cellule souche neurale est une cellule multipotente capable d'auto-renouvellement. Elle se divise pour donner naissance à une cellule progénitrice neuronale (CPN) à potentiel plus restreint. Celle-ci s'engage dans une voie de différenciation et, par l'intermédiaire de précurseurs neuronaux (PN) ou gliaux (PG), génère les cellules gliales et les neurones.

III-3.1.2. Distinction entre cellules souches et cellules progénitrices

Bien souvent, le terme « cellules souches » est utilisé pour des cellules au potentiel d'auto-renouvellement limité et de différenciation plus réduit que sont les cellules progénitrices (Potten and Loeffler, 1990; Seaberg and van der Kooy, 2003). Ainsi les cellules souches donnent naissance à des progéniteurs neuronaux qui eux-mêmes génèrent des précurseurs qui, totalement engagés dans une voie de différenciation, sont incapables d'auto-renouvellement (McKay, 1997). Comme il est difficile de distinguer ces deux types cellulaires, nous utiliserons le terme de cellules souches/progénitrices neurales (CSPN).

III-3.2. Localisation des CSPN

III-3.2.1. Chez l'embryon

Au cours du développement embryonnaire, les premières cellules souches appelées cellules souches neuroépithéliales sont localisées dans la zone ventriculaire du tube neural (Kalyani et al., 1997). **Figure 29.**

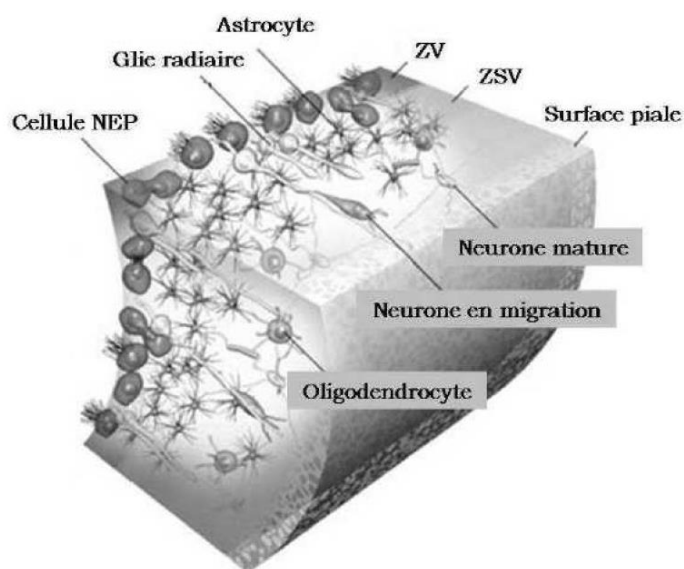


Figure 29 : Neurogénèse chez l'embryon. Adapté de (Clarke, 2003).

Les cellules souches neuroépithéliales (NEP) localisées dans la zone ventriculaire (ZV) du tube neural vont se diviser et générer la glie radiaire et les neuroblastes. Les neuroblastes vont peu à peu se différencier en neurones et la glie radiaire va aider à la migration des neurones postmitotiques de la ZV vers les différentes couches du néocortex. Les cellules

neuroépithéliales vont ensuite générer des glioblastes qui migreront dans la ZSV. C'est dans cette zone qu'ils proliféreront avant de se différencier en astrocytes et oligodendrocytes et de coloniser le parenchyme cortical.

III-3.2.2. Chez l'adulte

Les CSPN sont présentes dans plusieurs régions du cerveau adulte où la neurogénèse est très active comme la zone sous-granulaire du gyrus denté et la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux. **Figure 30 :**

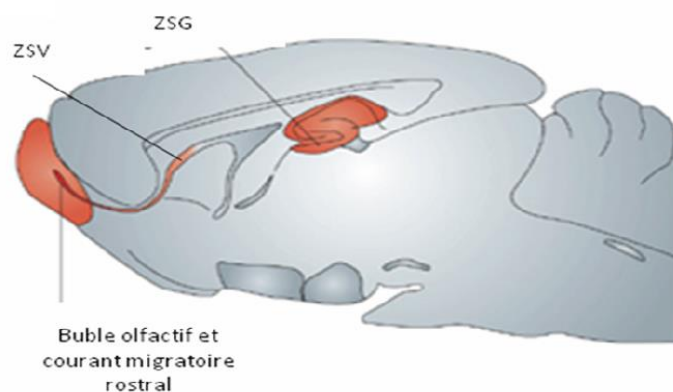


Figure 30 : Les différentes zones de neurogénèse dans le cerveau adulte. Adapté de (Gould, 2007).

- La zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe : les neuroblastes issus de cette zone migrent dans la couche granulaire (Bayer et al., 1982; Cameron and McKay, 2001; Carlén et al., 2002; Eriksson et al., 1998; Kuhn et al., 1996).
- la zone sous-ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux (Gould et al., 1999; Lois and Alvarez-Buylla, 1993) : les neuroblastes issus de cette zone vont migrer via le courant migratoire rostral vers le bulbe olfactif (Carlén et al., 2002; Doetsch et al., 1999; Kornack and Rakic, 2001; Lois and Alvarez-Buylla, 1994).

L'idée que d'autres régions du cerveau soit le théâtre d'une neurogénèse est encore controversée (Gould, 2007).

III-3.3. Culture et différenciation des CSPN

III-3.3.1. Culture des CSPN

Les CSPN initialement isolées du cerveau de souris embryonnaire ou adulte (Reynolds and Weiss, 1992; Reynolds et al., 1992) ont par la suite été isolées chez différents mammifères dont l'Homme (Kukekov et al., 1999; Palmer et al., 2001; Vescovi et al., 1999). La mise en évidence de marqueurs des CSPN CD133 chez l'homme ou Prominin1, son homologue murin, (Corti et al., 2007; Lee et al., 2005a) ou la nestine chez l'homme et les rongeurs (Lendahl et al., 1990) ont grandement favorisé le travail sur les CSPN.

In vitro, les CSPN peuvent être expansées pendant plusieurs passages tout en gardant leur multipotence. Pour ce faire, il suffit de les placer dans un milieu défini de type N2 et/ou B27 et d'ajouter des mitogènes comme le bFGF (Bouvier and Mytilineou, 1995; Gritti et al., 1996), l'EGF (Reynolds and Weiss, 1992; Reynolds et al., 1992) ou les deux (Gritti et al., 1999). Les CSPN peuvent être mises à proliférer en suspension sous forme de clusters sphériques appelés neurosphères ou en une monocouche cellulaire adhérente. Les neurosphères correspondent à une population hétérogène composée que de 10 à 20% de cellules souches neurales proprement dites, le reste des cellules étant déjà engagées dans une voie de différenciation (Reynolds and Weiss, 1996). **Figure 31.** Les neurosphères sont ainsi constituées de cellules souches neurales, cellules progénitrices, et précurseurs neuronaux et gliaux (Galli et al., 2003). Les neurosphères peuvent être expansées sur une dizaine de passages sans altération du potentiel de prolifération et de différenciation des cellules (Reynolds and Weiss, 1996).

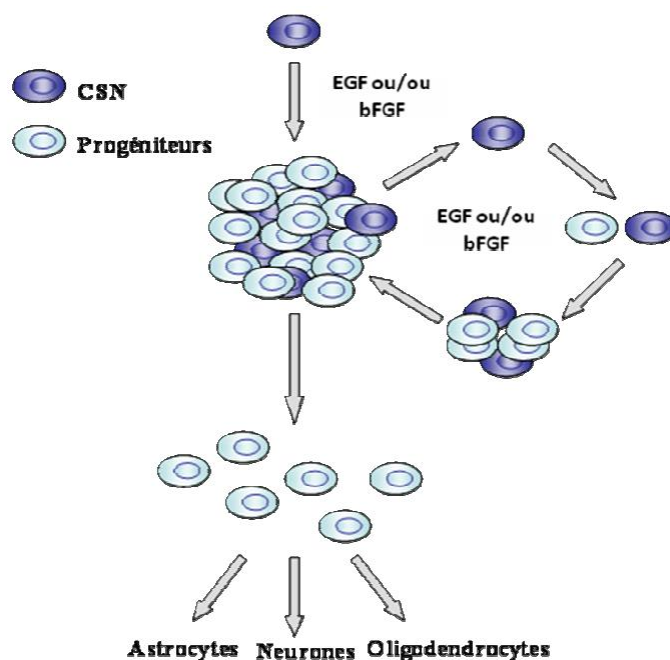


Figure 31 : Prolifération des CSPN *in vitro*. Adapté de (Reynolds and Weiss, 1996). En présence d'EGF et/ou de bFGF, les CSPN prolifèrent en suspension sous forme de neurosphères. Les neurosphères sont constituées de CSPN et de cellules progénitrices pouvant se différencier en astrocytes, neurones ou oligodendrocytes.

III-3.3.2. Différenciation des CSPN

La simple omission des mitogènes suffit à induire la différenciation des CSPN. Les CSPN peuvent à priori générer des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes (Johansson et al., 1999; Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Reynolds and Weiss, 1996; Vescovi et al., 1999), mais dans les conditions les plus couramment utilisées *in vitro*, elles génèrent préférentiellement des astrocytes ou des neurones plutôt de phénotype GABAergique (Jain et al., 2003; Reynolds and Weiss, 1992). Une plus grande orientation vers une différenciation neuronale a été tentée à l'aide de différentes techniques comme des manipulations génétiques à l'aide de facteurs de transcription ou des traitements avec des facteurs trophiques tels que le GDNF (Roussa and Kriegstein, 2004), le PDGF (Caldwell et al., 2001; Williams et al., 1997), les neurotrophines NT3/4 (Caldwell et al., 2001). Pour cibler la différenciation neuronale vers un phénotype dopaminergique, des CSPN ont été transduites avec des facteurs de transcription du développement dopaminergique comme Nurr1 (Andersson et al., 2007; Kim et al., 2003; Shim et al., 2007), Ngn2 (Andersson et al., 2007), ou Wnt5a (Parish et al., 2008). Les autres tentatives étaient basées sur des conditions de culture faible en oxygène (Brito et al., 2012) ou des traitements par le SHH, le FGF-8, l'IL-1, l'IL-11, LIF, le GDNF (Ling et al., 1998) ou l'acide ascorbique, un agent antioxydant (Yan et al., 2001).

III-3.4. Intérêts thérapeutiques des CSPN

Leurs propriétés d'auto-renouvellement, de prolifération et de multipotence font des CSPN une source cellulaire très intéressante pour la transplantation intracérébrale.

La neurogénèse observée dans le cerveau de mammifère pourrait même laisser entrevoir la possibilité de transplanter en autologue des CSPN isolées d'un cerveau adulte. Cette approche a été tentée avec des CSPN isolées de la ZSV de rats qui après expansion *in vitro* ont été autotransplantées dans l'hippocampe. Outre la bonne survie et la bonne intégration, il a été noté une très faible réaction astrogliale et microgliale comparée à une allotransplantation (Muraoka et al., 2006). Une étude a été réalisée chez l'Homme pour la MP. Les CSPN ont été isolées à partir d'une biopsie du cortex frontal et de la région sous-corticale d'un patient parkinsonien. Les cellules ont été cultivées plusieurs mois en présence d'EGF et bFGF puis placées dans un milieu de différenciation comprenant de l'acide rétinoïque, du FGF8, de l'AMPc et du GDNF. Les cultures différenciées étaient composées de neurones (35% dont 15% de neurones dopaminergiques), d'astrocytes (49%) et d'oligodendrocytes (5%). Les cellules ainsi traitées ont été réimplantées en unilatéral dans le striatum de ce même patient. Une amélioration des scores moteurs et de la production de dopamine visualisée par TEP a été observée durant 3 ans avant que les symptômes ne régressent (Levesque et al., 2009). Ces résultats sont encourageants, même si l'application de cette approche en clinique requiert une optimisation de la procédure pour assurer une restauration motrice à long terme. En plus de ces résultats, diverses observations soulignent des propriétés bien particulières des CSPN qui renforcent leur intérêt thérapeutique.

III-3.4.1. Le remplacement cellulaire

Plusieurs essais de thérapie cellulaire ont été mis en œuvre dans le but de découvrir le devenir des CSPN après transplantation dans le SNC. Durant ces essais, les CSPN ont démontré leur capacité à survivre, à se différencier en neurones (Gage et al., 1995) et à former des synapses fonctionnelles après leur transplantation dans le cerveau de rat (Auerbach et al., 2000). Au vu de ces résultats, plusieurs études se sont intéressées à leur potentiel restaurateur dans des modèles animaux de pathologies cérébrales. Des CSPN issues de cerveaux adultes de rat ou de souris ont tout à fait la capacité de survivre et de s'intégrer dans le cerveau de rats hemi-parkinsoniens mais une très faible proportion de cellules se différencient en neurones dopaminergiques (Dziewczapolski et al., 2003). Une récupération fonctionnelle a toutefois été

observée avec ces mêmes cellules par Meissner et al., (Meissner et al., 2005). De meilleurs résultats ont été observés avec des CSPN dérivées de cerveaux embryonnaires. Ainsi, des CSPN isolées de mésencéphale ventral d'embryons de rats et expansées dans un milieu supplémenté en bFGF se différencient en neurones dopaminergiques et vont permettre une récupération motrice chez des rats modèles de la MP (Studer et al., 1998). Des résultats équivalents ont été obtenus avec des CSPN issues de tissus fœtaux humains (Svendsen et al., 1997a). Une étude préclinique basée sur la transplantation de CSPN humaines dans le cerveau de primates lésés par le MPTP ont conforté toutes ces observations (Redmond et al., 2007), mais d'autres études n'ont pas abouti à des résultats aussi enthousiasmants. Par exemple, une faible différenciation dopaminergique a été constatée après l'implantation de CSPN humaines (Liker et al., 2003) ou porcines (Armstrong et al., 2002, 2003) dans le cerveau de rongeurs modèles de la MP.

Une meilleure différenciation et récupération motrice ont semble t'il été obtenues après traitement ou manipulation génétique par des facteurs de différenciation dopaminergique (Jensen et al., 2008; Parish et al., 2008). La reprogrammation de CSPN par OCT4 à un stade pluripotent puis l'action d'un milieu de différenciation spécifique auraient aussi permis à un grand nombre de CSPN de se différencier en neurones dopaminergiques, permettant à des rats parkinsoniens, de retrouver une fonction motrice normale (Deleidi et al., 2011). A ce propos, une meilleure différenciation pourrait être obtenue en optimisant, les conditions de culture puisque l'âge du donneur et la durée de la culture influence le devenir neuronal (Timmer et al., 2006).

III-3.4.2. Propriétés trophiques des CSPN

Un faible nombre de CSPN se différencient spontanément en neurones dopaminergiques, mais ces cellules ont pour autre avantage d'importantes propriétés neurotrophiques. En effet, des CSPN issues de fœtus porcins et transplantées dans le striatum d'un rat non lésé stimulent fortement l'extension des fibres dopaminergiques en provenance de la substance noire (Michel-Monigadon et al., 2011). Cet effet neurotrophique est très important car en cas de lésion ou neurodégénérescence, la libération de facteurs neurotrophiques permet de prévenir la mort des neurones et de stimuler l'innervation avec leur cible. Il est connu par exemple que la libération de BDNF, NGF, GDNF par les CSPN après lésion de la moelle épinière permet une neurorégénération (Lu et al., 2003). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que les CSPN transplantées avant l'administration d'une

neurotoxine induisant une maladie de Huntington, préviennent la mort des neurones striataux et limitent les déficits moteurs (Ryu et al., 2004). Cet effet serait en partie contrôlé par du BDNF. En plus de leur potentiel pour remplacer les neurones perdus, la transplantation de CSPN permettrait de constituer un environnement trophique et neuroprotecteur pour les neurones dopaminergiques de l'hôte (Ourednik et al., 2002; Redmond et al., 2007; Yasuhara et al., 2006).

III-3.4.3. Propriétés migratoires des CSPN

Dans des modèles de lésion cérébrale, les CSPN sont généralement implantées au sein même du cerveau. Une autre alternative est l'injection systémique qui limiterait le traumatisme d'une opération, surtout dans le cas de pathologies multifocales. Des CSPN humaines ont ainsi été administrées en intraveineuse dans le cerveau de rats présentant une ischémie cérébrale (AVC) (Chu et al., 2003, 2004a, 2004b; Jeong et al., 2003) ou une lésion de type Huntington (Lee et al., 2005b; McBride et al., 2004). Les analyses ont montré que les cellules migraient jusqu'au site de lésion avant de s'intégrer et de se différencier en neurones ou en astrocytes au site de lésion. Une amélioration fonctionnelle a même été rapportée. Dans des maladies inflammatoires chroniques aux localisations multifocales comme la sclérose en plaque, l'injection intraveineuse permet aussi de cibler les différents sites enflammés (Einstein et al., 2007; Ben-Hur et al., 2003a; Pluchino et al., 2003, 2005, 2009a).

III-3.4.4. Propriétés immunomodulatrices des CSPN

En conditions physiologiques, les CSPN de rongeurs et humaines expriment faiblement les molécules du CMH (Hori et al., 2003; Laguna Goya et al., 2011; McLaren et al., 2001; Yin et al., 2008), mais en présence de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF), il a été observé une induction de ces molécules immunogènes à leur surface (Hori et al., 2003; Imitola et al., 2004; Johansson et al., 2008; Laguna Goya et al., 2011; McLaren et al., 2001; Odeberg et al., 2005; Yin et al., 2008). Il y a donc un risque pour que les CSPN humaines soient reconnues par les lymphocytes et qu'elles induisent une réaction immunitaire en conditions allogéniques ou xénogéniques (Laguna Goya et al., 2011; Ubiali et al., 2007). Une infiltration lymphocytaire a d'ailleurs été observée suite à la transplantation allogénique de CSPN dans un cerveau de rat ayant subi une lésion cérébrale traumatique (Zheng et al., 2007).

Des expériences de transplantation en conditions xénogéniques ont tout de même révélé des propriétés immunes particulières. En effet, des CSPN d'origine porcine transplantées dans un hôte xénogénique survivent très longtemps comparées à des neuroblastes porcins (Harrower et al., 2006; Michel-Monigadon et al., 2011). Une faible réaction de rejet a aussi été constatée dans des modèles de MP (Armstrong et al., 2001) ou d'attaque cérébrale (Modo et al., 2002). Un autre point important est que l'injection de CSPN en intrapéritonéale chez un rat n'engendre pas de réponse humorale contrairement à une injection de tissu neural primaire porcine (Armstrong et al., 2001). Enfin, une survie et une récupération fonctionnelle similaires ont été observées après transplantation de CSPN dans le cerveau de rat parkinsonien traité ou non avec de la cyclosporine A (Schwarz et al., 2006). Ce résultat indique une faible réponse cellulaire T.

Un impact des CSPN sur la réponse immune a été montré dans des modèles de maladies inflammatoires chroniques comme la sclérose en plaque. En effet, l'injection intraventriculaire (Einstein et al., 2003, 2006; Giannakopoulou et al., 2011a; Pluchino et al., 2009a) ou intraveineuse (Einstein et al., 2007; Pluchino et al., 2003, 2005, 2009a) de CSPN réduit significativement l'inflammation dans le SNC, diminue la lésion tissulaire et restreint le nombre de lymphocytes T infiltrant le SNC. Il en résulte des symptômes cliniques beaucoup moins sévères. Cet effet immunosuppresseur dépendrait directement de la capacité des CSPN à migrer jusqu'au site inflammé, dans les niches périvasculaires (Einstein et al., 2003, 2006; Ben-Hur et al., 2004; Pluchino et al., 2003, 2005, 2009a) ou même dans les ganglions lymphatiques (Einstein et al., 2007; Pluchino et al., 2009a). Les CSPN exprimeraient des molécules d'adhésion, des intégrines et récepteurs aux chimiokines qui vont les attirer jusqu'au site de l'inflammation. Elles pénétreraient dans le parenchyme cérébral par un phénomène d'extravasation (Pluchino et al., 2005, 2009a) avant de se différencier (Ben-Hur et al., 2003a). Plusieurs molécules pro-inflammatoires telles que le TNF et l'IFN influenceraient la migration des CSPN et inhiberaient leur prolifération afin que les cellules se différencient dans le phénotype désiré (Giannakopoulou et al., 2011b; Ben-Hur et al., 2003b). La modulation de la réponse immune est ainsi retrouvée localement au niveau de la lésion mais aussi en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires. Effectivement, une modulation de la réponse T locale et microgliale a été retrouvée dans des modèles de lésion de moelle épinière après avoir transplanté des CSPN adultes dans le fluide cérébrospinal (Ziv et al., 2006). Quant aux travaux de Lee et al. sur un modèle d'AVC, ils suggèrent que l'injection intraveineuse de CSPN aurait pour effet de limiter la circulation des cellules immunes en interagissant avec l'inflammation splénique (Lee et al., 2008).

L'effet immunomodulateur des CSPN détecté *in vivo* a été confirmé *in vitro*. Ainsi, les CSPN humaines (Akesson et al., 2009; Pluchino et al., 2009a), de rongeur (Fainstein et al., 2008; Wang et al., 2009) et de porc (Michel-Monigadon et al., 2011) sont tout à fait capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T induite par des alloantigènes. Cet effet est dose-dépendant et ne dépend pas nécessairement d'un contact cellulaire (Michel-Monigadon et al., 2011). Il a également été montré que les CSPN diminuaient l'activation des cellules dendritiques myéloïdes. En inhibant leur différenciation en cellules immatures puis en CD fonctionnelles, elles ont pour effet de diminuer le nombre de cellules présentatrices d'antigènes (Pluchino et al., 2009a, 2009b). Les mécanismes par lesquels les CSPN exercent leurs propriétés immunomodulatrices sont cependant encore peu clairs. Les expériences effectuées sur la lignée de souris C17.2 suggèrent un rôle des prostaglandines et de NOS (Wang et al., 2009), mais l'implication de ces molécules dans l'activité immunosuppressive des CSPN n'a pas pu être confirmée dans des cultures de CSPN isolées à partir de tissus fœtal porcin (Michel-Monigadon et al., 2011).

De par leur capacité trophique et immunomodulatrice, les CSPN présentent donc un réel intérêt pour la transplantation intracérébrale. Il apparaît cependant nécessaire d'améliorer les connaissances sur les mécanismes immunosuppresseurs, afin d'éventuellement les optimiser.

III-4. Les cellules iPS

III-4.1. Propriétés

La découverte des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) par l'équipe de Yamanaka remonte à 2006. Cette découverte lui a valu le prix Nobel de médecine en 2012. Des cellules somatiques que sont les fibroblastes de peau de souris ont été reprogrammées par un cocktail de 4 gènes : Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Cette modification génétique a conduit à l'obtention de cellules pluripotentes aux caractéristiques similaires à celles des CSE (Takahashi and Yamanaka, 2006). **Figure 32.** Ces cellules peuvent générer les cellules des trois lignées germinales *in vitro* et former des tératomes *in vivo*. Elles possèdent une forte capacité d'auto-renouvellement, une activité télomérasique et expriment les marqueurs de la pluripotence.

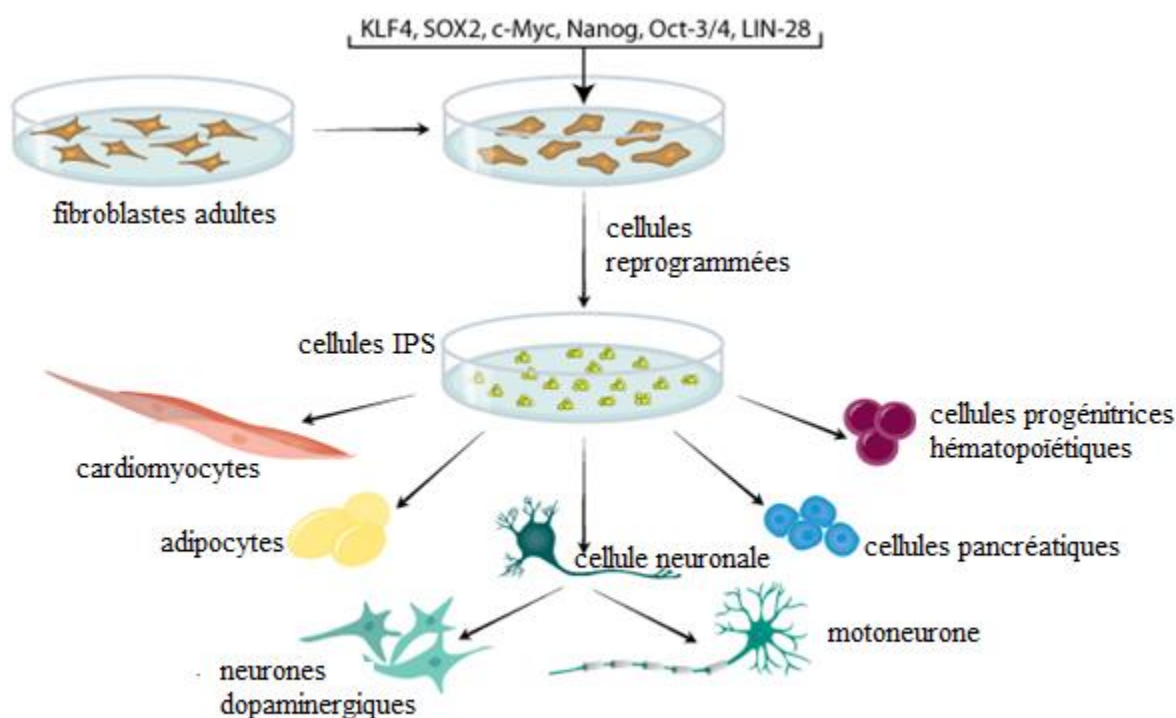


Figure 32 : Reprogrammation de fibroblastes adultes en cellules iPS. Des cellules somatiques, comme par exemple des fibroblastes adultes, peuvent être reprogrammées par un cocktail de différents gènes du développement pour générer des cellules pluripotentes, appelées iPS qui peuvent se différencier en cellules des 3 lignées germinales.

Les iPS possèdent les propriétés des cellules souches embryonnaires tout en restant des cellules adultes. Leur utilisation permet de s'affranchir des problèmes éthiques et légaux posés par l'utilisation d'embryons. Par la suite, en 2007, deux équipes dont celle de Yamanaka et l'équipe américaine de Thompson ont réussi à produire des iPS à partir de fibroblastes humains par le même cocktail de gènes (Takahashi et al., 2007) ou par une autre combinaison : oct3/4, sox2, Nanog et Lin28 (Yu et al., 2007). Les premières reprogrammations ont été réalisées à l'aide de rétrovirus capables de s'intégrer au génome, avec le risque de provoquer des mutations et transformations malignes. Pour éliminer ce risque ont été employés d'autres systèmes d'intégration basés sur l'utilisation d'adénovirus non intégratifs (Fink et al., 2013; Stadtfeld et al., 2008; Zhou and Freed, 2009), de vecteurs non viraux comme des vecteurs épisomaux non intégratifs (Yu et al., 2009) ou des plasmides (Okita et al., 2008) ou par délivrance directe des protéines de reprogrammation (Kim et al., 2009a; Rhee et al., 2011). Pour limiter l'apparition de tumeurs, l'oncogène c-Myc a été substitué (Nakagawa et al., 2008). Les iPS peuvent maintenant être obtenues de la reprogrammation de précurseurs neuraux/CSPN de rat (Chang et al., 2010), de souris (Eminli

et al., 2008; Kim et al., 2008, 2009b, 2009c; Tat et al., 2010) ou humaines (Hester et al., 2009; Kim et al., 2009d). Les CSPN exprimant déjà des facteurs de reprogrammation, deux (Hester et al., 2009; Kim et al., 2008, 2009b), trois (Eminli et al., 2008), ou même un seul facteur (oct4) (Kim et al., 2009b, 2009c, 2009d) semblent pouvoir suffir.

Les cellules iPS peuvent être dérivées des cellules de patients parkinsoniens (Hargus et al., 2010; Park et al., 2008b; Sánchez-Danés et al., 2012; Soldner et al., 2009), permettant de disposer d'un matériel unique pour étudier les causes du développement de la MP, son étiologie, ou pour tester d'éventuelles molécules thérapeutiques. Il est à noter que ces iPSC peuvent être différenciées en neurones dopaminergiques (Hargus et al., 2010; Sánchez-Danés et al., 2012; Soldner et al., 2009) avec la même capacité que des neurones dopaminergiques de CSE dérivées d'individus sains.

III-4.2. Vers une utilisation en transplantation

L'avantage majeur des cellules IPS pour la transplantation intracérébrale est l'obtention d'une source cellulaire non controversée utilisable en autotransplantation. *In vitro*, les cellules iPSC de souris (Wernig et al., 2008), de rat (Chang et al., 2010) ou humaines (Cai et al., 2010; Rhee et al., 2011; Swistowski et al., 2010) se différencient en cellules souches neurales puis en neurones dopaminergiques. *In vivo*, les précurseurs dopaminergiques dérivés d'iPSC s'intègrent, relarguent de la dopamine, et permettent une récupération fonctionnelle chez des rats utilisés comme modèle de la MP (Cai et al., 2010; Rhee et al., 2011; Swistowski et al., 2010; Wernig et al., 2008). La transplantation de neurones dopaminergiques dérivés d'iPSC établies à partir de cellules de patients parkinsoniens entraîne elle-aussi une récupération motrice chez des rats parkinsoniens (Hargus et al., 2010). Des résultats bénéfiques ont également été obtenus dans d'autres modèles de lésions neurologiques comme par exemple des lésions de moelle épinière (Fujimoto et al., 2012; Nori et al., 2011; Tsuji et al., 2010) ou d'AVC (Gomi et al., 2012; Jensen et al., 2011; Mohamad et al., 2013; Oki et al., 2012; Yuan et al., 2013). Il est à noter que lors de ces greffes, un grand nombre de ces cellules reste indifférencié. De plus, les manipulations génétiques augmentent le risque de développer des tumeurs (Cai et al., 2010). La formation de tératomes peut être diminuée par l'utilisation de molécules comme le DHA (acide docosahexaénoïque), un acide gras présent dans le cerveau qui accentue la différenciation dopaminergique (Chang et al., 2012). L'induction de neurones fonctionnels (Pfisterer et al., 2011a; Vierbuchen et al., 2010), dont des neurones dopaminergiques (Caiazzo et al., 2011; Pfisterer et al., 2011b), peut aussi être obtenue

directement de fibroblastes de souris ou humains par l'expression de facteurs de transcription spécifique du lignage neuronal. Les cellules ne passant pas par un stade pluripotent, le risque de tératome en est éliminé.

Bien que les iPSC semblent intéressantes pour limiter l'utilisation d'immunosuppresseurs, leur réelle immunogénicité est un sujet controversé. En effet, des iPSC transplantées dans la peau de souris syngénique, sont rejetées alors que dans les mêmes conditions, des CSE sont tolérées (Zhao et al., 2011). Une déplétion des contaminants pluripotents avant la greffe serait une solution pour prolonger la survie des iPSC différenciées (Dressel et al., 2010).

Les cellules iPS et leurs dérivés neuronaux offrent un réel espoir pour la transplantation intracérébrale. Effectivement, des études précliniques de transplantation de progéniteurs neuronaux dérivés d'iPSC montrent une intégration, une différenciation et une fonctionnalité dans des modèles PNH de la MP (Emborg et al., 2013; Kikuchi et al., 2011) et de lésions de la moelle épinière (Kobayashi et al., 2012), sans noter l'apparition de tumeur. Cependant, un long travail est encore nécessaire pour optimiser leur utilisation en éradiquant la possibilité de développement de tumeurs, en décryptant les mécanismes de différenciation et en contrôlant leur immunogénicité.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les stratégies thérapeutiques pour traiter les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson sont au centre des préoccupations scientifiques actuelles, avec notamment la transplantation de cellules neurales qui permet d'envisager une restauration des réseaux neuronaux. L'utilisation de cellules issues de fœtus humains posant d'importants problèmes d'éthique et de logistique, d'autres sources cellulaires sont à l'étude comme notamment les cellules neurales d'origine animale. De par leurs caractéristiques physiologiques, leur disponibilité, leur possible manipulation par génie génétique, les cellules neurales porcines ont été les plus étudiées. Des effets bénéfiques ont été observés dans des modèles animaux (Galpern et al., 1996; Huffaker et al., 1989), mais les risques de rejet déjà présents en cas d'allogreffe (Krystkowiak et al., 2007) sont encore plus importants lors de xénotransplantation. Les traitements immunosuppresseurs, tels qu'ils sont actuellement administrés, prolongent la survie des xéngreffes intracérébrales mais ils sont insuffisants pour en assurer la survie à long terme et les fortes doses utilisées ont des effets secondaires importants. Dans ce contexte, les cellules souches constituent un réel espoir pour la médecine régénératrice. En effet, même si la différenciation des cellules souches multipotentes en neurones dopaminergiques n'est pas encore maîtrisée (Politis and Lindvall, 2012), certaines de ces cellules ont des propriétés immunomodulatrices (Bifari et al., 2010) très intéressantes qui pourraient être utilisées pour induire une immunosuppression locale.

Dans cette perspective, nous avons co-greffé des cellules souches mésenchymateuses (CSM) de rats et des cellules mésencéphaliques porcines dans le striatum de rats immunocompétents. La fonctionnalité de ces co-greffes a ensuite été testée dans des modèles rats de la maladie de Parkinson (MP) Cette première étude fait actuellement l'objet d'un article en cours de soumission (**Article 1**).

Dans une seconde étude, nous avons porté notre intérêt sur une autre source cellulaire que sont les cellules souches/progénitrices neurales (CSPN). En effet, quelques études dont celle de notre équipe avaient récemment montré que la longue survie de ces cellules dans le cerveau d'un hôte xénogénique pouvait être due en partie à leurs effets immunosuppresseurs sur les cellules T. Nous avons donc entrepris d'étudier leurs mécanismes d'action en utilisant un système de co-culture allogénique CSPN de rat /cellules T de rat *in vitro* (**Article2**). Puis

nous avons travaillé sur les CSPN dérivées d'iPSC humaines. Nous avons notamment recherché si ces cellules qui permettraient de s'affranchir des problèmes éthiques liés à l'utilisation d'embryons humains avaient elles-aussi des propriétés immunosuppressives. Pour cette étude, nous avons étudié leur impact sur les PBMC de sang humain dans un contexte allogénique (**Résultats complémentaires**).

Le dernier point étudié durant ma thèse concerne l'impact de la réponse humorale dans le rejet d'une xénogreffe intracérébrale. En effet, très peu de choses étaient connues quant à la cinétique et l'implication des anticorps dans le processus de rejet. Pour cette étude, nous avons utilisé le modèle classique d'une greffe de cellules mésencéphaliques neurales porcines dans le striatum de rats immunocompétents (**Article 3**).

RESULTATS

ARTICLE 1

Advantages of mesenchymal stem cells for the long term survival of intracerebral xenotransplant

Xavier Lévêque*, **Elodie Mathieux***, Véronique Nerrière-Daguin, Reynald Thinard, Laetitia Kermarrec, Tony Durand, Thomas Haudebourg, Bernard Vanhove, Laurent Lescaudron, Isabelle Neveu* and Philippe Naveilhan*

* Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

Article soumis.

Introduction

Le SNC fut longtemps considéré comme un site immunologiquement privilégié de par la présence de la BHE, l'absence de vaisseaux lymphatiques, la faible expression des molécules du CMH-I et l'absence de cellules présentatrices d'antigènes conventionnelles comme les cellules dendritiques. Ce dogme fut récemment remis en cause par la démonstration d'un drainage lymphatique, d'une présentation d'antigènes par les cellules microgliales/macrophages et d'une infiltration leucocytaire dans le SNC lors d'une inflammation (Barker and Widner, 2004). Aussi, le développement de l'allogreffe (Krystkowiak et al., 2007) et à fortiori de la xénotransplantation neuronale (Larsson and Widner, 2000; Larsson et al., 2001a; Michel et al., 2006; Rémy et al., 2001) requiert un très bon contrôle de la réponse immunitaire. En effet, même si les neurones isolés du mésencéphale ventral de fœtus de porc se différencient, s'intègrent et émettent des axones sur de longues distances après transplantation dans le cerveau d'un hôte xénogénique (Deacon et al., 1994; Isacson et al., 1995), la greffe est finalement rejetée. Des travaux expérimentaux chez des rats immunocompétents ont clairement mis en évidence une réponse cellulaire avec notamment une infiltration du greffon par les cellules dendritiques, des cellules microgliales activées et des cellules T (Michel et al., 2006; Rémy et al., 2001). Cette réponse qui est normalement observée à 5-7 semaines est retardée de façon transitoire par l'administration de cyclosporine A (Brundin et al., 1989; Larsson et al., 2001a), de minocycline (Michel-Monigadon et al., 2010) ou de méthylprednisolone (Duan et al., 1996). Une alternative serait de compléter une immunosuppression systémique par une immunosuppression locale. Dans cette perspective, certaines cellules souches multipotentes comme les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui ont des propriétés immunomodulatrices sont des candidates de choix.

Les CSM se différencient très difficilement en neurones (Uccelli et al., 2008) mais ces cellules sont facilement isolables à partir de la moelle osseuse de la crête iliaque d'un patient, sont multipliables *in vitro* et peuvent être réimplantées sans problème dans le cerveau chez ce même patient. Les CSM pourraient donc être utilisées pour induire une immunosuppression locale dans le cerveau. Différentes observations encouragent une telle possibilité. Les CSM survivent longtemps dans le cerveau d'un hôte xénogénique sans observation de réponses immunes (Rossignol et al., 2009). *In vitro*, les CSM inhibent la prolifération des cellules T

(Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002) et des cellules B (Corcione et al., 2006), ainsi que la différenciation et les fonctions des cellules dendritiques (Jiang et al., 2005; Nauta et al., 2006; Zhang et al., 2004). *In vivo*, les CSM inhibent l'infiltration des cellules immunes et limitent la perte axonale dans des modèles EAE de sclérose en plaques (Gerdoni et al., 2007; Kassis et al., 2008; Zappia et al., 2005).

Nous avons entrepris d'utiliser ces propriétés immunomodulatrices pour augmenter la survie de neuroblastes porcins dans le striatum de rats. Pour cela, des CSM isolées de fémurs et tibias de rats Lewis 1A, amplifiées *in vitro*, furent co-transplantées en unilatéral droit dans le striatum de rats Lewis 1A avec des cellules issues du mésencéphale ventral de fœtus de porc G28 (pNB). **Figure 33.**

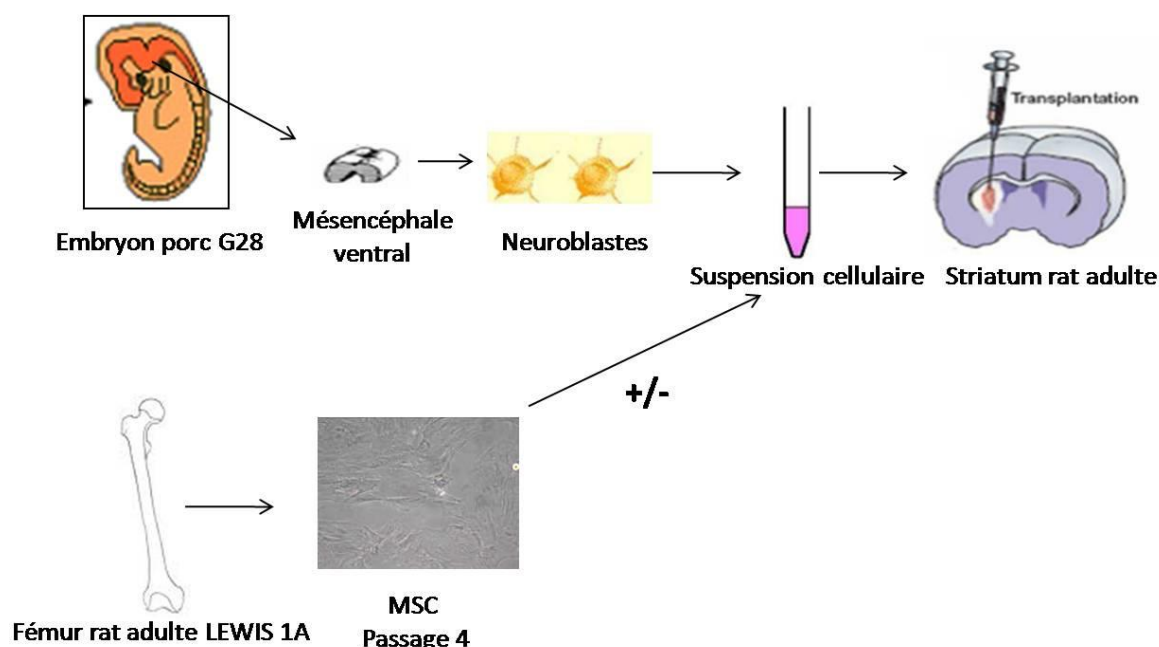


Figure 33 : Schéma expérimental d'une co-transplantation de neuroblastes porcins (300 000) avec des CSM (100 000) de rat dans le striatum de rat.

Les cerveaux des rats furent analysés à 28, 35, 42, 63 et 120 jours post transplantation. Les analyses immunohistologiques avaient pour but de contrôler la survie des cellules greffées et l'infiltration du greffon par des cellules immunes : OX42 (cellules microgliales/macrophages), R73 (cellules T), pNF70 (neurofilaments porcins) et TH (neurones dopaminergiques). Les analyses par PCR quantitatives avaient pour but de quantifier les ARNm de molécules immunes, de cytokines pro et anti-inflammatoires, de chimiokines mais aussi d'enzymes cytoprotectrices.

La fonctionnalité de ces co-transplants a été testée en greffant ces cellules dans un modèle de rat lésé par la 6-OHDA. La 6-OHDA injectée dans le faisceau médian du télencéphale par son action neurotoxique entraîne une perte sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire (Blum et al., 2001). Les rats sont sélectionnés par un test de rotation à l'apomorphine. Dans ce test, les rats qui présentent une perte de plus de 90% des neurones dopaminergiques de la substance noire effectuent plus de 100 rotations contralatérales en 40min. Les greffes sont réalisées un mois après la lésion. La récupération motrice des rats est évaluée par le test du cylindre. Dans ce test, on compte le nombre de touches que le rat, placé dans un cylindre, effectue avec les pattes droites ou gauches antérieures sur les bords du cylindre (Kirik et al., 2000). Un rat lésé en unilatéral droit ne se servant plus de sa patte gauche, le résultat est exprimé en pourcentage du nombre de touches gauches sur le nombre totales de touches. Le test est réalisé tous les 15 jours.

ARTICLE**ADVANTAGES OF MESENCHYMAL STEM CELLS FOR THE LONG TERM
SURVIVAL OF INTRACEREBRAL XENOTRANSPLANT****Running title: Advantages of MSC for intracerebral xenotransplant**

Xavier Lévêque^{1-3*}, Elodie Mathieux^{1-3*}, Véronique Nerrière-Daguin¹⁻³, Reynald Thinard¹⁻³, Laetitia Kermarrec⁵, Tony Durand⁵, Thomas Haudebourg¹⁻³, Bernard Vanhove¹⁻³, Laurent Lescaudron¹⁻⁴, Isabelle Neveu^{1-3, 5,*} and Philippe Naveilhan^{1-3,5,*}

* Equal contribution

Affiliation

1, INSERM, UMR 1064, Nantes, F44000 France

2, CHU de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France

3, LUNAM Université, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

4, INSERM, UMR 791, Nantes, F44000 France

5, INSERM, UMR 913, Nantes, F44000 France

Corresponding author: Naveilhan P., INSERM UMR 913, 1 place Alexis Ricordeau 01, France. 44 035 Nantes cedex

Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr

Phone : +33 (0) 240 412 886

Fax : +33 (0) 240 411 110

Key words: immunosuppression, rejection, mesenchymal stem cells, T cells, transplantation, restorative strategies

The work was supported by the “Association Française contre les Myopathies” (AFM), by the “Fédération des Groupements de Parkinsoniens” : CECAP, Centaure and Progreffe foundations.

Abstract

Cell transplantation is a promising strategy for the treatment of neurodegenerative diseases. Interesting results have been obtained following the transplantation of human fetal neuroblasts into the striatum of Parkinsonian's patients. However, tissue availability and ethical concerns limit this therapeutic approach. Fetal pig neuroblasts are interesting candidates as cellular source, but xenotransplantation of neural cells in the brain required the development of adapted immunosuppressive treatments. Since systemic administration of high doses of cyclosporine A has side effects and does not protect forever neural xenotransplants, we focused our work on local control of the host immune responses. We studied the advantage of co-transplanting syngenic mesenchymal stem cells (MSC) with porcine neuroblasts (pNb) in immunocompetent rat striatum. Two groups of animals (n=6 per group) were transplanted either with pNb alone or with both MSC and pNb. At day 63, no porcine neuron was detected in the striatum that received only pNb while 4 out of 6 rats transplanted with both pNb and MSC exhibited healthy porcine neurons. Interestingly, 50% of the rats co-transplanted displayed healthy grafts with pNF70+ and TH+ neurons at 120 days post-transplantation and Q-RT-PCR analyses revealed a general dwindling of pro-and anti-inflammatory cytokines in the striatum that received the co-transplants. Motor recovery was also observed following the transplantation of pNb and MSC in a rat model of Parkinson's disease. Taken together, the present data indicate that the immunosuppressive properties of MSC are of great interest for the long term survival of xenogeneic neurons in the brain.

Introduction

Transplantation is one of the promising approaches for nervous system repair in neurodegenerative disorders. Clinical studies have shown beneficial effects following the transplantation of embryonic ventral mesencephalic tissue into the brain of Parkinson's patients but the absence of effects or the apparition of dyskinesia in some patients has underlined the need for technical improvements. These includes a better control of the host immune response, as alloimmunisation to donor antigens has been observed following the transplantation of fetal neural cells into the brain of patients affected by Huntington's disease¹. Alternative sources of transplantable cells have also to be found as the use of human fetal tissue raise ethical and logistical problems. In this perspective, we have been studying the possibility of using porcine embryonic ventral mesencephalic tissue²⁻⁴. Porcine fetal neurons have been shown to restore behavioral function in animal models of Parkinson's disease^{5, 6} and some clinical trials have already been performed⁷⁻⁹. However, despite the particular immunologic status of the brain, neuronal xenograft become the target of a host immune response characterized by a massive infiltration of dendritic and T cells with a Th1 profile^{2, 3}. Treatment with minocycline¹⁰ or cyclosporine A delays significantly the rejection without inhibiting it. Interestingly, mesenchymal stem cells (MSCs) showed spontaneous long term survival following their transplantation into the brain of a xenogeneic host^{11, 12}. This long term survival is not only due to the low immunogenicity of MSCs but also to their active immunosuppressive activity. Indeed, MSCs can inhibit maturation of dendritic cells and proliferation of T and B cells^{13, 14}. Interestingly, transplantation of MSCs in animal models of stroke or multiple sclerosis revealed that these cells may have beneficial effects through their immune and trophic properties¹⁵. Consequently, we decided to take advantage of these properties to develop a local immunosuppressive strategy in the brain. Our results showed that MSC protect xenogeneic neural cells from cell rejection without affecting their functional properties.

Materials and Methods

Porcine embryos were obtained from domestic Large White pigs, 28 days after insemination (G28) (Institut National de la Recherche Agronomique , INRA, Nouzilly, France). Lewis 1A and Sprague Dawley wild-type rats were purchased from Janvier CERJ (Le Genest saint Isle, France) and Charles River (L'Arbresle, France). Animal manipulations were performed in accordance with the ethical guidelines of the French veterinary service and all procedures were conducted under protocols approved by our Departmental Ethics Committee for animal research. Every effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used.

Culture of rat MSC

MSC were obtained from the bone marrow of adult Lewis 1A rat as previously described (Lescaudron et al., 2012). The ends of femurs and tibias were cut, and bone marrow cells (BMC) were aspirated with a 25-gauge needle. To remove all the BMC, the bone canal was flushed with α MEM medium (Sigma, France) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS; Gibco, France), 100 U/mL penicillin (Sigma) and 100 μ g/mL streptomycin (Sigma). MSC were selected by an overnight incubation of the BMC onto uncoated plastic dishes. Plastic adherent cells were then plated at density of $8 \cdot 10^3$ cells per cm^2 and splitted at 80% of confluency.

Cell transplantation

The transplantation was performed on male Lewis 1A rats of 250g weight. Anaesthesia was performed with an intramuscular injection of 2% Rompun and 50 mg/ml ketamine (1 ml/kg) (PanPharma, Fougères, F). Anesthetized rats were placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). An amount of $4 \cdot 10^5$ pNb, $1 \cdot 10^5$ rat MSC or a mix of $3 \cdot 10^5$ pNb / $1 \cdot 10^5$ rMSC were transplanted unilaterally into the striatum (in mm relative to bregma and surface of the dura mater): anterior : +0,7, lateral : -2,8, ventral : -6 and -5,6, incisor bar : -3,3. Injections were performed using a Hamilton syringe placed on an automated microinjector (Phymed, Paris, F) over a time period of 1 min. After a 4 min delay period, the needle was gently removed, the piece of skull replaced and the skin sutured.

At 28, 35, 42, 63 and 120 days post-transplantation, animals were anesthetized with intramuscular injection of 2% Rompun/50 mg/ml ketamine (1 ml/kg) and transcardially perfused with 150 ml of 0.9% NaCl, followed by 250 ml of cold 4% paraformaldehyde in PBS (4% PFA). Brains were then removed from the skull and cryoprotected in two successive

solutions of 15% (24 h) and 30% sucrose (48 h) in PBS at 4°C. The brains were then frozen in isopentane and stored at -80°C. Sections of 16 µm were prepared using a cryostat (Leica) and stored at -80°C. For the molecular analysis, grafted striata were collected from unperfused animals and directly frozen in azote.

6-Hydroxydopamine lesion

Lesion of nigral dopaminergic neurons was carried out by injecting unilaterally the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the medial forebrain bundle (MFB). Briefly, the rats were anesthetized with intramuscular injection of Rompun/ketamine (1 ml/kg) and placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL). 6-OHDA (3µg/µl) was dissolved in 0.9% saline/0.1% ascorbic acid, and 4 µl was unilaterally injected (0.33µl/min) at the following coordinates (in mm relative to bregma and surface of the dura mater): anterior: -4.4; lateral: -1.2; ventral: -7.8; tooth set bar: -2.3. Two weeks after the lesion, the animals were injected with the DA agonist apomorphine (0.05 mg/kg, s.c.). Only the animals scoring over 100 contralateral rotations during a 45 min-period were selected for cell transplantation as this score correspond to approximatively 90% of dopaminergic loss on the side ipsilateral to the lesion (Fig.7A). Four experimental groups were then constituted 1) non transplanted (n=8), or transplanted 2) with pig neuroblasts (n=8) 3) LEW 1A MSC (n=8) 4) MSC plus pig neuroblasts (n=13). Cell transplantation was performed one month after the 6-OHDA lesion.

Cylinder tests

Functional recovery of 6-OHDA-lesioned rats was followed by analyzing forelimb-use asymmetry every 15 days. Rats were placed into a glass cylinder, and the number of wall contacts executed independently with the left and right forepaw was counted for each rat (cylinder test) (Schallert et al., 2000). Twenty contacts at least were counted for each animal. Left (contralateral) paw use was expressed as percentage of the total number of wall-contacts, knowing that an unlesioned animal achieve a score of 50%.

Total RNA preparation and Q-PCR analyses

To extract total RNA, cells were disrupted in 1mL of TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) and homogenized using syringe and needle for cells or using ULTRA-TURRAX T25 (IKA, Staufen, Allemagne) for tissues according to the manufacturer's specifications.

Potential genomic DNA contamination was removed by treatment with Turbo™ DNase (Ambion Inc., Austin, TX). RNA was quantified using ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer

(Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) and RNA integrity was controlled on agarose gel. cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA, using the Moloney Murine Leukemia Virus reverse-transcriptase kit (Invitrogen) and diluted to a final concentration of 100 ng cDNA/µl.

Analyses of transcripts (Cb, RANTES, MCP-1, IL10, TGFβ1, IL6, IFNγ, CD11b, GFAP NGF, BDNF) were performed with a GenAmp 7700 sequence detection system (AB) using SYBR Green PCR core reagents (AB). Oligonucleotides sequences are merged into Table 2. The PCR method and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantification method, after normalization to HPRT values, have been previously described. The mRNA expression level is defined as the fold change in mRNA levels in a given sample relative to levels in a calibrator (CB). The calibrator is the 1X expression of each gene. The mRNA expression level is calculated as follows: mRNA expression level = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ where $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{Target}} - C_{t_{HPRT}})_{sample} - (C_{t_{Target}} - C_{t_{HPRT}})_{CB}$. Specific amplifications were checked by amplicon melting curves.

Immunohistochemistry analyses

After neutralization of endogenous peroxidase with 0.3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS, Sigma) for 10 min, the slides were incubated for 45 min in 10% normal goat serum (NGS, Sigma) diluted in PBS-4% bovine serum albumin (BSA, Sigma) before an incubation with primary antibodies presented in Table 1 overnight at 4°C. After washing, slides were incubated for 1 h at room temperature (RT) with biotinylated anti-mouse or anti-rabbit Abs (1:500 in PBS-4% BSA). Sections were then washed 3 times and exposed to avidin-biotinylated-peroxidase complex for 1 h and revealed with the Vector very intense purple substrate or 3, 3'-diaminobenzidine (Vector ABC kit). After several washes in distilled water, slides were dehydrated and mounted using Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France). Observations were performed using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). Pictures were acquired using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software.

Histological classification of the graft

The graft status was assessed using cresyl violet (CV) or NF70 and R73 staining as their variation corresponds to critical changes in the evolution of neuronal xenograft in the brain of immunocompetent rats^{3, 10, 16}. At the first time-points, the grafts are usually “healthy” with no T cells (R73⁻). They display homogeneous CV staining (CV⁺) and/or pNF70 fibers (NF70⁺). In some cases, low infiltration by T cells (less than 10) is observed. These grafts are referred as “NF70⁺R73^{+/-}”. At later stage, acute infiltration by T cells (R73⁺) is observed but

NF70⁺ fibers (NF70⁺) are still present. These grafts (NF70⁺R73⁺) correspond to “rejecting” graft. The next step is the rapid disappearance of NF70 staining (NF70⁻R73⁺) which corresponds to the loss of the transplant. Then, the graft turned into a scar (Scar). This evaluation was performed on blind-coded slides. For each antibody, a minimum of three adjacent serial sections containing the graft or surrounding the scar were analyzed by two independent readers who evaluated the presence (NF70⁺) or absence (NF70⁻) of pNF70⁺ fibers inside the graft, and scored the density of R73⁺ cells inside and around the graft (R73⁻, R73^{+/-}, R73⁺). These evaluations were used to determine the percentage of rats displaying NF70⁺ graft (Graft survival) and the percentage of rats displaying R73-infiltrated graft (Graft rejection).

Efficiency of the 6-OHDA lesion

The efficiency of 6-OHDA lesion was controlled by analyzing the percentage of dopaminergic loss in the substantia nigra compacta (SNc). The number of TH positive cells was counted at three different levels of the SNc using as a reference point, the exit of the third nerve (200µm rostral and caudal to this site). Cell counting was performed with the Mercator stereology software (Explora nova, La Rochelle, France). The percentage of loss was expressed as the number TH⁺ cells on the unlesioned side minus the number TH⁺ cells on the lesioned side, divided by the number TH⁺ cells at the unlesioned side and multiplied by 100. The results were analysed by two-way ANOVA.

Results

MSC promote the long-term survival of porcine mesencephalic neuroblasts following their implantation into the striatum of immunocompetent rats

The immunosuppressive activities of the MSC derived from the bone marrow of Lewis 1A rats prompted us to test their efficiency in promoting the survival of intracerebral xenotransplant. For this purpose, pNb were transplanted into the striatum of Lewis 1A rats without or with Lewis 1A rMSC. Survival of the graft was analysed at 28, 35, 42, 63 and 120 days post-transplantation with a minimum of five rats for each time-point. The presence of porcine neurons in the rat striatum was controlled using an antibody that specifically recognised the porcine neurofilament 70KDa subunit (NF70⁺). Infiltration of the graft by T lymphocytes was investigated using R73, an antibody directed against the T cell receptor. As illustrated in the figure 1, combination of these two labellings provides a good evaluation of the graft status. At early stages such as D28, pNb grafts were usually homogeneous with numerous NF70⁺ cells and no T cells (NF70⁺/R73⁻, healthy graft). At intermediate stages such as D35, pNb grafts were often heterogeneous. Porcine neurons were still present but the graft was clearly infiltrated by R73⁺ cells (NF70⁺/R73⁺, rejecting graft). At later stages such as D42, NF70 positive labelling was no longer visible but R73⁺ cells were still present (NF70⁻/R73⁺, rejected graft). As indicated in the table 3, variations in this timing existed between animals but the rejection process in Lewis 1A rats transplanted with pNb was systematically completed at day 63. At this date, only a scar was observed (Scar). The presence of MSC significantly impaired this rejection process. Indeed, all the pNB/MSC grafts looked healthy at D35 and 50% of the rats transplanted with both pNb and rMSC exhibited healthy grafts at D120 (Table 3).

Characterization of pNb-MSC co-graft

In the rats transplanted with pNb, all the transplants exhibited NF70⁺ cells at D28 (Fig. 2A and C). In contrast, no NF70⁺ cells were detected in any of the co-transplants at D28 (Fig. 2B and D). NF70⁺ cells were found in the co-transplants from D35 but only in two out of six rats. This percentage increased with time reaching 100% from D42 (Fig. 2B). Interestingly, TH⁺ cells were detected in all the grafts as soon as they became immunopositive for NF70. In rats transplanted with pNb, TH⁺ cells were found in all the transplants at D28. In rats co-transplanted with pNb and MSC, TH⁺ cells were detected at D35 in the two animal

immunopositive for NF70. At D63 and D120, all the healthy co-transplants exhibited clear NF70⁺ immunostaining and showed TH⁺ cells (Fig. 2 E-H).

To evaluate potential migration of the MSC in the brain, the experiment was performed using GFP-MSC (Remy et al., 2010). Thirty five days after the transplantation of pNb and GFP-MSC into the rat striatum, fluorescent MSC were only observed within the graft. No migration of transplanted MSC was detected (data not shown).

Characterization of the cellular host immune response

To characterise the cellular immune response, immunohistochemistry was performed using antibodies directed against activated microglial cells/macrophages (Ox42) and T cells (R73). As previously described, the transplantation of pNb into the striatum of adult immunocompetent rats induced a strong cellular response characterized by a massive infiltration of the graft by T cells and activated microglial cells between D28 and D42. In the rats co-grafted with MSC, infiltration of the graft by T cells (Fig 2J) was never observed before D42 (Table 3) and at D120, 50% of them exhibited healthy grafts without any T cell.

To evaluate the impact of MSC on inflammatory markers, the striatum of rats transplanted with pNb or pNb-MSC were collected at 28, 35, 42 or 63 days post-transplantation for RNA analyses. Seven or eight animals were sacrificed for each time-point in a given group. Striata from six sham-operated rats were used to determine the basal levels (control). We first analysed the expression of C β and CD11b as marker of T cell infiltration and microglial cell activation, respectively (Fig. 3). In the rats transplanted with pNb, a 6-fold and 3-fold increase in the levels of C β and CD11b mRNA was observed at D35, respectively, as compared to the basal levels in control rats. At later stages such as D42 or D63, C β and CD11b mRNAs were returned to basal levels. In contrast, we did not observe significant increase in the levels of C β and CD11b in the rats transplanted with both pNb and MSC whatever the stages analysed. To evaluate a potential impact of MSC on host reactive astrocytes, we analysed the expression of rat GFAP transcripts. The results show an upregulation of GFAP mRNA at D28, preceding the peak of CD11b and C β . The levels of GFAP transcripts further increased reaching a 5.4-fold increase at D35 and remaining significantly high at D42. In the rats transplanted with both pNb and MSC, a significant increase in the levels of GFAP mRNA was only observed at D35 and the increase was only of 1.7-fold.

We next analysed the expression of chemokines and cytokines that might favour or inhibit the host immune response (Fig 4). As reported in the figure 5, MCP1 and Rantes were significantly upregulated at day 35 in pNb-grafted animals and the upregulation of these two chemokines was correlated to the peak of expression of C β and CD11b. We also found at D28 an upregulation of the pro-inflammatory cytokines INF γ and IL-6 which preceded the upregulation at D35 of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF β . The levels of INF γ remained high up to D42 and then, strongly decreased whereas IL-6 returned to basal level before a second upregulation at D63. High level of IL-10 was observed from D35 to D63 whereas the TGF β returned to basal level as soon as D42. Interestingly, we did not observe any of these regulations in the rat that received both pNb and MSC. The levels of MCP1 and Rantes as well as the levels of the four studied cytokines were not significantly different from the basal levels in control animals at any of the time point determined. To further characterize the immunomodulatory mechanism triggered by rat MSC in our experimental model, we analysed the expression of iNOS and HO1, two enzymes previously shown as mediators of MSC function. As shown in the figure 4, both enzyme mRNAs were upregulated in the striatum of rats grafted with pNb, but the time-courses were different. Whereas HO1 expression increased between D28 and D42, the level of iNOS increased between D35 and D63. These regulations were impacted by MSC as illustrated by the absence of HO-1 upregulation and the persistent high level of iNOS mRNA between D35 and D63.

Effect of cografting on the motor behavior of 6-OHDA-lesioned rats

To evaluate the functional impact of pNb-MSC co-transplant, the cells were transplanted in the rat model of Parkinson's disease. Rats lesioned with unilateral injection of 6-OHDA were selected on the basis of their response to the dopaminergic agonist apomorphine. Post-mortem analysis confirmed a minimum of 90% loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta ipsilateral to the lesion (Fig. 5A and C). Lesioned rats were transplanted with pNb, MSC or pNb + MSC. Sham-operated rats were used as control. Motor recovery was assessed every 15 days using the cylinder test. As shown in the figure 7B, no recovery was observed in the rats transplanted with MSC or pNb alone. In contrast, significant signs of motor improvement were observed at D90 and D105 in the group of rats that received both pNb and MSC. As the beneficial effect was not significant any more at D120, the rats were divided according to the presence or absence of transplant. At D120, the rats either displayed a scar (Fig. 5G) or a healthy transplant with NF70⁺ (Fig. 5E) and TH⁺ (Fig. 5F) cells.

Intermediate stages were not observed. No activated microglial cell was observed in the control or pNb-MSC-transplanted rats. Inclusion of this parameter in the interpretation of the behavioral tests clearly showed significant recovery in rats displaying a healthy transplant (Fig.5D). The rats that exhibited a healthy graft were those that presented the best performance in the cylinder test whereas the performance of the rats that had rejected their graft was similar to the one of lesioned group that received vehicle (control). Motor recovery in 6-OHDA-lesioned rats was therefore correlated to the long-survival of the pNb-MSC transplants.

Discussion

Our present paper provide the first evidence that co-transplantation of syngeneic MSC with xenogeneic neuroblasts promotes the long term survival of xenografted neurons and allows motor recoveries in a rat model of Parkinson's disease. Behavioral improvement was previously observed after the transplantation of pNb into the striatum of lesioned rats but the animals were always treated with high doses of classic immunosuppressors^{5, 6, 17}. Here, we show that pNb co-transplanted with rMSC can survive up to 120 days without systemic immunosuppression. This prolonged survival is most probably the result of an immunosuppressive activity as the loss of xenografted neurons is due to a massive and sudden host immune response at 4-6 weeks^{3, 4}. This observation is supported by the description of MSC as being potent immunosuppressors, acting at different levels of the immune response^{13, 14}. Human MSC alter the maturation of the dendritic cells as well as their ability to present antigens to T cells, which is a key point of their activation¹⁸. They are also able to inhibit T cell proliferation and affect the differentiation of B cells into plasmocytes¹⁹. The MSC isolated from the bone marrow of Lewis 1A rats share similar immunosuppressive properties as illustrated by their ability to inhibit the proliferation of in vitro activated T cells and by the limited host immune response in pNb/MSC cografted rats. Indeed, numerous cellular and molecular events usually induced by the implantation of pNb in the rat brain are not observed or strongly reduced in the presence of MSC. For instance, the accumulation of GFAP mRNAs that precedes cell rejection in pNb-grafted rats is strongly reduced in co-grafted rats, suggesting an inhibition of the astroglial activation. The absence of significant increase in the levels of C β and CD11b at the analyzed time-points probably reflects a direct or indirect inhibitory effect of MSC on T lymphocyte and microglial cell activation. In vitro analyses raise the possibility of an effect through the secretion of anti-inflammatory molecules such as TGF β 1 or IL10²⁰. However, in vivo analyses did not reveal upregulation of such anti-inflammatory molecules. On the contrary, we rather observed a general abolition of pro- and anti-inflammatory signals. Indeed, MCP1, Rantes, IFN γ , IL-6, IL-10, TGF β or HO-1 remained at the basal levels in the striatum of rats grafted with both pNb and MSC in contrast to their upregulation around D35 in the brain of pNb-grafted rats. Interestingly, one molecule, iNOS, showed a different regulation with a steadily increased expression from D35: A role of this enzyme in preventing pNb rejection is supported by several observations, including the fact iNOS mediates the immunosuppressive properties of mouse MSC²¹. An immunomodulatory effect of iNOS was also observed in EAE models as demonstrated by exacerbated inflammatory response in mouse deficient for iNOS²². The enzyme probably acts

through the production of NO, a potent inhibitor of T cell proliferation^{23, 24} and leukocyte adhesion on the endothelial cell layer²⁵. Further studies are required to fully characterize the implication of iNOs in the long-term survival of xenografted pNb, but our present data indicate that the immunosuppressive properties of the MSC can protect xenogenic neurons from rejection. Neural stem/progenitor cells (NSPC) also display immunosuppressive properties and show prolonged survival in the brain of xenogenic hosts^{16, 26}. As they can generate neurons, these cells are considered as potential cell source for restorative strategies, but in fact, very few pNSPC differentiate spontaneously into dopaminergic neurons *in vivo*¹⁶. Then, we thought of combining the ability of ventral mesencephalic neuroblasts to generate dopaminergic neurons and the immunosuppressive properties of MSC. The long-term survival of these co-transplants in the brain of xenogenic hosts and their functional effects in rat model of Parkinson's disease suggest that the intracerebral implantation of 100, 000 MSC with 300, 000 pNb might be a good basis to develop new restorative strategies with high efficiency and low detrimental secondary effects. Characterization of the mechanisms by which locally implanted MSC contribute to motor recoveries in immunocompetent rats should be of great help to optimize such strategies, which in fine, would most probably a multi-immunosuppressive therapy.

Acknowledgments

We are grateful to Dr P. Brachet and Dr I. Anegon for their support. We express special thanks to “Etablissement Français du Sang” (EFS, Nantes) that kindly irradiated the MSC. The work was supported by the “Association Française contre les Myopathies” (AFM) and Centaure Foundation. X. Lévêque and E.Mathieux were supported by CECAP and Progreffe foundation. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Krystkowiak P, Gaura V, Labalette M, et al. Alloimmunisation to Donor Antigens and Immune Rejection Following Foetal Neural Grafts to the Brain in Patients with Huntington's Disease. *PLoS ONE*. 2007;2:e166.
2. Melchior B, Remy S, Nèrrière-Daguin V, Heslan JM, Soulillou JP, Brachet P. Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. *J Neurosci Res*. May 1 2002;68(3):284-292.
3. Michel DC, Nèrrière-Daguin V, Josien R, Brachet P, Naveilhan P, Neveu I. Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. *Exp Neurol*. Nov 2006;202(1):76-84.
4. Remy S, Canova C, Daguin-Nèrrière V, et al. Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotransplantation*. May 2001;8(2):136-148.
5. Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, Isacson O. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp Neurol*. Jul 1996;140(1):1-13.
6. Larsson LC, Czech KA, Brundin P, Widner H. Intrastriatal ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. *Cell Transplant*. Mar-Apr 2000;9(2):261-272.
7. Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med*. Mar 1997;3(3):350-353.
8. Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant*. Mar-Apr 2000;9(2):273-278.
9. Schumacher JM, Ellias SA, Palmer EP, et al. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*. Mar 14 2000;54(5):1042-1050.
10. Michel-Monigadon D, Nèrrière-Daguin V, Leveque X, et al. Minocycline promotes long-term survival of neuronal transplant in the brain by inhibiting late microglial activation and T-cell recruitment. *Transplantation*. Apr 15 2010;89(7):816-823.
11. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 31 1998;95(7):3908-3913.
12. Rossignol J, Boyer C, Thinard R, et al. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med*. Aug 2009;13(8B):2547-2558.
13. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. Sep 2008;8(9):726-736.
14. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. May 2007;28(5):219-226.
15. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. Sep 1 2005;106(5):1755-1761.

16. Michel-Monigadon D, Bonnamain V, Nerriere-Daguin V, et al. Trophic and immunoregulatory properties of neural precursor cells: benefit for intracerebral transplantation. *Exp Neurol*. Jul 2011;230(1):35-47.
17. Huffaker TK, Boss BD, Morgan AS, et al. Xenografting of fetal pig ventral mesencephalon corrects motor asymmetry in the rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res*. 1989;77(2):329-336.
18. Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. Apr 2005;90(4):516-525.
19. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. Jan 1 2006;107(1):367-372.
20. Lescaudron LCB, V.Bonnamain, KD. Fink, X. Lévêque, J. Rossignol, V. Nerrière-Daguin, AC Malouet, F. Lelan, N.D Dey, D. Michel-Monigadon, M. Lu, I. Neveu, S. von Hörsten, P. Naveilhan and GL Dunbar. Assessing the potential clinical utility of transplantations of Mesenchymal and Neural Stem cells for treating neurodegenerative disease. In: Singh SR, ed. *Somatic Stem cells: Methods in Molecular Biology*. Vol 879. Editor: Shree Ram Singh ed: Humana press; 2012: 147-164.
21. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. Feb 7 2008;2(2):141-150.
22. Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *J Immunol*. Mar 15 1998;160(6):2940-2946.
23. Albina JE, Abate JA, Henry WL, Jr. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J Immunol*. Jul 1 1991;147(1):144-148.
24. Krenger W, Falzarano G, Delmonte J, Jr., Snyder KM, Byon JC, Ferrara JL. Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. *Blood*. Aug 1 1996;88(3):1113-1121.
25. Kubes P, Kurose I, Granger DN. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol*. Sep 1994;267(3 Pt 2):H931-937.
26. Bonnamain V, Neveu I, Naveilhan P. Neural stem/progenitor cells as a promising candidate for regenerative therapy of the central nervous system. *Front Cell Neurosci*. 2012;6:17.

Specificity	Host	Clone	Dilution	Target cells	Origin
CD11b	Mouse	Ox42	Supernatant	Macrophages, microglial cells	1
Porcine NF70	Mouse	DP5	10 µg/ml	Porcine neurons	2
T cell receptor α-β chain	Mouse	R73	Supernatant	T cells	1
TH	Rabbit	Polyclonal	0.1 µg/ml	Dopaminergic neurons	3
Mouse IgG (FITC)	Goat	Polyclonal	1.5 µg/ml		4
Mouse IgG (Biot)	Horse	Polyclonal	1 µg/ml		4
Rabbit IgG (FITC)	Donkey	Polyclonal	3 µg/ml		4
Rabbit IgG (Biot)	Goat	Polyclonal	2.2 µg/ml		4

Table 1: Antibodies used in this study. 1, European Collection of Cell Culture, Salisbury, UK; 2, Université Paris VII, Paris, F; 3, Pel-Freeze, Rogers, Ark, USA ; 4, Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, UK.

Primers	Sequence
rHPRT	Up CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC Lo TTCGCTGATGACACAAACATGA
rCb	Up GTGAATGGGAAGGAGATCCG Lo CACTGATGTTCTGTGTGACAGGTT
CD11b	Up TTGGAGTTGCCTGTGAAGTACG Lo TGCGACAGACACTTGAGAGGTT
rGFAP	Up CTAGCCCTGG ACATCGAGAT C Lo TCCTGCTTCG ACTCCTTAAT GA
MCP1	Up CCACTCACCTGCTGCTACTCAT Lo TTCTGATCTCACTTGGTTCTGGTC
rRANTES	Up GCATCCCTCACCGTCATCCT Lo TAGCTCATCTCCAAATAGTTGAT
IFN γ	Up TGGATGCTATGGAAGGAAAGA Lo GATTCTGGTGACAGCTGGTG
rIL6	Up GCAAGAGACTTCCAGCCAGTT Lo CATCATCGCTGTTTCATACAATCA
rIL10	Up TGCTATGTTG CCTGCTCTTA CTG Lo TCAAATGCTC CTTGATTTCT GG
rTGF β	Up CTCAACACCTGCACAGCTCC Lo ACGATCATGTTGGACAACCTGCT
rHO-1	Up CCACAGCTCG ACAGCATGTC Lo GTTTCGCTCT ATCTCCTCTT CCA
riNOS	Up GACCAAAGT TGTGCCTGGA Lo TACTCTGAGG GCTGACACAA GG

Table 2: Primers used in this study.

	D28		D35		D42		D63		D120
MSC	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Number of rats	6	5	6	6	6	5	6	6	6
NF70 ⁺ orCV ⁺ /R7.3 ⁻	4	5	1	6	2	1	0	2	3
NF70 ⁺ /R7.3 ^{+/-}	1	0	3	0	0	2	0	1	0
NF70 ⁺ /R7.3 ⁺	1	0	1	0	2	0	0	1	0
NF70 ⁻ /R7.3 ⁺	0	0	1	0	2	1	0	1	0
Scar	0	0	0	0	0	1	6	1	3

Table 3: Graft survival in rats grafted with pNb or pNb+MSC. The graft status was assessed using cresyl violet, NF70 and R73 staining. CV⁺/R73⁻ and NF70⁺/R73⁻ are considered as healthy graft with no (-) or low (+/-) amount of R73 T cells, no sign of degeneration (CV⁺) and/or a clear expression of the porcine neurofilament in neurons (NF70⁺). NF70⁺R73⁺ and NF70⁻R73⁺ grafts are considered as rejecting and rejected graft, respectively. Scar corresponds to the stage of almost complete disappearance of the graft. R73^{+/-} corresponds to a brain with 1-10 T cells per section.

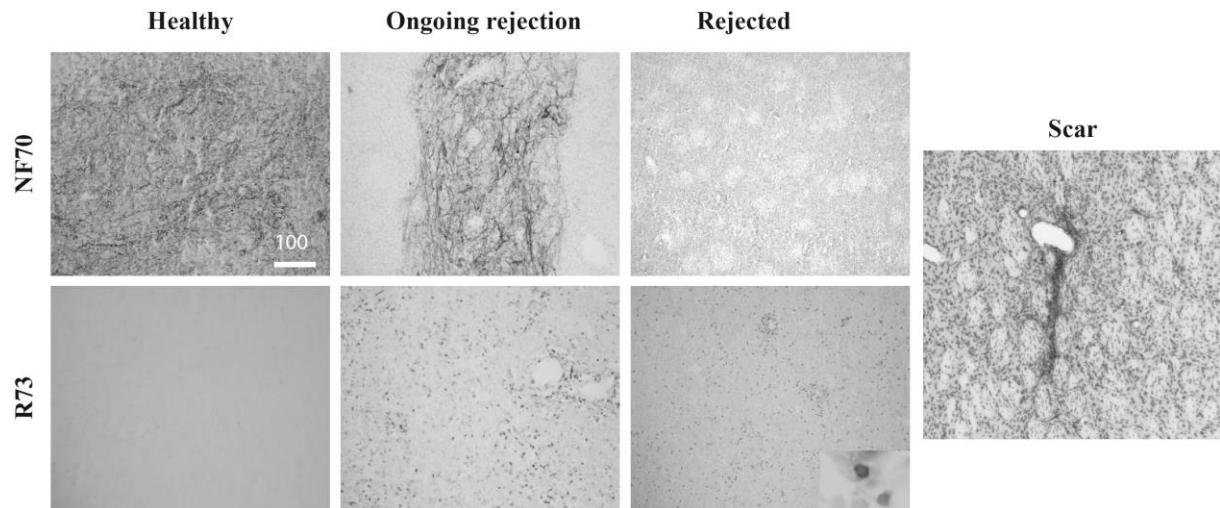


Figure 1. Histological assessment of pNb graft status using pNF70 and R73 antibodies.

Healthy grafts exhibit no sign of degeneration, a clear NF70 immunostaining and no(-) or few (+/-) R73 cells (NF70⁺/R73⁻, Healthy). Rejecting grafts are invaded by numerous T cells, but porcine neurons are still present and express pNF70 (NF70⁺R73⁺, Rejecting). Rejected grafts are characterized by the disappearance of pNF70⁺ cells whereas R73⁺ cells are still observed (NF70⁻R73⁺). When the rejection process is completed, the T cells have totally disappeared and the graft has turned into a scar (Scar).

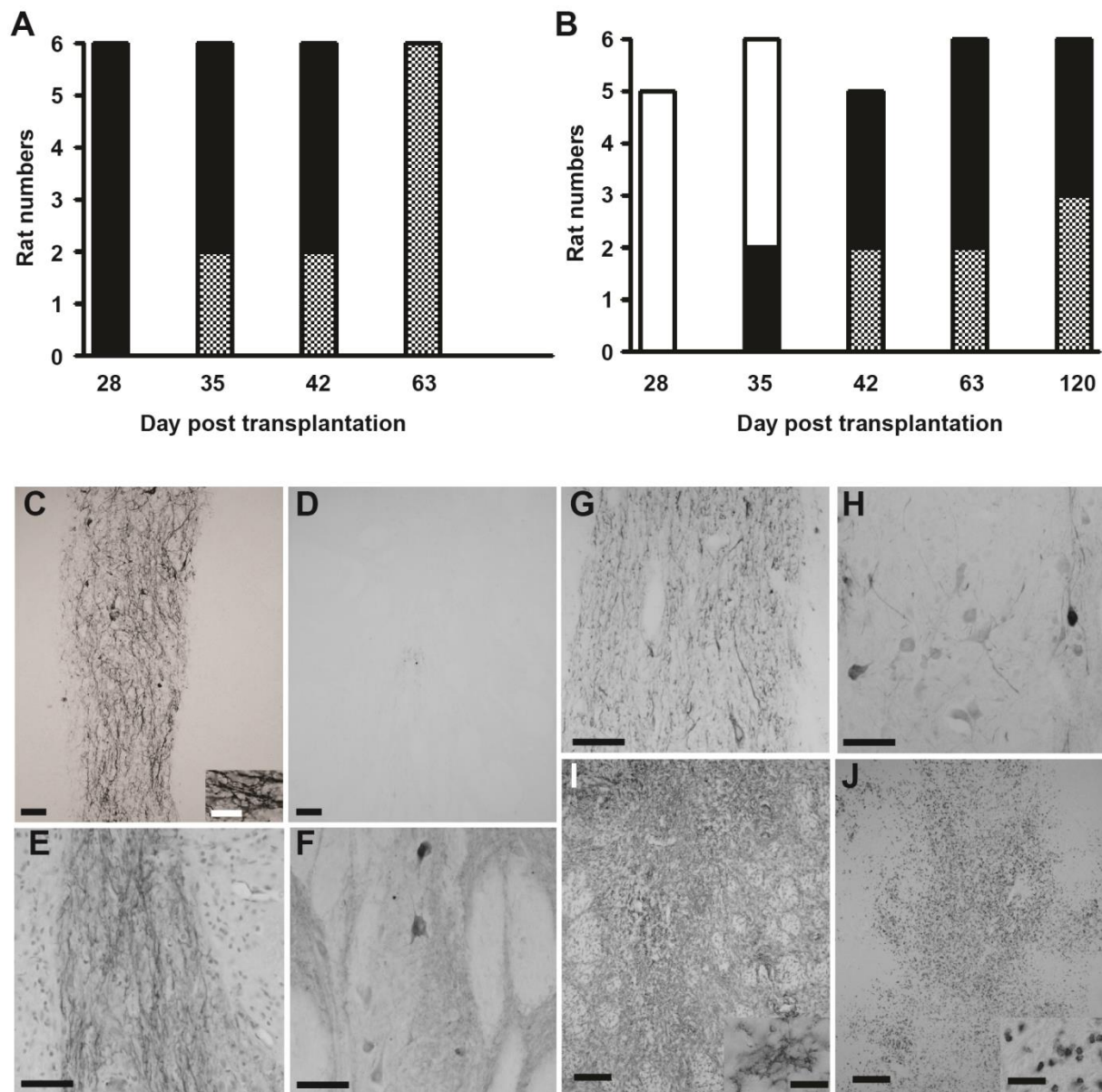


Figure 2: Immunohistological analyses of the xenotransplants.

(A-B) Numbers of rats grafted with pNb (A) or with pNb and MSC (B), displaying NF70 negative healthy graft (white bar), NF70 positive graft (black bar), or rejected graft (grey bar). **(C-H)** Representative micrograph of healthy grafts following the transplantation of pNb alone (C) or in presence of MSC (D-H). At D28, NF70 immunostaining was observed in pNb graft (C) whereas no NF70⁺ cell was observed in the co-grafts (D). At later stages such as D63 (E, F) and D120 (G, H), the co-grafts were strongly immunopositive for NF70 (E,G) and exhibited TH⁺ cells (F,H). **(I-J)** Representative micrograph of pNb-MSC co-graft undergoing rejection. The grafts are immunostained with OX42 (I) or R73 (J). Scale Bars: C-H, 50 μ m; I-J, 150; insert, 25 μ m.

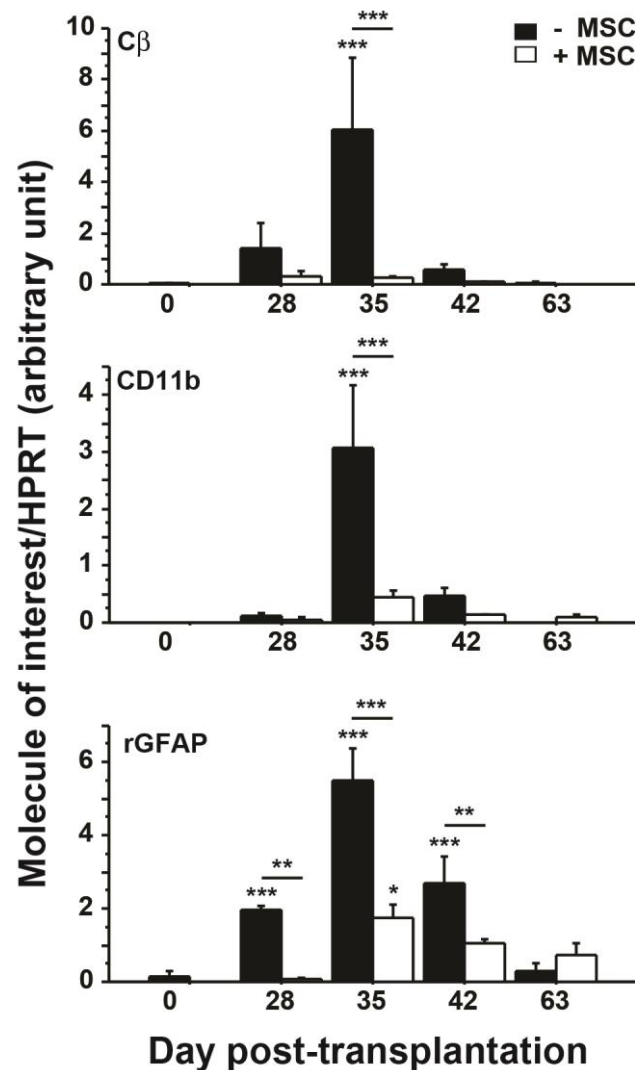


Figure 3: Relative expression of C β , CD11b and GFAP mRNAs in grafted animals. Total RNAs from grafted striatum with pNb (-MSC) or pNb + MSC (+MSC) were collected at days 28, 35, 42, 63 (n = 7/8 per group per day) and submitted to Q-PCR. D0 corresponded to ungrafted animals (n=6). Mean value $\pm$ SEM are presented (ANOVA test, * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001).

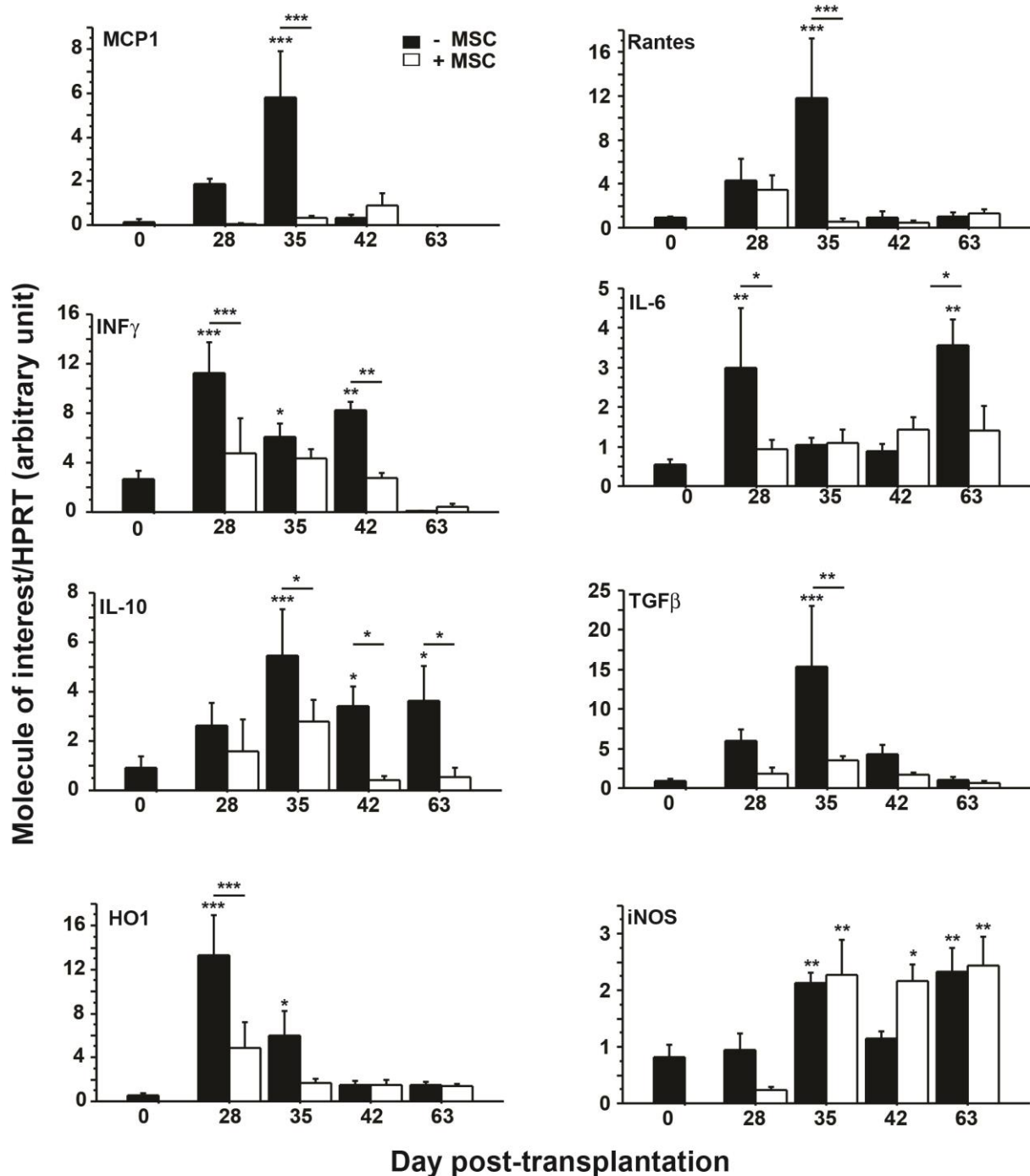


Figure 4: Relative transcriptional expression of chemokines, cytokines and cytoprotective enzymes in grafted animals. Total RNAs prepared from the striatum of rats transplanted with pNb (-MSC) or pNb + MSC (+MSC) were collected at days 28, 35, 42, 63 and submitted to Q-PCR (n = 7/8 per group per day). D0 corresponded to untransplanted animals (n=6). Mean value +/- SEM are presented (ANOVA test, * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001).

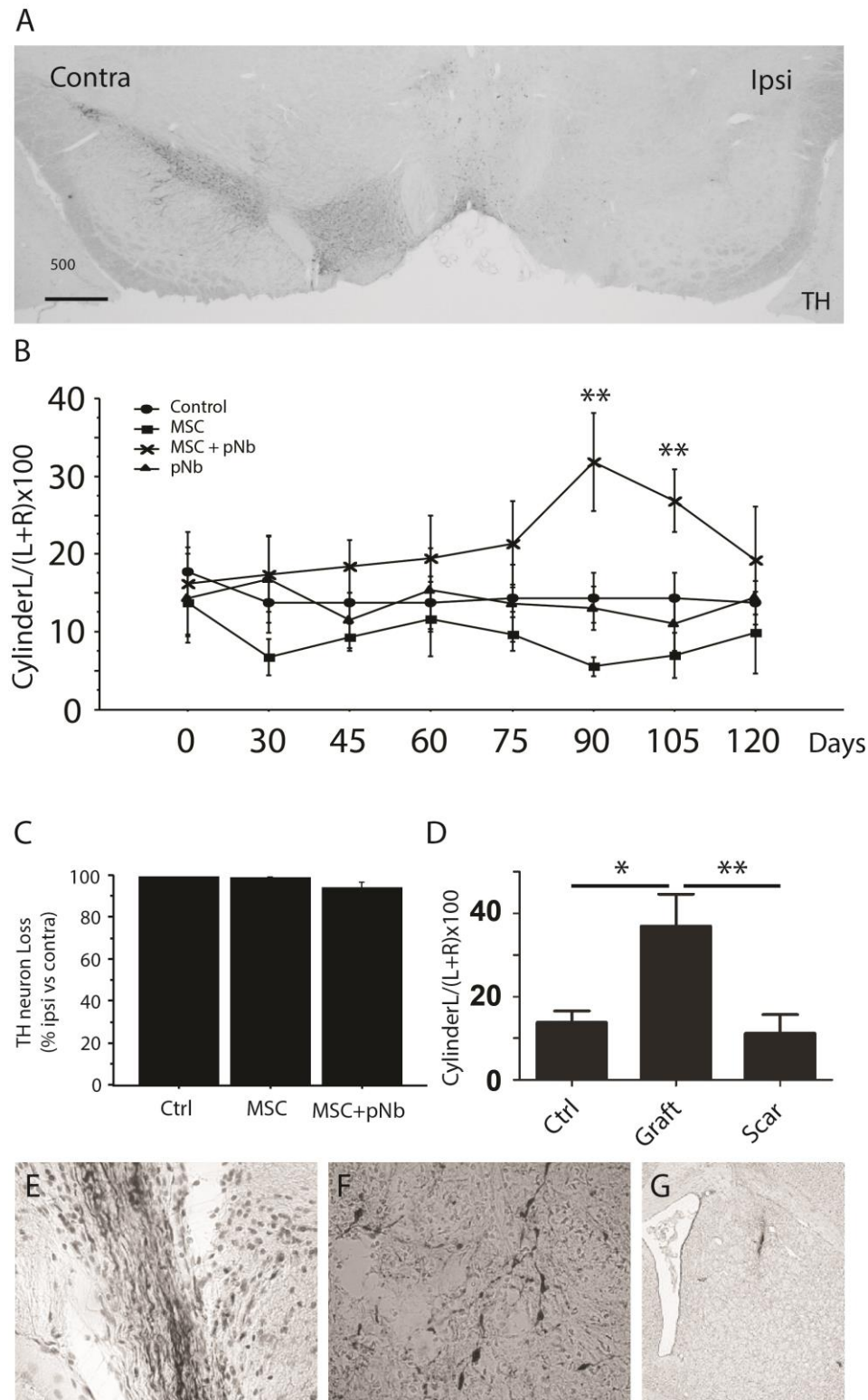


Figure 5: Functional recovery of 6-OHDA-lesioned rats. Rats unilaterally lesioned with 6-OHDA were transplanted with MSC, pNb, pNb+MSC or vehicle (Control), and tested for motor recovery. **(A)** TH neuronal loss in the substantia nigra. TH immunostaining showing the loss of TH⁺ neurons in the substantia nigra ipsilateral (right) to the lesion. **(B)** Forelimb

asymmetry was tested every 15 days with the cylinder test. Datas are expressed as percentage of limb preference for the contralateral (left) forepaw. $n=8$ per group except $n=13$ for MSC + pNb group, Mean value $\pm$ SEM (ANOVA test, $**P<0.01$). **(C)** The neuronal loss due to 6-OHDA lesion was estimated by counting the number of TH⁺ cells in the substantia nigra of rats transplanted with MSC, MSC+pNb or untransplanted. Mean value $\pm$ SEM are presented. **(D)** Functional recovery according to the presence of transplant. Cylinder test scores at D120 were expressed according to the presence (Graft, $n=4$) or absence (Scar, $n=9$) of healthy graft in the rat striatum, and compared to vehicle group (Ctrl, $n=8$). Mean value $\pm$ SEM are presented (one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test, $*P<0.05$, $**P<0.01$). **(E-G)** At D120, transplanted rats exhibited either a healthy graft with NF70⁺ (E, NF staining) and TH⁺ (F, TH staining) neurons or a scar (G, cresyl violet staining).

Discussion

Cette étude est la première à démontrer le rôle des CSM comme une stratégie immunosuppressive locale utilisable pour prévenir le rejet de xénogreffes intracérébrales.

Afin d'évaluer le devenir des co-greffes dans le striatum de rats immunocompétents, les greffes ont été classées en 4 groupes selon les résultats des colorations au crésyl violet et des marquages anti-pNF70 qui ciblent les neurofilaments porcins de 70kDA et anti-R73 qui marquent la chaîne $\alpha\beta$ du récepteur des cellules T. Nous distinguons ainsi « les greffes saines » (pNF70+/R73-), « en rejet » (pNF70+/R73+), « rejetées » (pNF70-/R73+) et « cicatrice » (scar) (figure 1). Le choix de ces marqueurs est basé sur le fait que les xénogreffes de neurones porcins sont positives pour le marqueur neuronal NF70 (greffe saine) jusqu'à la rapide infiltration du greffon par les lymphocytes T (en rejet). Une fois les neurones disparus (rejetée), les lymphocytes disparaissent à leur tour, ne laissant qu'une cicatrice (scar) (Rémy et al., 2001). Lors d'une co-transplantation pNB-CSM, 80% et 50% des animaux exhibent respectivement une greffe saine et mature à 63 jours et 120 jours alors qu'une xénogreffe de pNB est systématiquement rejetée à 63 jours, (Table 3 et figure 2).

A J28, deux des rats qui ont reçu une greffe de pNB présentent des signes d'inflammation. Ces premiers signes de rejet coïncident avec l'augmentation des transcrits rGFAP (marqueur des astrocytes de rat) dans le striatum, sous-entendant l'installation d'une astroglie (figure 3). Ce phénomène confirme des précédentes observations indiquant une mise en place d'une astroglie lors du rejet (Michel et al., 2006). La détection de mRNA codant pour les cytokines pro-inflammatoires IFN γ et IL-6, est un premier indicateur d'une inflammation (figure 4). Ces cytokines pourraient être sécrétées par les astrocytes activés (Aschner, 1998). A J35, un grand nombre de rats transplantés avec des pNB est classé « en rejet », alors que tous les rats co-greffés sont classés dans le groupe « greffes saines » (table 3). Dans le groupe pNB, nous observons une augmentation des signes de rejet comme une activation microgliale (CD11b) et infiltration lymphocytaire (C β). Une augmentation de l'expression des chimiokines RANTES et MCP-1 est également notée. Ces événements ne sont pas observés dans le groupe des rats co-greffés (figure 3 et 4). Une des hypothèses serait que les CSM exercent un effet immunosuppresseur sur l'activation des cellules microgliales et des lymphocytes T. Les CSM pourraient avoir un impact sur les cellules T en inhibant leur

prolifération (Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002) ou en bloquant la maturation et la présentation antigénique des cellules dendritiques (Beyth et al., 2005; Jiang et al., 2005; Nauta et al., 2006; Zhang et al., 2004). Elles pourraient également intervenir en inhibant la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires par différents types cellulaires comme (les astrocytes) ou les cellules microgliales activées (Hanisch, 2002). Il en résulterait une diminution du recrutement des lymphocytes T au sein de la greffe et de leur activation. De plus, la suppression de sécrétion d'IFN γ par les cellules T diminuerait le potentiel maintien des cellules microgliales en CPA (Aloisi et al., 2000a).

Certains travaux suggèrent que les CSM agiraient via la sécrétion de TGF β , d'IL-10 ou d'IL-6 (Djouad et al., 2007; Di Nicola et al., 2002; Yang et al., 2009). Dans notre modèle de co-transplantation, nous notons une diminution de leurs niveaux d'expression qui contraste par rapport à la surexpression d'IL-10 et TGF β à J35 chez les rats greffés avec des pNB (figure 4).

Le mécanisme impliqué dans les fonctions immunosuppressives des CSM n'est pas encore totalement défini. Plusieurs molécules sont de potentielles candidates, comme notamment iNOS (inducible nitric oxide synthase). iNOS est une enzyme exprimée par diverses cellules dont les macrophages. Elle permet la production de NO (oxyde nitrique), une molécule gazeuse qui, à haute concentration, aurait un rôle dans l'inhibition de la prolifération des cellules T (Albina et al., 1991; Krenger et al., 1996), la sécrétion de cytokines, ainsi que dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Granger and Kubes, 1994; Kubes et al., 1991). La molécule NO interviendrait également dans la fonction des macrophages ainsi que dans la signalisation du TCR, l'expression des récepteurs aux cytokines et le phénotype des cellules T (Niedbala et al., 2006). Selon différents travaux, iNOS serait impliquée dans l'activité immunosuppressive des CSM issues de rongeurs (Ren et al., 2008, 2009; Sato et al., 2007; Zinocker and Vaage, 2012). Nos résultats suggèrent qu'iNOS pourrait effectivement intervenir dans l'effet immunosuppresseur des CSM de rats. Tout d'abord, nous avons confirmé qu'*in vitro*, des CSM de rat inhibaient de manière dose-dépendante, la prolifération des lymphocytes T isolés de la rate et stimulés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (**Figure 34A**). Dans un second temps, nous avons étudié le mécanisme immunosuppresseur des CSM dans un contexte xénogénique. Pour ce faire, des splénocytes de rats Lewis 1A ont été stimulés avec des cellules mononucléaires (PBMC) irradiées issues de sang de porc, en présence ou non de CSM. La prolifération des cellules T CD3 $^{+}$ a été analysée par cytométrie de flux grâce à un marquage CFSE (Carboxyfluorescein

Succinimidyl Ester). Les résultats montrent que l'effet suppresseur des CSM sur la prolifération des cellules T CD3⁺ est inhibé par un traitement avec du LNMMA, un inhibiteur non spécifique des NO synthases (**Figure 34B**). Il est également à noter qu'une sur-régulation des transcripts iNOS a été observée entre 72h et 120 heures de co-culture (**Figure 34C**) ainsi qu'après 35 jours de greffe (figure 4).

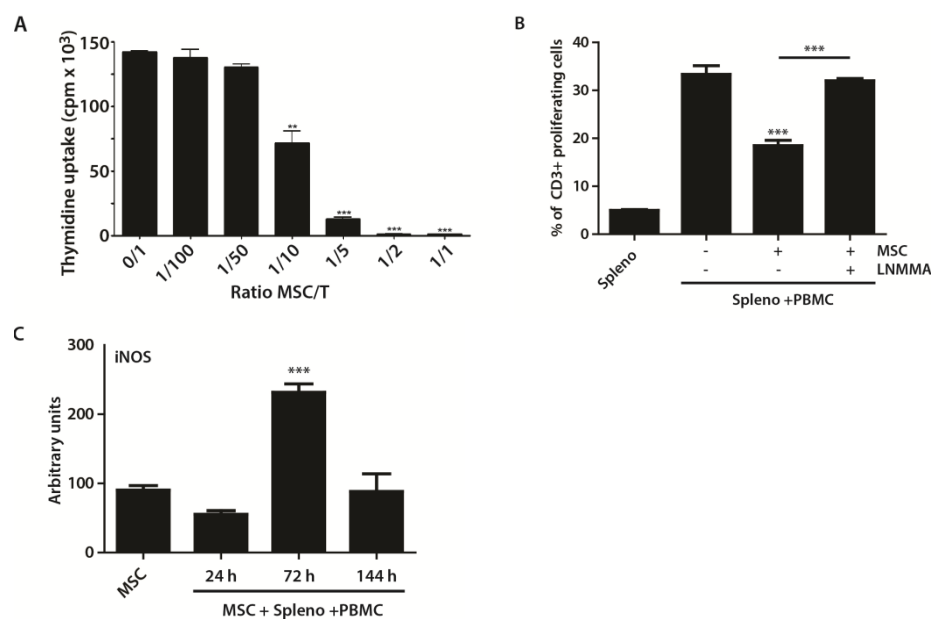


Figure 34 : Etude de l'activité immunosuppressive des CSM de rat dans un contexte xénogénique. A) 1×10^5 de cellules T allogéniques activées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 sont cultivées durant 3 jours avec un ratio croissant de CSM irradiées. La prolifération des LT est quantifiée par incorporation de thymidine tritiée durant les 12 dernières heures. B) Des splénocytes de rat sont cultivées avec des PBMC porcines irradiées, en présence ou non de CSM traitées ou non avec du LNMMA. C) Expression de l'ARNm d'iNOS par qPCR de co-cultures de CSM en présence ou non de splénocytes de rat et de PBMC de porc. Test statistique : test Anova (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Parmi les autres molécules potentiellement impliquées dans l'activité immunosuppressive des CSM, on note PGE2 (prostaglandines E2 Aggarwal and Pittenger, 2005; Djouad et al., 2007; Spaggiari et al., 2009), HGF (hepatocyte growth factor Di Nicola et al., 2002), IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase Krampera et al., 2006; Meisel et al., 2004; Ren et al., 2009), HO1 (hème oxygénase 1 Chabannes et al., 2007) ou HLA-G5 (Selmani et al., 2008). Une étude de Zinocker et al., publiée en 2012 suggère que les CSM de rat inhiberaient la prolifération des cellules T par l'intermédiaire d'iNOS et la sécrétion de cytokines

inflammatoires par l'intermédiaire de PGE2 (Zinocker and Vaage, 2012). Plusieurs de ces molécules pourraient donc intervenir dans l'activité suppressive des CSM.

Un autre point intéressant de notre étude est l'absence de marquage pNF70 dans les co-greffes jusqu'à J35 alors que toutes les greffes de pNB sont positives pour ce marqueur dès J28 (figure 2). La différenciation des cellules mésencéphaliques porcines en neurones porcins semble donc retardée en présence de CSM. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour comprendre les raisons de ce retard de différenciation.

Pour déterminer si la co-greffe avec des CSM ne perturbait pas la fonctionnalité des xénogreffes, des pNB, des CSM ou des pNB + CSM ont été greffés dans le striatum de rats lésés par la 6-OHDA. L'efficacité de la lésion a été confirmée par un marquage TH au niveau de la substance noire qui a révélé 90% de perte dopaminergique du côté ipsilatéral comparé au côté contralatéral (figure 5a et c). Une récupération motrice des rats a été observée à 90 et 105 jours mais uniquement pour les rats co-greffés avec des pNB-CSM (figure 5b). C'est la première fois qu'une récupération motrice est observée chez des rats parkinsoniens greffés avec des cellules mésencéphaliques porcines sans l'apport d'immunosuppresseur systémique (Galpern et al., 1996; Huffaker et al., 1989). Une diminution de la récupération a été constatée à 120 jours, mais si on restreint l'analyse aux animaux qui ont conservé une greffe saine à 120 jours, une récupération motrice est également observée (figure 5d-g). La récupération motrice est donc directement liée à la présence d'une greffe de pNB-CSM saine dans le striatum de rat lésés par la 6-OHDA. Les CSM ne perturbent donc pas l'activité des pNB.

L'activité immunosuppressive des CSM semble donc efficace pour prévenir le rejet des xénogreffes intracérébrales. La survie des cellules jusqu'à 120 jours, la présence de neurones dopaminergiques et la récupération motrice des rats parkinsoniens laissent entrevoir la transplantation de CSM comme une stratégie pour limiter l'utilisation d'immunosuppresseurs systémiques. L'intérêt de cette stratégie demande cependant à être confirmé et optimisé en testant notamment la survie des cellules sur du plus long terme, en ajoutant des faibles doses d'immunosuppresseurs systémiques. Il serait également intéressant d'approfondir les mécanismes immunosuppresseurs mis en jeu par les CSM en étudiant leur impact sur d'autres cellules immunes telles que les cellules B, les cellules dendritiques et les cellules NK.

Les propriétés immunomodulatrices des cellules souches multipotentes sont d'un grand intérêt pour la médecine neurorégénératrice et, dans cette optique, les cellules souches neurales qui ont un plus important potentiel de différenciation neuronale demandent à être étudiées.

ARTICLE 2

Expression of Heme Oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host immune response

Virginie Bonnamain*, **Elodie Mathieux***, Reynald Thinard, Pamela Thebault, Veronique Nerriere-Daguin, Xavier Lévêque, Ignacio Anegón, Bernard Vanhove, Isabelle Neveu* and Philippe Naveilhan*

* Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

Article publié dans *Stem Cells* (2012).

Introduction

Les cellules souches/progénitrices neurales (CSPN) ont démontré leur potentiel thérapeutique pour diverses pathologies du SNC comme la maladie de Parkinson (Redmond et al., 2007; Svendsen et al., 1997b), la chorée d'Huntington (Lee et al., 2005b; McBride et al., 2004), l'ischémie cérébrale (Chu et al., 2003, 2004a; Jeong et al., 2003) ou la sclérose en plaques (Einstein et al., 2003, 2006, 2007; Pluchino et al., 2003, 2009a). Leur faible potentiel de différenciation, notamment en neurones dopaminergiques (Armstrong et al., 2002, 2003; Liker et al., 2003), suggère que leurs effets bénéfiques seraient en partie dus à leurs propriétés neurotrophiques et immunomodulatrices. Différents travaux ont ainsi mis en évidence que les CSPN induisaient des poussées neuritiques, favorisaient la régénération neuronale ou avaient des effets neuroprotecteurs grâce à la sécrétion de facteurs neurotrophiques (Lu et al., 2003; Michel-Monigadon et al., 2011; Ourednik et al., 2002; Redmond et al., 2007; Ryu et al., 2004; Yasuhara et al., 2006). D'autres travaux ont souligné des propriétés immunologiques particulières révélées par le fait que les CSPN survivaient plus longtemps que des neuroblastes porcins dans le cerveau de rat immunocompétent (Harrower et al., 2006; Michel-Monigadon et al., 2011) et dans des modèles de pathologies cérébrales (Armstrong et al., 2001; Modo et al., 2002). La faible immunogénicité de ces cellules qui expriment peu ou pas de molécules du CMH et de co-stimulation (Hori et al., 2003; Yin et al., 2008) pourrait expliquer la faible réponse immune en allotransplantation mais des processus actifs comme une immunomodulation ont également été mis en évidence. Ainsi, Einstein et al., et Pluchino et al., ont montré que l'injection de CSPN en intraveineuse (Einstein et al., 2007; Pluchino et al., 2003, 2005, 2009a) ou en intracérébrale (Einstein et al., 2003, 2006; Pluchino et al., 2009a) modulait l'environnement immun favorisant une régénération axonale et une amélioration clinique dans des modèles EAE de sclérose en plaques. Selon ces auteurs, les CSPN exerceraient leur potentiel immunomodulateur par migration vers le site de lésion dans le SNC mais aussi dans les niches périvasculaires (Einstein et al., 2003, 2006; Ben-Hur et al., 2004; Pluchino et al., 2003, 2005, 2009a), et dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques (Einstein et al., 2007; Pluchino et al., 2009a) ou la rate (Lee et al., 2008). Un effet direct des CSPN sur les lymphocytes T a été observé avec des CSPN de rongeur en contexte syngénique (Einstein et al., 2007; Fainstein et al., 2008; Pluchino et al., 2005), des CSPN humaines en allogénique (Akesson et al., 2009; Pluchino et al., 2009a) et

des CSPN de porc en xénogénique (Michel-Monigadon et al., 2011). Toutefois, alors qu'en 2005 Pluchino et al., suggéraient que les CSPN agissaient en provoquant l'apoptose des cellules T (Pluchino et al., 2005), d'autres montrèrent que l'addition de CSPN à une culture de lymphocytes activés provoquait une inhibition de leur prolifération (Akesson et al., 2009; Einstein et al., 2007; Fainstein et al., 2008; Michel-Monigadon et al., 2011).

L'étape suivante était de caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'inhibition de la prolifération des LT par les CSPN. Une première étude réalisée sur une lignée de souris suggérait un rôle de iNOS et des prostaglandines (Wang et al., 2009) mais l'utilisation d'inhibiteur de iNOS ne nous a pas permis de confirmer ces résultats sur des CSPN de porc (Michel-Monigadon et al., 2011). Nous avons alors repris cette étude *in vitro* en utilisant des CSPN issues de rats.

L'étude a été réalisée avec des CSPN isolées du cerveau fœtal de rat Sprague Dawley à 15 jours de gestation et des lymphocytes T (LT) allogéniques activés préparés à partir de la rate. Le protocole utilisé a été développé par Virginie Bonnamain (Bonnamain et al., 2011). Les LT isolés de la rate sont purifiés par une déplétion négative des cellules NK, monocytes et cellules B avant de subir une stimulation polyclonale dépendante du TCR à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Les CSPN sont cultivées durant 10 jours sous forme de neurosphères dans un milieu sans sérum supplémenté en N2 et en bFGF. La co-culture est réalisée dans un milieu mixte constitué de 50% de milieu pour LT (RPMI + 5 % de sérum) et 50% de milieu pour CSPN (DMEM/F12 + N2). Ce mixte permet d'assurer la survie et l'activité des deux types cellulaires, et la réduction du pourcentage de sérum à 2,5% permet de garder les CSPN à un stade indifférencié. La prolifération des LT est étudiée par incorporation de thymidine tritiée durant les 12 dernières heures de culture ou par marquage des LT au CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester).

ARTICLE

STEM CELLS

TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS

Expression of Heme Oxygenase-1 in Neural Stem/Progenitor Cells as a Potential Mechanism to Evade Host Immune Response

VIRGINIE BONNAMAIN,^{a,b,c} ELODIE MATHIEUX,^{a,b,c} REYNALD THINARD,^{a,b,c} PAMÉLA THÉBAULT,^{a,b,c} VÉRONIQUE NERRIÈRE-DAGUIN,^{a,b,c} XAVIER LÉVÊQUE,^{a,b,c} IGNACIO ANEGON,^{a,b,c} BERNARD VANHOVE,^{a,b} ISABELLE NEVEU,^{a,b,c} PHILIPPE NAVEILHAN^{a,b,c}

^aINSERM, U643, Nantes, France; ^bCHU de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITER, Nantes, France; ^cUniversité de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

Key Words. Immune properties • Immunomodulation • Stem cells • T cells • Transplantation • Heme oxygenase-1 • Nitric oxide synthase

ABSTRACT

Besides their therapeutic benefit as cell source, neural stem/progenitor cells (NSPCs) exhibit immunosuppressive properties of great interest for modulating immune response in the central nervous system. To decipher the mechanisms of NSPC-mediated immunosuppression, activated T cells were exposed to NSPCs isolated from fetal rat brains. Analyses revealed that NSPCs inhibited T-cell proliferation and interferon-gamma production in a dose-dependent manner. A higher proportion of helper T cells (CD4⁺ T cells) was found in the presence of NSPCs, but analyses of FoxP3 population indicated that T-cell suppression was not secondary to an induction of suppressive regulatory T cells (FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺). Conversely, induction of the high affinity interleukin-2 (IL-2) receptor (CD25) and the inability of IL-2 to rescue T-cell prolifera-

tion suggest that NSPCs display immunosuppressive activity without affecting T-cell activation. Cultures in Transwell chambers or addition of NSPC-conditioned medium to activated T cells indicated that part of the suppressive activity was not contact dependent. We therefore searched for soluble factors that mediate NSPC immunosuppression. We found that NSPCs express several immunosuppressive molecules, but the ability of these cells to inhibit T-cell proliferation was only counteracted by heme oxygenase (HO) inhibitors in association or not with nitric oxide synthase inhibitors. Taken together, our findings highlight a dynamic crosstalk between NSPCs and T lymphocytes and provide the first evidence of an implication of HO-1 in mediating the immunosuppressive effects of the NSPCs. *STEM CELLS* 2012;30:2342–2353

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Neural stem/progenitor cells (NSPCs) present therapeutic potential because of their multipotency and their ability to be expanded in vitro, but recent evidence suggests that these cells display immune properties that would also be of great interest for restorative therapies. Indeed, mouse NSPCs implanted beneath the kidney capsule formed stable allografts that continued to thrive for at least 4 weeks, whereas neonatal mouse cerebellar grafts had already been destroyed at that time [1]. Furthermore, porcine NSPCs transplanted into the striatum of immunocompetent rats showed long-term survival as compared to porcine neuroblasts [2, 3]. This long-term survival has been initially attributed to the low expression of molecules implicated in cell-mediated immune recognition such as the major histocompatibility complex or the costimulatory proteins CD40, CD80, and CD86 [1, 2, 4]. However, findings that multipotent cells such as mesenchymal stem cells (MSCs) are highly immunosuppressive [5–7] raise the

possibility that NSPCs actively inhibit the host immune response. Indeed, like MSCs [5–8], NSPCs suppress T-cell proliferation in vitro [9] and attenuate experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) following intravenous injection [9–11]. MSC-mediated immunosuppression has been variously demonstrated to involve IL-10 [6, 12], TGFβ [6, 13], PGE2 [14], indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [15], inducible nitric oxide synthase (iNOS) [16, 17], and the heme oxygenases (HOs) [7]. In this article, we sought to clarify the mechanisms involved in the immunosuppressive effect of rat NSPCs (rNSPC). We demonstrate that the NSPCs modulate T lymphocytes so as to favor CD4⁺ helper T cells to the detriment of CD8⁺ cytotoxic T cells (also known as CTL or killer T cells). In vitro studies show that T-cell suppression by NSPCs is neither secondary to an induction of suppressive regulatory T cells (FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺) nor secondary to a defect in T-cell activation (CD25⁺). Finally, we find that the HOs, alone or in combination with nitric oxide production, constitute a critical pathway used by NSPCs to actively modulate the immune response.

Author contributions: V.B. and E.M.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript; R.T., V.D.-N., and X.L.: collection and assembly of data; P.T., I.A., and B.V.: data analysis and interpretation; I.N. and P.N.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript. V.B., E.M., I.N., and P.N. contributed equally to this article.

Correspondence: Philippe Naveilhan, Ph.D., INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44 093 Nantes Cedex 01, France. Telephone: +33-2-4008-7414; Fax: +33-2-4008-7411; e-mail: Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr Received October 20, 2012; accepted for publication June 22, 2012; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* August 7, 2012. © AlphaMed Press 1066-5099/2012/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.1199

STEM CELLS 2012;30:2342–2353 www.StemCells.com

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

All antibodies used in this study are presented in Table 1.

Preparation of NSPCs

Primary cultures of NSPCs were established from the whole brain of E15 Sprague-Dawley rat embryos as previously described [18, 19]. Briefly, tissues freed of meninges were incubated with 0.5 mg/ml trypsin for 15 minutes at 37°C. Following addition of 10% fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, <http://www.sigmaaldrich.com>), tissues were exposed to 0.1 mg/ml of DNase I prior to mechanical trituration. Aggregates were removed by decantation and cells were further purified from small debris by centrifugation. Cells were resuspended and plated for one night in medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 (1/1, vol/vol), 33 mM glucose, 5 mM HEPES (pH 7.2), 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine and supplemented with 10% FCS (serum-supplemented medium). The next day, the floating cells were recovered, washed, and resuspended in 10 ml of serum-free medium supplemented with N2 (Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint Aubin, F, <http://fr-fr.invitrogen.com>). The cells were then plated in uncoated dishes and expanded as neurospheres for 10 days in the presence of 25 ng/ml basic fibroblast growth factor (b-FGF) with a complete change of the N2 medium after 5 days of culture and addition of b-FGF every 3 days. The neurospheres were then composed of 8.6% of glial fibrillary acidic protein (GFAP⁺) cells and 4% of RIP⁺ cells. No Tuj-1⁺ cell was detected. For adherent condition (Fig. 1F), the cells were plated at a concentration of 2×10^5 cells per square centimeter onto poly(L-ornithine) (50 µg/ml)/laminin (2 mg/ml)-coated culture dishes.

Immunocytofluorescence

After 10 days in vitro, the neurospheres were collected, enzymatically dissociated with trypsin-EDTA, and submitted to mechanical trituration to give a single-cell suspension. Cells were plated at a concentration of 2×10^5 cells per square centimeter onto poly(L-ornithine)-coated glass coverslips in serum-supplemented medium for 2 hours. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature (RT), washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), and incubated for 1 hour at RT in PBS/Triton X-100 medium (PBT)-donkey normal serum (DNS) (1× PBS, 4% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, and 10% DNS). Expression of HO-1 and HO-2 in nestin-expressing NSPCs was detected by performing double immunocytofluorescence as followed. The cells were exposed overnight at 4°C to the monoclonal anti-nestin antibody together with the polyclonal anti-HO-1, anti-HO-2, neuronal form of NOS (nNOS), and iNOS antibodies. After washing, cells were incubated for 2 hours at RT with fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse IgG and Alexa Fluor 568-conjugated anti-rabbit diluted in PBT. Each primary antibody was tested individually with the corresponding secondary antibody. Specificity of the double staining was also controlled by omitting the two primary antibodies or by omitting one secondary antibody. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/3,000) before mounting the cells in an antifading medium (Dako France S.A.S., Trappes, F, <http://www.dako.com>). Analyses were performed using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss, Le Pecq, F, <http://www.zeiss.fr>), and pictures were acquired using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software.

T-Cell Proliferation Assays

Part of this protocol has been extensively described in [19].

Preparation of T cells. T cells were purified as previously described [20]. Briefly, T cells from Sprague-Dawley rat spleens

Table 1. Antibodies used in the study

Clone	Antigen	Concentration	Source
T-cell isolation			
OX42	CD11b/c (monocytes)	0.5 µg/ml	ECCC, Salisbury, UK
3.2.3	NKR-P1A (NK cells)	0.7 µg/ml	ECCC
HIS24	CD45R (B cells)	1 µg/ml	BD Pharmingen, San Diego, CA
T-cell stimulation			
G4.18	CD3	5 µg/ml	BD Pharmingen
JJ319	CD28	5 µg/ml	Kindly provided by T. Hüning (University of Würzburg, Germany)
Flow cytometry			
OX35-PECy7	CD4	0.3 µg/ml	BD Pharmingen
OX8-PE	CD8	1 µg/ml	BD Pharmingen
OX39-PE	CD25 (IL-2R α chain)	1 µg/ml	BD Pharmingen
OX39-Alexa 647	CD25 (IL-2R α chain)	0.6 µg/ml	Bioatlantic, Nantes, France
R73-Alexa 488	αβ TCR	0.85 µg/ml	Bioatlantic, Nantes, France
FoxP3-APC	FoxP3	5 µg/ml	eBioscience, San Diego, CA
Immunocytofluorescence			
Rat 401	Nestin	1 µg/ml	DSHB, Iowa City, IA
	HO-1	3.3 µg/ml	StressGen, Kampenhout, B
	HO-2	4 µg/ml	StressGen
	nNOS	0.7 µg/ml	Enzo Life Sciences, Exeter, UK
	iNOS	0.5 µg/ml	BD Transduction Laboratories
Characterization of NSPCs			
TUJ	βIII-tubulin (neurons)	1 µg/ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO
RIP	Oligodendrocytes	3.8 µg/ml	DSHB
	GFAP (Astrocytes)	2 µg/ml	Sigma-Aldrich
Secondary antibodies			
Goat	Anti-mouse FITC IgG	1.5 µg/ml	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Donkey	Anti-rabbit Alexa-568	2 µg/ml	Invitrogen

Abbreviations: DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank; ECCC, European Collection of Cell Culture; GFAP, glial fibrillary acidic protein; iNOS, inducible nitric oxide synthase; nNOS, neuronal form of NOS; RIP.

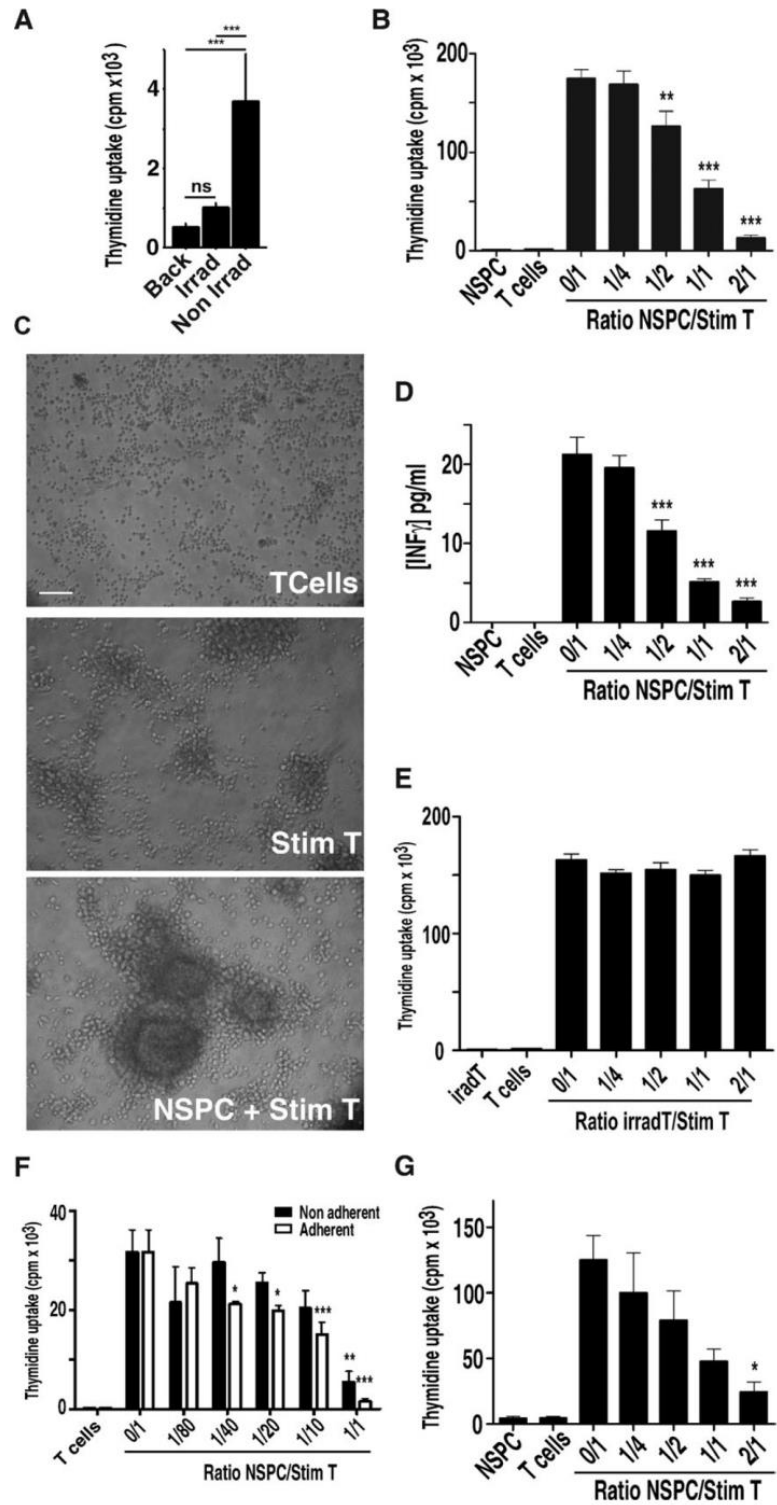


Figure 1. Impact of NSPCs on T-cell proliferation and function. (A): Control of the irradiation efficiency (irrad) on NSPC proliferation. (B): [³H]thymidine uptake in stimulated T/irradiated NSPC cocultures (direct contact) (*n* = 17). (C): Micrographs of unstimulated T cells (T cells), stimulated T cells (StimT), and NSPC/Stim T cocultures (direct contact). (D): IFN-γ production in stimT/irradiated NSPC cocultures (direct contact; *n* = 3). (E): [³H]thymidine uptake in stimT/irradiated T-cell cocultures (direct contact; *n* = 3). (F): Effect of adherent and nonadherent NSPCs on T-cell proliferation. Stars on the top of the column correspond to statistical differences with stimulated T cells cultured without NSPCs (0:1 ratio). (G): [³H]thymidine uptake by T cells in irradiated NSPC/stimT cocultures (Transwell; *n* = 3). Data are expressed as mean values ± SEM; *, *p* < .05; **, *p* < .001; ***, *p* < .0001. Scale bar = 50 μm. Abbreviation: NSPC, neural stem/progenitor cell.

Table 2. Oligonucleotide sequences and amplicon sizes

Region	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)
Rat HPRT	TTCCTCCTCAGACCGCTTTT	CTTATAGCCCCCTTCAGCA	262
Rat HO-1	CCACAGCTCGACAGCATGTC	GTTTCGCTCTATCTCCTCTTCCA	195
Rat HO-2	CACCACTGCACTTTACTTCA	AGTGCTGGGGAGTTTATGTG	331
Rat nNOS	ACAGCGACAATTTGACATCCA	AGGCGGTTGGTCACTTCATAC	441
Rat iNOS	GACCAAACTGTGTGCCTGGA	TACTCTGAGGGCTGACACAAGG	220
Rat NPY	TGGACTGACCTCGCTCTATC	AGCAAGTTTCATTTCCTATCAC	283
Rat Y1	ATGGACAAAATCAGGGACAGTAAG	CACAAAAGCAGTAAACCCAACA	569
Rat Y2	TGTGCGTGGTAGTGGTGTGTTG	ATTGTTCTTTTGTACTCCAGGTTT	296
Rat Y5	CAGAAAGCACAGAAGGAGGTACAG	CGGCGAACACGAGTATCAGTAT	287

Abbreviations: HO, heme oxygenase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; nNOS, neuronal form of NOS; NPY, neuropeptide Y.

were prepared by depletion of natural killer (NK) cells, B cells, and monocytes using anti-NKR-P1A, anti-CD45R, and anti-CD11b/c monoclonal antibodies (mAbs), respectively, followed by anti-mouse IgG-coated Dynabeads (Invitrogen). For polyclonal stimulation, T cells were incubated with 5 μ g/ml anti-CD28 antibody in flat-bottomed 96-well plates previously coated with anti-CD3 (5 μ g/ml; 2 hours at 37°C) except for adherent conditions (Fig. 1F) for which the anti-CD3 was directly added to the medium.

NSPC/T-Cell Cocultures. Polyclonally stimulated purified T cells (10^5 cells per well) together with irradiated (30 Gy) or nonirradiated rNSPCs (2.5×10^4 ; 5×10^4 ; 1×10^5 ; 2×10^5 cells per well) were seeded in triplicate in 96-well flat-bottomed culture plates and cocultured for 3 days in (1:1) N2 medium/Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 5% heat-inactivated FCS, 1% nonessential amino acids, 5 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 1 μ M 2-ME. After 3 days of cocultures, 9.12% (10.3% in case of cell irradiation) of the cells was GFAP⁺ and 2.75% (3.26% in case of cell irradiation) was RIP⁺. No Tuj-1-expressing cell was found. In one set of experiments, NSPCs were replaced by irradiated T cells to control cell specificity.

Transwell Assays. Polyclonally stimulated purified T cells (4×10^5) were placed in the lower chamber of a 24-well cell culture insert companion plate (Falcon, BD Biosciences, San Diego, CA, <http://www.bdbiosciences.com>) and cultured for 3 days with irradiated (30 Gy) or nonirradiated NSPCs (10^5 ; 2×10^5 ; 4×10^5 ; 8×10^5 cells per well) seeded in the upper chamber.

Effect of NSPC-Conditioned Medium. NSPCs were cultured in N2 medium as described above. The supernatants were collected everyday from day 0 to day 5. Fifty microliters of supernatant sample was added to 50 μ l of polyclonally stimulated purified T cells (10^5 cells per well). Stimulated T cells were plated and cultured for 3 days in 96-well flat-bottomed culture plate.

Tritiated Thymidine Incorporation Assays. Proliferation was determined by addition of [³H]thymidine (0.625 μ Ci per well, PerkinElmer, Boston, MA, <http://www.perkinelmer.com>) for the last 12 hours of culture. Cells were harvested on fiberglass filters using a harvester (Tomtec, Hamden, CT, <http://www.tomtec.com>) and radioactivity was measured by standard scintillation technique.

Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester-Based Proliferation Assays. Purified T cells were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 5 μ M (3 minutes at RT). The cells were washed three times with serum-supplemented medium and cultured in direct contact (see NSPC/T-cell cocultures) or in Transwell (see Transwell assays) with NSPCs. Proliferation of

CFSE-labeled T cells was investigated by flow cytometry. A Canto cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, <http://www.bdbiosciences.com>) was used to measure fluorescence and data were analyzed using with FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, <http://www.treestar.com/>).

Lymphocyte Inhibition Assay

The mechanisms underlying the immunosuppressive effects of NSPCs were characterized by treating the cocultures (one T cell for two irradiated or nonirradiated NSPCs) for 3 days with recombinant human interleukin-2 (IL-2, 100 U/ml), human neuropeptide Y (NPY) or human peptide YY (PYY) (10^{-8} M, Sigma-Aldrich), anti-TGF β blocking mAb 2G7 (50 μ g/ml, ECCC, European Collection of Cell Culture, Salisbury, UK, <http://www.hpacultures.org.uk>), 1-methyl-DL-tryptophan (1-MT) (200 μ M, Sigma-Aldrich), indomethacin (10 μ M, Sigma-Aldrich), ketoprofen (50 μ M, Sigma-Aldrich), or L-NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 1.25 mM, Sigma-Aldrich). The implication of HO was determined by pretreating the NSPCs with 50 μ M of tin protoporphyrin (SnPP; Frontier Scientific, Logan, UT, <http://www.frontiersci.com>) for 2 hours before the setting of cocultures. [³H]thymidine incorporation was assessed at day 3.

Cytokine Production Assay

The release of IFN- γ in the supernatants was assessed by ELISA using a kit from R&D Systems (catalog number: DY585; R&D Systems Europe, Lille, F, <http://www.rndsystems.com>) according to the manufacturer's instructions. Culture conditions are described in the subsection NSPC/T-cell cocultures.

RNA Analysis

RNA Extraction and Retrotranscription. Stimulated T cells, NSPCs cultured for 10 days as neurospheres, or stimulated T cells cocultured with NSPCs for 3 days were disrupted in Trizol reagent (Invitrogen) and homogenized using syringe and needle according to the manufacturer's specifications. Potential genomic DNA contamination was removed by treatment with Turbo DNase (Ambion Inc., Austin, TX). RNA was quantified using ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, <http://www.nanodrop.com>) and RNA integrity was determined on agarose gel. cDNA was synthesized from 5 μ g of total RNA using the Moloney Murine Leukemia Virus reverse-transcriptase kit (Invitrogen) as previously described [21] and diluted to a final concentration of 100 ng cDNA/ μ l.

Quantitative PCR. Analyses of the transcripts were performed with a GenAmp 7700 sequence detection system (AB, Life Technologies SAS, Saint Aubin, F, <http://fr-fr.invitrogen.com>) using SYBR Green PCR core reagents (AB). Oligonucleotide sequences are listed in Table 2. The PCR method and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantification method, after normalization to HPRT values, have been previously described [22]. The mRNA expression level is defined as

www.StemCells.com

the fold change in mRNA levels in a given sample relative to levels in a calibrator—in this case, RNA from splenocytes and brain (50:50). The mRNA expression level is calculated as follows: mRNA expression level = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = (C_{t(\text{Target})} - C_{t(\text{HPRT})})_{\text{sample}} - (C_{t(\text{Target})} - C_{t(\text{HPRT})})_{\text{CB}}$. Specific amplifications were checked by amplicon melting curves (Table 2).

Flow Cytometry Analysis

T-cell phenotype was determined by incubating the cells with OX35 (CD4)-PECy7, OX39 (CD25)-PE, and R73 (panT)-Alexa Fluor 488 or OX8(CD8)-PE, OX39(CD25)-Alexa Fluor 647, and R73 (pan T)-Alexa Fluor 488 for 20 minutes at 4°C. Cells were then fixed for 15 minutes at 4°C with 2% PFA and washed with PBS/FCS/sodium azide medium (PFN; 1× PBS, 2% FCS, and 0.1% sodium azide). Membrane permeabilization was induced by incubating the cells with PBS/FCS/saponin medium (PFS) (1× PBS, 0.2% FCS, and 0.5% saponin) for 15 minutes at 4°C prior to the incubation with anti-Foxp3-APC for 1 hour. After washing the cells three times with PFN, fluorescent labeling was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software.

Statistics

Data are expressed as mean values $\pm$ SEM of at least three independent experiments performed in duplicate or triplicate. Statistical analyses were performed using the one-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc tests. *, $p < .05$; **, $p < .001$; ***, $p < .0001$.

RESULTS

NSPCs Inhibit T-Cell Proliferation Through Soluble Factors

To decipher the immunosuppressive effects of rNSPCs, their impact on T-cell proliferation was tested. As simultaneous stimulation of the T-cell receptor complexes (TCR/CD3) and the costimulatory receptor CD28 activates T cells, purified rat T cells derived from spleens were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 mAbs and cocultured for 3 days with increasing number of irradiated (30 Gy) NSPCs. Absence of NSPC proliferation was checked by [³H]thymidine uptake (Fig. 1A). [³H]thymidine was added for the last 12 hours of culture. Stimulating effect of anti-CD3/anti-CD28 mAbs was confirmed by a strong increase of [³H]thymidine incorporation in treated T cells as compared to untreated T cells (Fig. 1B). Culture of activated T cells with NSPCs inhibited significantly [³H]thymidine uptake since 27%, 64%, and 93% decrease was observed at NSPC/T-cell ratios of 1:2, 1:1, and 2:1, respectively. This effect was not due to the coverage of the bottom plate by NSPCs since our culture conditions favor the formation of neurosphere-like clusters that are mostly floating (Fig. 1C). Similar dose-dependent inhibition was obtained when Concanavalin-A, a non-TCR-mediated mitogenic stimulus, was used (data not shown). As T-cell activation also induces the release of cytokines, we investigated by ELISA the concentration of IFN- γ released in the media after 3 days of culture in presence or absence of NSPCs. As shown in Figure 1D, the production of IFN- γ was strongly impaired by the presence of NSPCs and the inhibition was closely dependent on the NSPC/T-cell ratio. The immunosuppressive effect of NSPCs on T cells was specific since irradiated T lymphocytes did not inhibit the proliferation of activated T cells (Fig. 1E). To evaluate the impact of culture conditions on NSPC properties, cells obtained from the same preparation were grown as neurospheres or as adherent cells and placed with activated T lymphocytes. Both adherent and nonadherent NSPCs were ca-

pable of inhibiting the proliferation of stimulated T cells. As presented in the Figure 1F, the effect increased with the number of adherent NSPCs and statistical differences were observed from a ratio of one NSPC per 40 stimulated T cells. A dose-dependent effect was also observed for nonadherent NSPCs; however, statistical differences were only observed at the ratio of one NSPC for one stimulated T cells, probably due to the large variations in thymidine uptake observed in this particular condition. Importantly, for a given ratio, we did not find statistical differences between adherent and nonadherent NSPCs. The next step was to determine whether NSPC-mediated immunosuppression required cell-cell contact. Transwell experiments showed that even separated by a porous membrane of 0.4 μ m, NSPCs inhibited T-cell proliferation (Fig. 1G). This observation indicates that a part of the inhibitory effect of NSPCs on T-cell proliferation is mediated by soluble factors.

Immunosuppressive Effect of NSPCs is Not Due to the Inhibition of T-Cell Activation or to the Induction of Regulatory T Cells

To decipher the mechanisms responsible for NSPC-mediated immunosuppression, T lymphocytes were characterized by flow cytometry using specific mAbs. T cells were identified with R73, an antibody directed against the TCR, whereas T-cell subsets such as helper and cytotoxic/suppressor T cells were characterized using antibodies directed against the cell surface antigens CD4 and CD8, respectively. T-cell activation was monitored by assessing the expression of the IL-2 receptor alpha subunit (CD25).

Flow cytometry analyses indicate efficient T-cell activation as 100% of the cells was CD25⁺ after 3 days of treatment with anti-CD3/CD28 mAbs (Fig. 2A). No significant difference in the percentage of CD25-expressing T cells was observed in absence or presence of NSPCs indicating that NSPCs did not inhibit CD25 induction (Fig. 2A). This observation suggests that T-cell activation is not a direct target of NSPC-mediated immunosuppression. The second point was to control potential changes in the proportion of helper (CD4⁺) and cytotoxic (CD8⁺) T cells. In absence of NSPCs, only 37% of the T cells was CD4⁺ while in presence of two NSPCs for one T cell, 70% of the T cells was CD4⁺ cells (Fig. 2B). This increment paralleled a diminution in the percentage of CD8⁺ cells (Fig. 2C) and led to an increase in the CD4/CD8 ratio from 0.63 (stimT cells) to 1.63 (two NSPCs for one stimT cell). Variations in the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ cells among the CD25⁺ population were similar (Fig. 2E, 2F). This result was not surprising since nearly all T cells treated with anti-CD3/CD28 mAbs expressed this T-cell activation marker even in the presence of NSPCs (Fig. 2A). The higher proportion of CD4⁺ T cells in presence of NSPCs prompted us to control for a possible involvement of suppressive regulatory T cells (also known as FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg) in NSPC-mediated suppressive activity. To this end, expression of the Treg marker FoxP3 was assessed by flow cytometry. Analyses did not reveal significant differences in the percentage of FoxP3⁺ cells among the CD4⁺ T-cell subset in the presence or absence of NSPCs (Fig. 2D, 2G). These data suggest that the suppressive effect of NSPCs is not mediated through the induction of regulatory T cells.

The HO Is Implicated in the NSPCs-Mediated Immunosuppression

Since maximal inhibition of T-cell proliferation was obtained at a ratio of two NSPCs for one stimulated T cell, this ratio was used for all subsequent in vitro experiments, unless

STEM CELLS

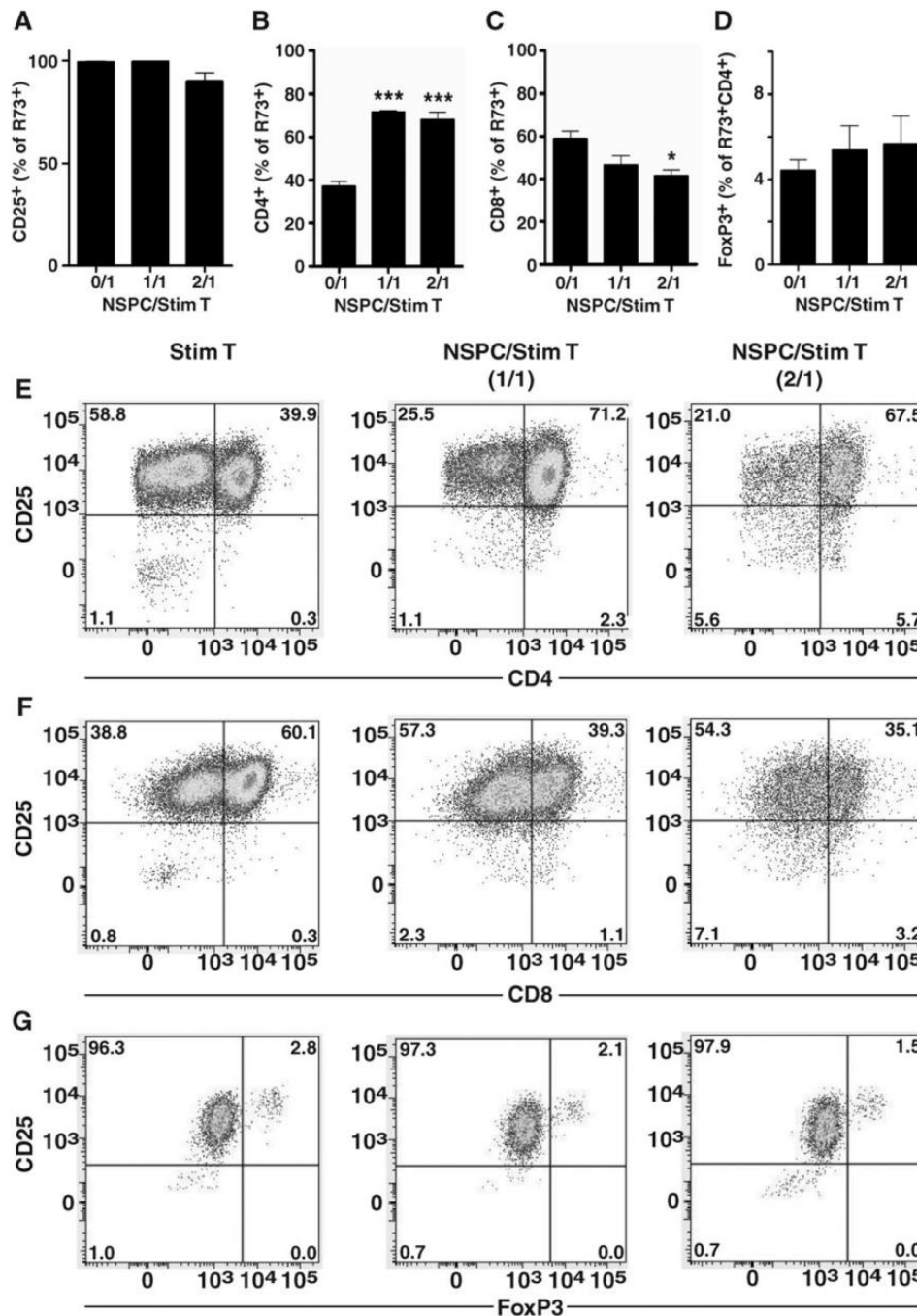


Figure 2. Characterization of stimulated T cells upon incubation with NSPCs. Flow cytometry was performed at day 3 to assess the impact of NSPCs on the expression of (A) CD25 (IL-2R α , T-cell activation marker), (B) CD4 (T-Helper), (C) CD8 (T cytotoxic) by R73⁺ T cells, and (D) to analyze their effect on the proportion of R73⁺/CD4⁺ T cells expressing CD25 and FoxP3 (regulatory T cells). (E--G): Representative flow cytometry dot plots. Number in the corner of each quadrant corresponds to the percentage of the corresponding cell population. Data are expressed as mean values $\pm$ SEM; *, $p < .05$; ***, $p < .0001$. Abbreviation: NSPC, neural stem/progenitor cell.

specified. Before analyzing the implication of various molecules of interest in T-cell suppression, we sought to verify whether the inhibition of T-cell proliferation could be reversed by the administration of IL-2. For this purpose, stimulated T cells cultured in the presence of NSPCs were

incubated for 3 days with 100 U/ml of recombinant human IL-2. As indicated by [³H]thymidine incorporation, IL-2 failed to rescue T-cell proliferation (Fig. 3A), suggesting that NSPC-treated T cells were not in a state of anergy. The next step was to determine which molecules expressed by NSPCs

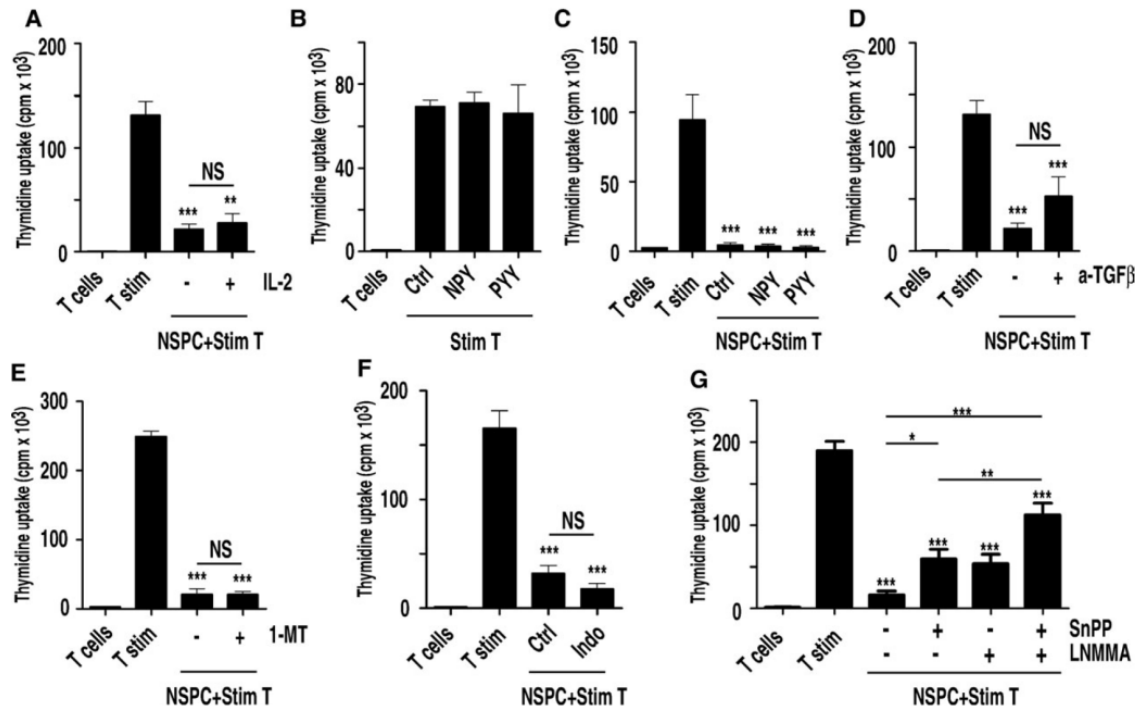


Figure 3. Probing the molecular mechanisms of NSPC-mediated T-cell suppression. NSPCs and T cells were treated for 3 days with (A) hIL-2, (B, C) NPY or PYY, (D) anti-TGF β -blocking mAb, (E) 1-MT, and (F) indomethacin (INDO). (G): The implication of heme oxygenase and NO in NSPC-mediated T-cell suppression was investigated by pretreating NSPCs with SnPP and/or by treating NSPC/T-cell cocultures with L-NMMA. Stars on the top of the column correspond to statistical differences with stimulated T cells (T stim). Data are expressed as mean values $\pm$ SEM; *, $p < .05$; **, $p < .001$; ***, $p < .0001$. Abbreviations: L-NMMA, L-NG-monomethyl-L-arginine; 1-MT, 1-methyl-D,L-tryptophan; NPY, neuropeptide Y; NSPC, neural stem/progenitor cell; PYY, peptide YY.

might interfere with the proliferation of stimulated T cells. We first checked the impact of NPY, a neuropeptide that regulates innate and adaptive immune response [23]. NPY and the related peptide PYY mediate their function through four different receptors, called Y1, Y2, Y3, and Y5. All of them are cloned except Y3 receptor that preferentially binds NPY over PYY. So, to determine their implication in the suppressive effect of NSPCs, stimulated T cells cultured in absence or presence of NSPCs were treated with NPY (10^{-8} M) or PYY (10^{-8} M). As shown in Figures 3B and 3C, NPY neither inhibited nor rescued T-cell proliferation. The same result was obtained with PYY. This lack of effect could be explained by the absence of the main NPY receptors in T cells. Indeed, none of the transcripts coding for Y1, Y2, and Y5 were detected in naïve or polyclonally stimulated rat T cells although NPY mRNA was clearly expressed by these cells in both conditions (data not shown). To assess a potential role of TGF β -1 in the immunosuppressive effect of NSPCs, cocultures were treated with the blocking mAb 2G7. An increase in [3 H]thymidine incorporation was observed following the addition of the mAb 2G7, but the difference between treated and untreated cells was not statistically significant (Fig. 3D). Similarly, treatment of the cells with 1-MT, a specific inhibitor of the IDO, did not reverse the inhibitory effect of NSPCs on T-cell proliferation (Fig. 3E), indicating that full activity of this enzyme is not essential for the immunosuppressive properties of NSPCs. We also tested the potential implication of prostaglandins using nonselective inhibitors of the cyclooxygenases 1 and 2 (COX1 and COX2). However, neither indomethacin (Fig. 3F) nor ketoprofen (data not shown) was able to rescue T-cell proliferation.

Finally, we examined the potential involvement of NOS and HO, which have both been implicated in several mechanisms of immunosuppression. For this purpose, the cells were treated with L-NMMA, a nonselective inhibitor of NOS, or with SnPP that irreversibly binds and inactivates HO enzymatic activity [24]. Pretreatment of NSPCs with SnPP significantly altered their immunosuppressive effect as a 3.7-fold increase in T-cell proliferation was observed following treatment with this HO inhibitor (Fig. 3G). Interestingly, this increase was enhanced by exposing the cells to L-NMMA. Indeed, a 6.9-fold increase in T-cell proliferation was observed when the cocultures were treated by both L-NMMA and SnPP (Fig. 3G). To confirm the expression and regulation of NOS and HO in our cultures, total RNA from NSPCs, stimT, or NSPC/stimT cocultures were collected and analyzed by quantitative PCR (Q-PCR). As illustrated in Figure 4A, the inducible (HO-1) and constitutive (HO-2) forms of HO were both expressed in NSPCs and stimulated T cells, but only the inducible form showed a dramatic increase when both cell types were mixed. Indeed, HO-1 mRNA levels were 15.2- and 10-fold higher in cocultures as compared to monocultures of NSPCs or stimulated T cells, respectively. NOS showed also differential expression according to the culture conditions. While the nNOS was clearly expressed by NSPCs and not by stimulated T cells, a 4.7-fold decrease in nNOS mRNA levels was observed when both cell types were mixed. Conversely, the inducible form of NOS (iNOS) that showed a very low expression in NSPCs was strongly upregulated in NSPCs/stimT cocultures (22.2-fold increase). These results suggest a dynamic crosstalk between NSPCs and T lymphocytes that favors the transcription of HO-1 and iNOS.

STEM CELLS

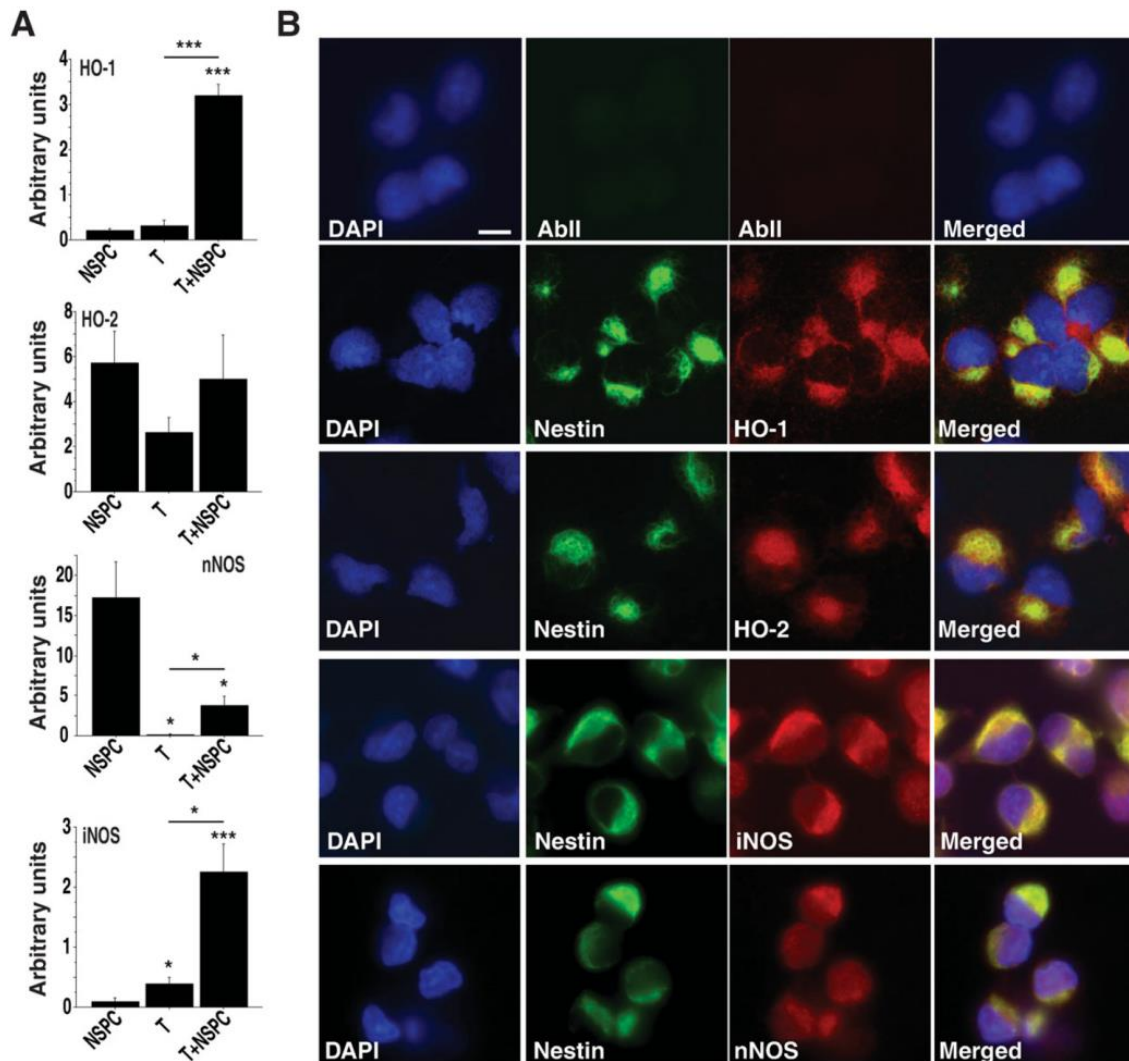


Figure 4. Analyses of HO and NOS expression (A): Quantitative analyses of HO and NOS transcripts. Total RNAs were prepared from NSPCs (NSPC), stimT (T), or stimT/NSPC cocultures (two NSPCs for one T cell) to analyze by quantitative real-time PCR the levels of HO1, HO-2, nNOS, and iNOS mRNA. Stars on the top of the column correspond to statistical differences with monocultures of NSPCs ($n = 3$). (B): NSPCs express HO and NOS proteins. NSPCs were double stained using anti-nestin mAb together with Abs against HO-1, HO-2, iNOS, and nNOS. The immunostaining was revealed with FITC (green) or Alexa Fluor 568 (red)-coupled secondary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Micrographs are from one representative experiment out of three. Data are expressed as mean values $\pm$ SEM; *, $p < .05$; ***, $p < .0001$. Scale bar = 10 μ m. Abbreviations: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; HO, heme oxygenase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; nNOS, neuronal form of NOS; NSPC, neural stem/progenitor cell.

Expression of HO-1 and HO-2, nNOS, and iNOS by NSPCs was confirmed at the protein level by performing double immunocytofluorescence using anti-HO-1, HO-2, nNOS, or iNOS antibodies, together with an antibody raised against nestin, an intermediate filament expressed by NSPCs (Fig. 4B).

Finally, impact of the irradiation on NOS and HO expression was evaluated by Q-PCR. We found no significant difference in the levels of iNOS, nNOS, and HO-2 transcripts between nonirradiated and irradiated NSPCs, but an upregulation of HO1 mRNA (1.26 ± 0.54 vs. 32.02 ± 8.15 , $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $p < .05$, $n = 3$) was observed 24 hours after irradiation. This observation prompted us to control the effect of nonirradiated NSPCs on the proliferation of stimulated T cells. In Figure 5A, we show that nonirradiated NSPCs cocultured with stimu-

lated T cells were able to inhibit their proliferation in a dose-dependent manner. We also demonstrate that medium conditioned by nonirradiated cells inhibited efficiently the proliferation of stimulated T cells. The effect was correlated to the length of the conditioning period (Fig. 5B). The last point was to confirm involvement of the HO pathway in mediating the immunosuppressive effect of nonirradiated NSPCs. For this purpose, T cells were labeled with CFSE and cocultured with nonirradiated NSPCs. As shown in Figure 5C, a partial restoration of T-cell proliferation (43% of stimT) was observed after treatment of NSPCs with SnPP. This effect was even stronger in Transwell coculture systems (100% of stimT) (Fig. 5D). This high efficiency might be partially explained by the lower expression of HO-1 in nonirradiated

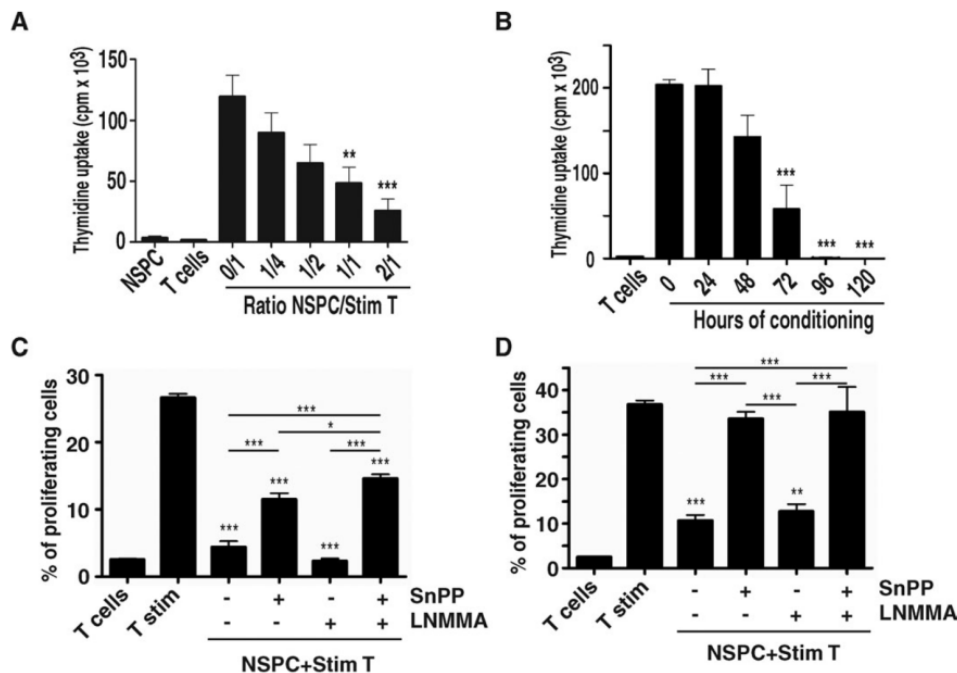


Figure 5. Immunosuppressive effects of nonirradiated NSPCs. (A): [³H]thymidine uptake in stimT/NSPC cocultures (direct contact) ($n = 3$). (B): [³H]thymidine uptake by stimulated T cells after addition of conditioned medium prepared from nonirradiated NSPC culture ($n = 3$). (C, D): The implication of HO and NO in NSPC-mediated T-cell suppression was investigated by pretreating nonirradiated NSPCs with SnPP and/or by treating nonirradiated NSPC/T-cell cocultures with L-NMMA. The impact was evaluated using carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferation assay (C: direct contact; D: Transwell). Stars on the top of the column correspond to statistical differences with stimulated T cells (T stim). Data are expressed as mean values $\pm$ SEM; *, $p < .05$; **, $p < .001$; ***, $p < .0001$. Abbreviations: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; L-NMMA, L-NG-monomethyl-L-arginine; NSPC, neural stem/progenitor cell.

NSPCs as compared to irradiated NSPCs. Regarding NOS, the main point is little (Contact, Fig. 5C) or absence (Transwell, Fig. 5D) of effect of L-NMMA/SnPP cotreatment on nonirradiated NSPCs which contrasts with their complementary effect on irradiated cells. This discrepancy may be due to the strong efficiency of SnPP treatment on nonirradiated NSPCs (Fig. 5C, 5D).

DISCUSSION

Initially thought to replace lost neuronal population in case of neurodegenerative diseases, NSPCs are now considered for their immunosuppressive properties, exhibiting long-term survival in the brain of xenogenic host [2, 3] and improving the course of autoimmune diseases [9-11, 25]. In an attempt to decipher the mechanisms underlying their immunomodulatory effects, the impact of rNSPCs was evaluated on anti-CD3/CD28-stimulated rat T lymphocytes. In this study, we show that rNSPCs inhibit T-cell immune response in a dose-dependent manner, as reflected by impairment of IFN- γ secretion and T-cell proliferation. The immunosuppressive activity is specific and not due to cell irradiation since irradiated T cells did not produce such an effect and nonirradiated NSPCs also inhibited T-cell proliferation. Furthermore, the efficiency of NSPCs to inhibit the proliferation of concanavalin-A-stimulated lymphocytes indicated that NSPCs could also suppress T-cell response to TCR-independent polyclonal stimuli. We also asked whether inhibition of T-cell proliferation by NSPCs might result from their interference on T-cell activa-

tion. However, no inhibition of the T-cell activation marker CD25 was detected and administration of IL-2 did not rescue T-cell proliferation. Such an observation is in agreement with the fact that other multipotent cells such as MSCs display immunosuppressive activity without affecting T-cell activation [26]. Conversely, as MSCs have been shown to exert part of their immunoregulatory effects through expansion of regulatory T cells [27-29] and as increased percentage of CD4⁺/CD25⁺ T cells was observed in presence of NSPCs, we searched for a potential increase in the number of CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ T cells in NSPC/T-cell cocultures. Flow cytometry analyses did not reveal any significant increase in the percentage of CD25⁺/FoxP3⁺ cells among the CD4-positive T-cell subset, indicating that the suppressive effect of NSPCs was not due to the induction of regulatory T cells.

In vitro analyses rather support a direct impact of NSPCs on T-cell proliferation through the release of soluble factors. Indeed, the suppressing effect has been also observed using Transwell coculture system or after the addition of NSPC-conditioned media to stimulated T cells. In 2003, Klassen et al. reported an expression of TGF β -1 in rNSPCs grown as a monolayer in laminin-coated flasks [30]. This study confirmed the presence of TGF β transcripts in rNSPCs grown as floating neurospheres. Since TGF β is a multifunctional cytokine with immunosuppressive effects on T cells in vitro [31], blocking anti-TGF β antibodies were added to the cocultures. However, inefficiency of the treatment to reverse T-cell inhibition suggested a minor role of TGF β in NSPC-mediated immunosuppression. As NPY suppresses EAE in mice [32] and modulates various immune responses via Y1 receptors [33], a potential involvement of this neuropeptide in

STEM CELLS

mediating the suppressive effect of NSPCs was considered. Such an implication was, then again, unlikely since NPY did not affect naïve or polyclonally stimulated rat T cells, probably due to the lack of at least three NPY receptors in these cells. An effect through IDO was another alternative as this enzyme, which displays immunosuppressive activity through the depletion of tryptophan coupled with the production of kynuric metabolites, has been identified as a key mediator of MSC-mediated immunosuppression [15, 34]. Induction of IDO in NSPC/T-cell cocultures came in support of such a hypothesis but treatment with 1-MT, a specific IDO inhibitor, was unable to restore T-cell proliferation. Similarly, indomethacin or ketoprofen did not rescue T-cell proliferative response indicating that PGE2 are most probably not involved in the immunosuppressive activity of rNSPCs in contrast to what has been reported with the NSPC-like cell line C17.2 [35].

In fact, our data point out a role for HO in mediating the immunosuppressive activity of rNSPCs as inhibition of the activity of these enzymes with SnPP restored T-cell proliferation. A role for HO in mediating the immunosuppressive activity of rNSPCs is in agreement with growing evidence of anti-inflammatory and immunosuppressive impact of HO-1 [36, 37]. Indeed, the long-term survival of cardiac xenograft in concordant models has been associated with the local production of HO-1 by endothelial and smooth muscle cells [38, 39] while HO-1 overexpression in allogeneic models of transplantation was shown to inhibit chronic and acute rejection by reducing leukocyte infiltration [40, 41]. Finding that NSPCs inhibit T-cell proliferation and function through HO-1 activity extends the immunosuppressive role of this enzyme to neural stem cells and raises the possibility that HO-1-expressing NSPCs actively modulate adaptive immune response in case of intracerebral transplantation. The long-term survival of porcine NSPCs in the rat striatum [2, 3] supports such a hypothesis and interestingly, HO-1 was recently reported to mediate the tolerogenic properties of dendritic cells [42]. The mechanism by which HO-1 mediates the immunosuppressive properties of NSPCs remains to be fully determined, but it is believed that heme derivatives such as carbon monoxide (CO) or biliverdin/bilirubin mediate part of HO-1 activity in vitro and in vivo [37, 43-46].

As HO-1 inhibitor only partially reversed the immunosuppressive effect of rNSPCs, we searched for other mechanisms. In particular, we were interested in a potential role of NOS since cocultures of NSPC with stimulated T cells triggered an upregulation of iNOS. A possible involvement of NOS in NSPC-mediated immunosuppression was supported by the fact that NO mediates part of the immunosuppressive activity of macrophages [47, 48], but also by the observation that induction of iNOS in macrophages by T-cell-derived IFN- γ is a basal mechanism that limits the proportion of lymphocytes in inflammatory infiltrates [47]. We did find such an induction as well as a downregulation of nNOS in NSPC/T-cell cocultures. These findings are of great interest since an upregulation of iNOS mRNA by cytokines has been previously associated with a primary inhibition of basal NO production and a downregulation of nNOS [49-51]. As NO displays an inhibitory effect on the activation of NF κ B, a key regulator of iNOS gene, the downregulation of nNOS, and the subsequent decrease in the basal level of NO are thought to be critical for the induction of iNOS gene, constituting an emergency system to guarantee a strong increase of NO production. Another interesting point relative to NO induction is the crosstalk between NO and CO pathway [52]. Indeed, NO donors induce the upregulation of HO-1 in cells such as endothelial or smooth muscle cells [53-55]. The possibility that NO contribute to T-cell inhibition through HO-1 is one possibility, and interestingly, we observed more proliferating T

cells when NSPCs were treated with both HO and NO inhibitors and placed in direct contact with activated T cells. This observation suggests an implication of NOS pathway in the immunosuppressive effect of NSPCs, even though its specific contribution remains to be clearly defined. Indeed, sole treatment with NO inhibitor had no significant effect, and addition of L-NMMA to SnPP-treated NSPCs did not provoke further increase in the number of proliferating T cells in Transwell cocultures. This absence of effect is probably due to the strong efficiency of HO inhibitor in Transwell cocultures as NSPC-mediated immunosuppression was completely reverted by SnPP pretreatment in such conditions. Such a strong effect emphasizes the critical role of HO and indicates that heme degradation byproducts (i.e., CO and biliverdin/biliverdin) are key players on the immunosuppressive activity induced by soluble factors. Conversely, the partial effect of SnPP treatment in contact conditions suggests the involvement of other molecules such as membrane bound proteins, in the NSPC-mediated immunosuppression.

While many believe that stem cells will find the most use to replace lost cells and escape host immune response because of their low immunogenicity, our present data provide support for an active role of NSPCs in modulating the immune response [56]. These observations go along with growing evidence showing that other stem cells such as MSCs and embryonic stem cells exert immunosuppressive effects and favor the induction of tolerance [26, 57-59]. Here, we show that immunosuppression triggered by NSPCs occurs for a minimum of one NSPC for two activated T cells, which ratio is quite high as compared to MSCs. The difference may be due to the fact that NSPCs constitute a much more heterogeneous population than MSCs. Indeed, proliferation of fetal brain cells with b-FGF generates a mixed population of neural stem cells and progenitors, and only part of them may exhibit immunosuppressive properties. The difference between NSPCs and MSCs may also be due to the culture conditions. Indeed, MSCs are plated as a monolayer, whereas NSPCs are cultured as neurospheres which may limit the release of immunosuppressive factors. This hypothesis is supported by the fact that a significant immunosuppressive effect is observed for a ratio of one NSPC for 40 activated T cells when NSPCs are plated as a monolayer. The quantity of rNSPCs necessary to induce an immunosuppression in the brain remains to be determined but interestingly, long-term survival of xenogenic NSPCs was observed for an amount of 400,000 porcine NSPCs transplanted in the brain of nonimmunosuppressed rats [2, 3]. This observation is of great interest as porcine and rNSPCs show similar immunosuppressive effect in vitro [3]. An immunosuppressive effect of NSPCs in vivo is also supported by the therapeutic benefit of NSPCs transplanted into a mouse model of chronic EAE [9-11, 25]. It is believed that the beneficial effect of NSPCs is favored by the restricted traffic of T cells in the CNS, the possibility of a local accumulation of NSPC-derived factors, and the ability of NSPCs to migrate to inflammatory areas. Relevance of these observations in human remains to be demonstrated but local immunosuppression with NSPCs could be of great interest in regenerative medicine since immune response has been observed following allotransplantation of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease [60].

CONCLUSION

Whether immunoregulatory activity is a common property of stem cells and whether these cells act through similar

mechanisms remain to be clarified, but in this study, we show that HO is an important mediator of NSPC immunosuppressive activity. Although other pathways are probably involved, our findings provide the first evidence that expression of HO is a major mechanism for NSPCs to evade the host immune response and exert their immunosuppressive activity.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Dr. P. Brachet and Pr. J.-P. Soullou for their support. We express special thanks to "Etablissement Français du Sang" (EFS, Nantes) that kindly irradiated the NSPCs. Also, we thank Dr. Gareth R. John for critical reading of the manuscript. The nestin antibody obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank was developed by Susan Hockfield

under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA. The work was supported by the "Association Française contre les Myopathies", the "Fédération des Groupements de Parkinsoniens", and Progreffe. V. Bonnamain was supported by a fellowship from the french « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » and Progreffe Foundation. E. Mathieux and X. Lévêque were supported by CECAP, Progreffe, and Centaure Foundations.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Hori J, Ng TF, Shatos M et al. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. *Stem Cells* 2003;21:405–416.
- 2 Armstrong RJ, Harrower TP, Hurelbrink CB et al. Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: Immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience* 2001;106:201–216.
- 3 Michel-Monigadon D, Bonnamain V, Nerrière-Daguin V et al. Trophic and immunoregulatory properties of neural precursor cells: Benefit for intracerebral transplantation. *Exp Neurol* 2011;230:35–47.
- 4 Odeberg J, Piao JH, Samuelsson EB et al. Low immunogenicity of in vitro-expanded human neural cells despite high MHC expression. *J Neuroimmunol* 2005;161:1–11.
- 5 Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42–48.
- 6 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838–3843.
- 7 Chabannes D, Hill M, Merieau E et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;110:3691–3694.
- 8 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1755–1761.
- 9 Einstein O, Karussis D, Grigoriadis N et al. Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:1074–1082.
- 10 Einstein O, Fainstein N, Vaknin I et al. Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann Neurol* 2007;61:209–218.
- 11 Pluchino S, Zanotti L, Rossi B et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 2005;436:266–271.
- 12 Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW et al. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: Relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng* 2006;12:2263–2273.
- 13 Groh ME, Maitra B, Szekely E et al. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005;33:928–934.
- 14 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–1822.
- 15 Meisel R, Zibert A, Laryea M et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619–4621.
- 16 Sato K, Ozaki K, Oh I et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;109:228–234.
- 17 Ren G, Zhang L, Zhao X et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2:141–150.
- 18 Sergeant-Tanguy S, Veziers J, Bonnamain V et al. Cell surface antigens on rat neural progenitors and characterization of the CD3 (+)/CD3 (–) cell populations. *Differentiation* 2006;74:530–541.

- 19 Bonnamain V, Neveu I, Naveilhan P. In vitro analyses of the immunosuppressive properties of neural stem/progenitor cells using anti-CD3/CD28-activated T cells. *Methods Mol Biol* 2011;677:233–243.
- 20 Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 2008;180:7898–7906.
- 21 David A, Coupel-Claude H, Chetritt J et al. Anti-adenovirus immune responses in rats are enhanced by interleukin 4 but not interleukin 10 produced by recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* 1998;9:1755–1768.
- 22 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–408.
- 23 Wheway J, Herzog H, Mackay F. NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. *Curr Top Med Chem* 2007;7:1743–1752.
- 24 Kappas A, Drummond GS. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J Clin Invest* 1986;77:335–339.
- 25 Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003;422:688–694.
- 26 Ramasamy R, Tong CK, Seow HF et al. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol* 2008;251:131–136.
- 27 Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P et al. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol* 2008;181:3933–3946.
- 28 Maccario R, Podesta M, Moretta A et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516–525.
- 29 Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499–3506.
- 30 Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov II et al. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine* 2003;22:101–106.
- 31 Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986;163:1037–1050.
- 32 Bedoui S, Miyake S, Lin Y et al. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY1 receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J Immunol* 2003;171:3451–3458.
- 33 Wheway J, Herzog H, Mackay F. The Y1 receptor for NPY: A key modulator of the adaptive immune system. *Peptides* 2007;28:453–458.
- 34 Jones BJ, Brooke G, Atkinson K et al. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: A role for mesenchymal stem cells. *Placenta* 2007;28:1174–1181.
- 35 Wang L, Shi J, van Ginkel FW et al. Neural stem/progenitor cells modulate immune responses by suppressing T lymphocytes with nitric oxide and prostaglandin E2. *Exp Neurol* 2009;216:177–183.
- 36 Willis D, Moore AR, Frederick R et al. Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 1996;2:87–90.
- 37 Sato K, Balla J, Otterbein L et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 2001;166:4185–4194.
- 38 Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1 in organ transplantation. *Front Biosci* 2007;12:4932–4945.
- 39 Soares MP, Lin Y, Anrather J et al. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 1998;4:1073–1077.

- 40 Bouchet D, Chauveau C, Roussel JC et al. Inhibition of graft arteriosclerosis development in rat aortas following heme oxygenase-1 gene transfer. *Transpl Immunol* 2002;9:235–238.
- 41 Braudeau C, Bouchet D, Tesson L et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther* 2004;11:701–710.
- 42 Moreau A, Hill M, Thebault P et al. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J* 2009;23:3070–3077.
- 43 Pae HO, Oh GS, Choi BM et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2004;172:4744–4751.
- 44 Song R, Mahidhara RS, Zhou Z et al. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol* 2004;172:1220–1226.
- 45 Yamashita K, McDaid J, Ollinger R et al. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J* 2004;18:765–767.
- 46 Haga Y, Tempero MA, Zetterman RK. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro cytotoxic T lymphocyte activity of human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1996;1317:65–70.
- 47 Albina JE, Abate JA, Henry WL, Jr. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN- γ in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J Immunol* 1991;147:144–148.
- 48 Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG et al. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 1998;160:5729–5734.
- 49 Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M et al. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 1995;270:26731–26733.
- 50 Togashi H, Sasaki M, Frohman E et al. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2676–2680.
- 51 Perez-Rodriguez R, Roncero C, Olivan AM et al. Signaling mechanisms of interferon gamma induced apoptosis in chromaffin cells: Involvement of nNOS, iNOS, and NFkappaB. *J Neurochem* 2009;108:1083–1096.
- 52 Hartsfield CL. Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:301–307.
- 53 Hartsfield CL, Alam J, Cook JL et al. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997;273:L980–988.
- 54 Polte T, Abate A, Dennerly PA et al. Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1209–1215.
- 55 Durante W, Kroll MH, Christodoulides N et al. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1997;80:557–564.
- 56 Bonnamain V, Neveu I, Naveilhan P. Neural stem/progenitor cells as a promising candidate for regenerative therapy of the central nervous system. *Front Cell Neurosci* 2012;6:17.
- 57 Trigona WL, Porter CM, Horvath-Arcidiacono JA et al. Could heme-oxygenase-1 have a role in modulating the recipient immune response to embryonic stem cells? *Antioxid Redox Signal* 2007;9:751–756.
- 58 Fandrich F, Lin X, Chai GX et al. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 2002;8:171–178.
- 59 Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726–736.
- 60 Krystkowiak P, Gaura V, Labalette M et al. Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease. *PLoS One* 2007;2:e166.



See www.StemCells.com for supporting information available online.

Discussion

Cette étude avait pour but de caractériser certains des mécanismes impliqués dans l'effet immunosuppresseur des CSPN de rat.

Pour étudier les interactions entre des CSPN de rat et des lymphocytes T allogéniques, une co-culture est réalisée. Les CSPN sont cultivées sous forme de neurosphères pendant 10 jours puis dissociées et ajoutées en suspension à une culture de LT activés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 durant 3 jours. Une dose-réponse est réalisée en ajoutant des quantités croissantes de CSPN irradiées avec une dose de 30 grays qui bloque leur prolifération (figure 1a). La prolifération des LT est évaluée en ajoutant à J-12 heures de la thymidine tritiée. Les résultats indiquent que les CSPN inhibent d'une manière dose-dépendante la prolifération des LT activés (figure 1b). Cet effet n'est pas dû à un possible recouvrement des LT par les CSPN qui empêcherait leur prolifération, car des clusters de LT en contact rapproché avec les CSPN sont clairement observés (figure 1c). Cet effet inhibiteur est spécifique des CSPN car des cellules T irradiées n'inhibent pas la prolifération de LT activés (figure 1e). L'effet immunosuppresseur des CSPN sur les LT est confirmé par l'inhibition dose-dépendante de la sécrétion d'IFN γ (figure 1d). Contrairement aux CSM de rat qui inhibent la prolifération des LT à un ratio 1 CSM pour 20 LT (Ye et al., 2008), les CSPN de rat n'ont un effet significatif qu'à partir d'un ratio de 1 CSPN pour 2 LT activés. Cette faible efficacité peut être le fait que les neurosphères sont constituées de 10 à 20% de cellules souches neurales (Reynolds and Weiss, 1996), le reste étant des cellules progénitrices, des précurseurs et des cellules neurales différenciées (Galli et al., 2003). Si seules les cellules souches neurales ont des propriétés immunosuppressives, leur efficacité au sein des neurosphères est sous-estimée d'un facteur 10 et elles auraient au final une efficacité comparable aux CSM. Effectivement, les progéniteurs neuronaux dérivés de CSM ont été décrits comme possédant la même capacité que les CSM à supprimer la prolifération des cellules T *in vitro* (Harris et al., 2012b). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de purifier les CSPN mais des marqueurs extracellulaires spécifiques des cellules souches neurales n'ont pas encore été caractérisés. En condition adhérente, une lignée de CSPN murine inhibe la prolifération des LT activés pour un ratio de 1/80 (Wang et al., 2009). Nous avons donc comparé les deux méthodes de culture. Des CSPN de rats cultivées en monocouche grâce à un coating de laminine et de poly-l-ornithine, inhibent la prolifération

des LT à un ratio CSPN/LT de 1/40 mais aucune différence significative entre les cultures adhérentes et non adhérentes n'a pu être relevée, probablement en raison des fortes variations de l'incorporation de thymidine (figure 1f). L'effet immunosuppresseur n'est pas dû à l'irradiation des CSPN car des CSPN non irradiées inhibent également la prolifération des LT (figure 5a).

Pour déterminer si l'effet immunosuppresseur des CSPN était dû à l'inhibition de l'activation des LT, le marqueur d'activation CD25 (sous-unité α du récepteur à l'IL-2) a été analysé par cytométrie de flux. Tous les LT stimulés par les anticorps anti-CD3/anti-CD28 expriment CD25, même en présence de CSPN (figure 2a). L'effet immunosuppresseur des CSPN ne passe donc pas par le blocage de l'activation des LT. C'est également le cas pour les CSM (Glennie et al., 2005; Ramasamy et al., 2008). L'addition d'IL-2 ne déjouant pas l'action immunosuppressive des CSPN (figure 3a), l'absence de prolifération des LT n'est pas due à l'induction d'un état d'anergie. En revanche, l'analyse des sous populations CD4/CD8 indique une forte proportion de LT CD4⁺ en présence de CSPN, alors que ce sont les LT CD8⁺ qui sont majoritaires en absence de CSPN (figure 2b/e, 2c/f). La présence de CSPN favoriserait donc l'apparition de LT CD4, une tendance également observée pour les CSM (Maccario et al., 2005; Ye et al., 2008). Ce résultat nous a conduit à étudier l'éventuelle augmentation de la population CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺, qui correspond à des LT régulateurs. Aucune augmentation de la proportion des LT CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ n'a été observée en présence de CSPN (figure 2d/g), indiquant que l'effet immunosuppresseur des CSPN ne dépend pas de l'induction de LT régulateurs.

Pour déterminer si l'effet immunosuppresseur des CSPN est dépendant d'un contact cellulaire, les expériences de co-cultures sont réalisées en transwell. Les CSPN et les cellules T sont séparées d'une barrière semi-perméable ne laissant passer que les molécules solubles. La présence de cette membrane semi-perméable n'empêche pas les CSPN d'inhiber la prolifération des LT activés (figure 1g), suggérant un rôle déterminant des facteurs solubles. Cette donnée est confirmée par l'effet suppresseur de milieux conditionnés par des CSPN non irradiées (figure 5b). Ces résultats confortent les résultats d'une précédente étude réalisée avec des CSPN porcines (Michel-Monigadon et al., 2011). Il est à noter que l'effet en transwell semble moins fort que l'effet par contact direct. Une implication des contacts cellulaires n'est donc pas totalement à exclure.

Les potentiels médiateurs de l'action immunosuppressive des CSPN ont alors été étudiés en utilisant des inhibiteurs spécifiques ou des anticorps bloquants. Bien que les CSPN de rat expriment TGF β 1 en condition adhérente (Klassen et al., 2003), l'addition de l'anticorps anti-TGF β 1 ne contrecarre pas l'effet suppresseur des CSPN sur la prolifération des LT, indiquant que cette cytokine anti-inflammatoire n'est pas impliquée. Une éventuelle implication du neuropeptide Y, un immunomodulateur puissant du système inné et adaptatif (Bedoui et al., 2003), d'IDO ou des prostaglandines n'est pas constatée (figure 3b-f). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Wang et al., sur une lignée murine de CSPN qui mettaient en avant un rôle des prostaglandines (Wang et al., 2009).

En revanche, un traitement des CSPN avec un inhibiteur de l'hème oxygénase 1 (HO-1), le SnPP (tin protoporphyrin), restaure partiellement la prolifération des LT activés placés en contact direct avec les CSPN. Un co-traitement avec un inhibiteur non spécifique des NOS double cet effet (figure 3g). Ces résultats indiquent une implication de l'enzyme HO-1 dans l'activité immunosuppressive des CSPN de rat, avec une contribution possible de la voie NOS/NO. Il est à noter qu'un traitement par le SnPP restaure 100% de la prolifération des LT activés cultivés en transwell avec des CSPN non irradiées de rat (figure 5d). Cette restauration complète ne permet pas de mettre en évidence une éventuelle implication de NOS. L'effet plus important de HO-1 peut être le fait d'une plus forte expression de la molécule par les cellules non irradiées que irradiées.

L'hème oxygénase est une enzyme qui catalyse la dégradation oxydative de l'hème en monoxyde de carbone (CO), fer et biliverdine, elle-même réduite en bilirubine connue pour son rôle antioxydant. HO existe sous trois isoformes. La forme inducible HO-1 est présente dans toutes les cellules mais dans des conditions physiologiques, son niveau d'expression est faible. HO-2, HO-3 sont des isoformes constitutifs exprimés dans divers tissus dont le SNC (Ryter et al., 2006). Dans les co-cultures CSPN/ LT, une sur-régulation du transcrit HO-1 est observée alors que le niveau de HO-2 ne varie pas (figure 4a). La co-localisation de HO-1 et HO-2 avec la nestine indique que ces molécules sont bien exprimées par les CSPN (figure 4b). L'enzyme HO-1 peut être induite suite à un stress physique ou chimique. Elle va alors exercer un rôle protecteur car elle possède des propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et immunosuppressives (Ryter et al., 2006). En effet, HO-1 et son catabolite CO ont été décrits pour leurs capacités à augmenter la survie de xénogreffe cardiaque (Sato et al., 2001; Soares et al., 1998), ou d'allogreffe pulmonaire (Song et al., 2003). L'activation de la voie HO-1/CO entraînerait une inhibition de la prolifération des cellules T (Pae et al., 2004;

Song et al., 2004). Selon Chora et al., HO-1 par l'intermédiaire du CO empêcherait l'accumulation, la prolifération et l'activité des cellules T dans un modèle de sclérose en plaques (Chora et al., 2007). La biliverdine pourrait aussi intervenir car cette molécule inhibe la prolifération des LT et réduit l'infiltration leucocytaire lors d'allogreffes cardiaques (Yamashita et al., 2004). Les mécanismes entourant l'action de HO-1 ne sont pas encore totalement définis mais il a été montré que HO-1 intervenait dans l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques (Chauveau et al., 2005) et dans l'activité immunosuppressive des cellules dendritiques tolérogènes (Moreau et al., 2009). Il serait alors intéressant de regarder si les CSPN exercent leur potentiel immunomodulateur sur les cellules dendritiques par l'intermédiaire de HO-1. En effet, Pluchino et al., ont montré que les CSPN inhibaient la maturation des cellules dendritiques et leur fonction présentatrice d'antigènes par l'intermédiaire de BMP-4 (bone morphogenetic protein) (Pluchino et al., 2009b).

Le monoxyde d'azote est, pour sa part, une molécule gazeuse qui à haute concentration inhibe la prolifération des LT (Albina et al., 1991; Krenger et al., 1996), la sécrétion de cytokines et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Granger and Kubes, 1994; Kubes et al., 1991). NO est catalysé par les NOS dont il existe 3 types : iNOS inducible, nNOS neuronale et eNOS endothéliale. Dans nos expériences, nous observons une expression constitutive des transcrits nNOS par les CSPN qui diminue dans les co-cultures de CSPN/LT activés. La forme iNOS est au contraire très faiblement exprimée par les CSPN mais une augmentation des transcrits se produit dans les co-cultures (figure 4a). Ceci est probablement lié au fait que nNOS régule l'expression d'iNOS. L'expression constitutive de nNOS permet un niveau basal de NO qui inhibe l'activation de la voie de NFκB et donc l'expression d'iNOS. Suite à une inflammation, une inactivation de nNOS se produit. La diminution consécutive de NO permet la translocation de NFκB au noyau et l'induction du gène iNOS, augmentant ainsi la production de NO (Colasanti et al., 1995; Pérez-Rodríguez et al., 2009; Togashi et al., 1997). La voie d'iNOS/NO ne permet pas à elle seule d'inhiber la prolifération des cellules T mais son action optimise le mécanisme immunosuppresseur de HO-1. En effet, lors de l'inhibition des NOS, nous n'observons pas de restauration significative de la prolifération des cellules T mais lorsque l'on utilise les deux inhibiteurs, l'effet restaurateur est augmenté. A propos de cet effet, il est à noter que le NO pourrait activer la synthèse de HO-1 et favoriser la production de CO (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997).

Les CSPN de rats ont donc, via HO-1 et dans une moindre mesure via NOS/NO, un effet immunosuppresseur sur les LT activés en inhibant leur prolifération. Cette propriété est un des arguments en faveur de l'utilisation des CSPN en transplantation, mais également dans d'autres pathologies cérébrales à composante inflammatoire. Il serait d'ailleurs intéressant d'étudier l'expression d'HO-1 et son impact dans différentes lésions ou désordres cérébraux. Des études plus complètes sont encore nécessaires pour caractériser l'ensemble des mécanismes impliqués dans les effets immunosuppresseurs des CSPN. En effet, les études avec les CSPN de porc n'ont pas révélé une implication de HO-1 (Michel-Monigadon et al., 2011). Ceci suggère une disparité entre les espèces comme ce peut être le cas pour les CSM. L'impact des CSPN sur d'autres cellules immunes comme les cellules dendritiques, les cellules B et les cellules NK serait également un très bon sujet d'étude pour mieux comprendre le devenir et l'intérêt des CSPN en transplantation.

Bien que les CSPN d'origine fœtale aient des propriétés intéressantes pour les thérapies restauratrices, leur utilisation reste limitée en raison de véritables problèmes éthiques. C'est pourquoi, il est important de s'intéresser à d'autres sources de CSPN que sont les iPSC.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

**Etude préliminaire de l'action
immunosuppressive de cellules
souches/progénitrices neurales
dérivées de cellules souches
pluripotentes induites humaines**

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) découvertes en 2006 sont apparues comme une source cellulaire novatrice pour la transplantation intracérébrale. Leur production par la reprogrammation de cellules somatiques adultes de souris (Takahashi and Yamanaka, 2006) puis humaines (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) ouvre la possibilité de s'affranchir des problèmes éthiques liés à l'utilisation de tissus fœtaux d'origine humaine. Ces cellules pluripotentes qui présentent des caractéristiques similaires à celles des cellules souches embryonnaires permettraient même des autotransplantations. Les cellules dérivées de ces iPSC ont démontré leur fonctionnalité lors de transplantation dans des modèles de maladie de Parkinson (Cai et al., 2010; Chang et al., 2010; Rhee et al., 2011; Swistowski et al., 2010; Wernig et al., 2008), de lésions de la moelle épinière (Fujimoto et al., 2012; Nori et al., 2011; Tsuji et al., 2010) ou d'AVC (Gomi et al., 2012; Jensen et al., 2011; Mohamad et al., 2013; Oki et al., 2012; Yuan et al., 2013). Leur utilisation dans des études précliniques est semble t'il déjà d'actualité (Emborg et al., 2013; Kobayashi et al., 2012). Pourtant, un travail important reste à faire pour optimiser leur différenciation et éviter la survenue de tératomes.

Un autre paramètre important à prendre en compte est l'immunogénicité de ces cellules et de leurs dérivés. A ce jour, on sait que les iPSC sont rejetées plus facilement que les CSE lors de greffes dans la peau de souris syngéniques (Zhao et al., 2011). Dans l'optique d'utiliser des cellules souches neurales dérivées d'iPSC (iCSN), nous avons étudié le potentiel immunosuppresseur de CSN dérivées de 3 lignées d'iPSC humaines : NSCp09 FSc03p31, NSCp09 4603c27p47, NSCp11 4603c28p50, nommées selon la nomenclature suivante : NSCp le passage des cellules souches neurales, Fs/4603 le type de fibroblastes utilisés pour faire les iPSC, c le numéro de clone et p le passage du clone lors de la différenciation en CSN.

Ces cellules nous ont été fournies par le Pr Monville du laboratoire I-STEM (Evry). Les cellules sont décongelées etensemencées à 50000 cellules/cm² en condition adhérente grâce à un coating de poly-ornithine (0.0017%) et de laminine (2 µg/ml). Elles sont cultivées dans un milieu DMEM F12/Neurobasal supplémenté en B27, N2, FGF2 (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml) et BDNF (20 ng/ml). Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à confluence.

Afin d'observer les interactions des iCSN avec les cellules immunes, une réaction lymphocytaire mixte est réalisée. Pour cela, les iCSN sont placées en adhérence dans des plaques de 96 puits et cultivées avec des PBMC (peripheral blood mononuclear cells) répondeuses stimulées par des PBMC issues de différents donneurs et irradiées à 35 grays. Les PBMC sont isolées de sang humain par gradient de ficoll et reprises dans un milieu RPMI

avec 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline and 0.1 mg/ml streptomycine et 5% de SVF décomplémenté. Les co-cultures sont effectuées dans un mixte (50/50) des milieux des deux types cellulaires. Les PBMC répondeuses sont marquées avec 5 μ M de CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester). Dans notre protocole, 10^5 PBMC répondeuses et 10^5 PBMC stimulatrices irradiées sont cultivées avec une quantité croissante d'iCSN durant 6 jours. La prolifération des PBMC est analysée par cytométrie de flux.

Pour deux des trois lignées, nous observons une inhibition de la prolifération des PBMC pour des quantités assez faibles d'iCSN. Ce qui est surprenant, c'est que pour des ratios iCSN/PBMC de 1/100 à 1/20 pour l'une (c27) et 1/10 à 1/1 pour (c28), on observe une inhibition de la prolifération qui n'est plus visible pour des ratios plus importants (1/4, 1/2) (**figure 35**). Nous constatons une évolution inverse de la dose-réponse par rapport aux expériences avec les CSPN de rat.

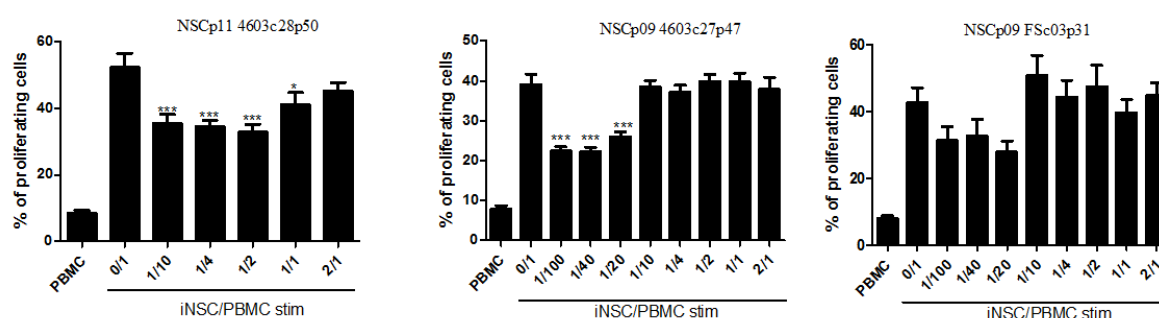


Figure 35 : Etude dose-réponse de la prolifération de PBMC humaines en présence d'une quantité croissante de CSN dérivées d'iPSC. Les PBMC répondeuses marquées au CFSE sont stimulées avec des PBMC allogéniques irradiées et co-cultivées avec des quantités croissantes d'iCSN. La prolifération est analysée par cytométrie de flux. Le résultat est exprimé en pourcentage de cellules qui ont proliféré durant les 6 jours de culture. N = 5. Test statistique : Anova une voie suivie du test de comparaison multiple de Dunnett (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.0001$, par rapport à la condition PBMC stimulées).

Afin de savoir si l'inhibition des PBMC par les iCSN fait intervenir un facteur soluble, des surnageants de culture préparés à partir des trois lignées des iCSN cultivées à confluence ont été testés sur des PBMC stimulées. La prolifération a été analysée au sixième jour de culture après avoir ajouté à J-12h de la thymidine tritiée. Les résultats montrent un effet inhibiteur des trois milieux conditionnés (**figure 36**).

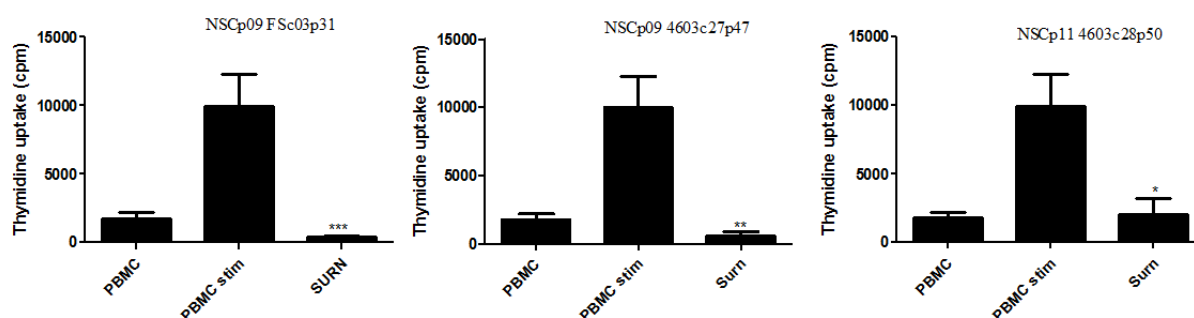


Figure 36 : Analyse de la prolifération des PBMC en présence de surnageant de culture des iCSN. Les PBMC répondeuses sont stimulées avec des PBMC allogéniques irradiées et cultivées avec ou sans surnageant de culture d'iCSN. La prolifération des PBMC est observée par incorporation de thymidine tritiée. N=3. Test statistique : Anova une voie suivie du test de comparaison multiple de Dunnett (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; ***: $p < 0.0001$, par rapport à la condition PBMC stimulées).

Cet effet est observé jusqu'à une dilution du surnageant au quarantième (1/40) sauf pour une lignée (c27) pour laquelle l'effet n'est plus significatif au delà d'une dilution au 1/10. (Figure 37).

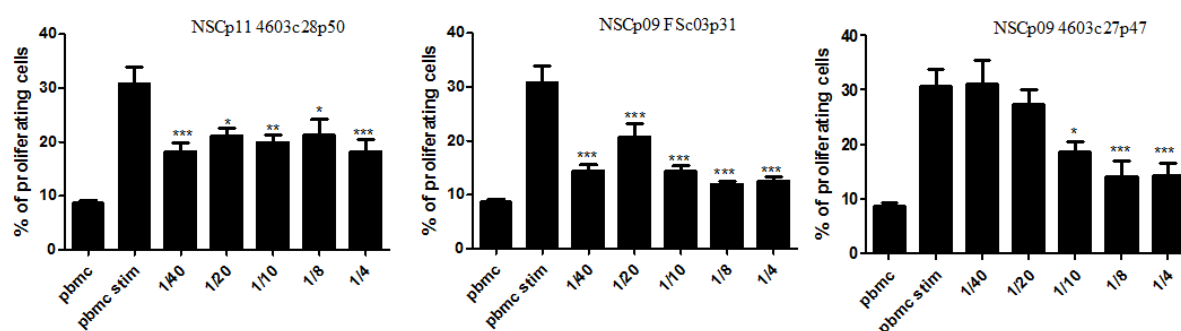


Figure 37 : Analyse dose-réponse de l'effet de surnageant de culture d'iCSN sur la prolifération des PBMC. Les PBMC répondeuses marquées au CFSE sont stimulées avec des PBMC allogéniques irradiées et cultivées avec des concentrations croissantes de surnageant de culture d'iCSN. La prolifération est analysée par cytométrie de flux. N = 3. Test statistique : Anova une voie suivie du test de comparaison multiple de Dunnett (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.0001$, par rapport à la condition PBMC stimulées).

L'effet inhibiteur des iCSN sur la prolifération des PBMC humaines s'effectuerait vraisemblablement par l'intermédiaire de facteurs solubles. Il serait intéressant de confirmer

ce résultat en effectuant des co-cultures en transwell. Ces résultats très préliminaires suggèrent un rôle immunosuppresseur des iCSN. Un travail plus approfondi est maintenant nécessaire pour déterminer les mécanismes de cette inhibition, en caractérisant notamment les cibles et les molécules médiatrices. Un autre point important serait d'étudier si une fois différenciées, les iCSN possèdent toujours des propriétés immunosuppressives. A ce propos, il est à noter que très peu de microglie/macrophages, de lymphocytes ou d'astrocytes activés ont été détectés 6 mois après la transplantation de progéniteurs neuronaux dérivées d'iPSC de singe dans le cerveau de singes lésés par le MPTP (Emborg et al., 2013). Une autre perspective serait de comparer les CSN dérivées d'iPSC avec celles dérivées de cellules souches embryonnaires (CSE). Les CSN dérivées de CSE ont pour leur part été décrites comme capables d'entraîner une réponse immune proliférative suite à une stimulation par de l'IFN γ (Preynat-Seauve et al., 2009). Liu et al., ont, quant à eux, démontré que les CSN dérivées de CSE humaines réduisaient la prolifération des PBMC répondeuses stimulées par des PBMC allogéniques (Liu et al., 2013a).

Ces études comparatives nous permettraient de savoir si les iNSC ont un réel avantage d'un point de vue immunologique pour les envisager en transplantation intracérébrale.

ARTICLE 3

IgG response to intracerebral xenotransplantation: specificity and role in the rejection of porcine neurons

E. Mathieux, V. Nerrière-Daguin, X. Lévêque, D. Michel-Monigadon, V. Bonnamain, S. Ménoret, I. Anegon, P. Naveilhan* and I. Neveu*

Article en révision dans *American Journal of Transplantation*.

Introduction

Les xénogreffes intracérébrales de cellules mésencéphaliques porcines conduisent inexorablement à un phénomène de rejet au bout de 5-7 semaines. Ce rejet est dû, au moins en partie, à une réponse immune cellulaire caractérisée par une infiltration du greffon par des cellules dendritiques, des cellules microgliales activées/macrophages et des cellules T (Michel et al., 2006; Rémy et al., 2001) avec un rôle central des LT CD4 (Wood et al., 1996). L'utilisation d'immunosuppresseurs ciblant la réponse cellulaire, comme la cyclosporine A (inhibition de la réponse T) (Brundin et al., 1989; Larsson et al., 2001a) ou la minocycline (inhibition de l'activation microgliale) (Michel-Monigadon et al., 2010) n'a permis que d'allonger transitoirement la survie des xénogreffes et il est alors possible que d'autres réponses immunes contribuent au rejet des greffes intracérébrales.

L'Homme et certains primates non humains possèdent naturellement des xénoanticorps dirigés contre l'épitope carbohydrate Gal α 1,3 Gal présent à la surface des cellules d'autres espèces comme le porc (Galili, 1993; Galili et al., 1984, 1993; Sandrin et al., 1993). Lors d'une xénotransplantation d'organes vascularisés, il se produit une activation du complément et un rejet hyper-aigu qui conduit à la nécrose du greffon en quelques heures (Collins et al., 1995; Dalmaso et al., 1992). Un rejet hyper-aigu n'a jamais été observé en cas de transplantation de neurones xénogéniques dans le cerveau mais une réponse humorale a été suggérée par deux études. En 2000, Barker et al., montrèrent une infiltration d'IgM dans le cerveau et une activation du complément dans les 10 premiers jours post-greffe mais ils ne détectèrent pas d'anticorps spécifiques dans le sang. Le rôle du complément fut relativisé par le fait que sa déplétion ne permettait qu'une survie transitoire de la greffe (Barker et al., 2000). La seconde étude menée par Larsson et al., démontra une augmentation de la survie de xénogreffes mésencéphaliques porcines chez des souris déficientes pour les immunoglobulines (Larsson et al., 1999). Par ailleurs, il est à noter que la déplétion de l'anticorps anti-gal du sérum humain conduit toujours à la lyse des cellules mésencéphaliques porcines, suggérant la présence d'autres xénoanticorps (Harrower et al., 2002; Sumitran et al., 1999b).

Au vu du peu de données sur la réponse humorale, nous nous sommes alors intéressés à son implication dans le rejet d'une greffe intracérébrale de cellules mésencéphaliques porcines.

Pour cela, des cellules du mésencéphale ventral (MV) de foetus porcins à 28 jours de gestation ont été greffées dans le striatum de rats immunocompétents. Les sérums de ces rats ont été récupérés lors de leur sacrifice à 3, 28, 35, 42 et 63 jours post transplantation et classés selon le stade du rejet. Les différents sérums de rat ont été incubés avec des cellules neurales porcines fraîchement isolées ou cultivées durant 5 jours en milieu défini. La présence dans le sérum des rats d'immunoglobulines G ciblant les tissus du cerveau porcine a été révélée par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps FITC dirigé contre le fragment Fc des IgG. Les cibles de ces IgG ont été caractérisées en incubant les sérums avec des astrocytes et des cellules endothéliales d'aorte issus de porc. Des doubles marquages immunocytologiques sur des cultures de cellules neurales porcines ou immunohistologiques sur les greffons, ont également été réalisés avec les anticorps anti-IgG et des anticorps anti-Tuj1 et NeuN pour les neurones et anti-CD44 et GFAP pour les astrocytes. L'implication de la réponse humorale dans le rejet des xénogreffes intracérébrales a directement été testée en transplantant des cellules foetales mésencéphaliques porcines dans le striatum de rats déficients (KO) pour les immunoglobulines. Ces rats ne possèdent plus de niveau détectable de cellules B matures et des différentes classes d'immunoglobulines (Geurts et al., 2009; Ménoret et al., 2010). Les greffes ont été analysées à 63 jours en utilisant les marqueurs TH pour les neurones dopaminergiques, R73 pour les cellules T, pNF70 pour les neurones porcins et OX42 pour les cellules microgliales activées.

ARTICLE

IgG response to intracerebral xenotransplantation: specificity and role in the rejection of porcine neurons

E. Mathieux¹⁻³, V. Nerrière-Daguin¹⁻³, X. Lévêque¹⁻³, D. Michel-Monigadon¹⁻³, V. Bonnamain¹⁻³, R. Buelow⁵, S. Ménoret¹⁻⁴, I. Anegon¹⁻⁴, P. Naveilhan^{1-3*} and I. Neveu^{1-3*}

*** Equal contribution**

1, INSERM, UMR 1064, Nantes, F44000 France

2, CHU de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France

3, LUNAM Université, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

4, Platform Rat TransgenesisIBiSA-CNRS, Nantes, France

5, Open Monoclonal Technologies, Palo Alto, CA.

Corresponding author: Naveilhan P., INSERM UMR 913, 1 rue Gaston Veil01, France, 44035 Nantes cedex

Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr

Phone: +33 (0) 2 40 41 28 86

Running title: IgG response to intracerebral xenograft

Key words: antibodies, xenotransplantation, neural grafts, humoral rejection, knockout

Abbreviations : Th, Thelper; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; HAR, hyperacute rejection; NHP, non human primates; FcγR, Fc gamma receptors; NDS or NGS, normal donkey or goat serum; BSA, bovine serum albumine; PBS, phosphate-buffered saline; kDA, kilodalton; NF, neurofilament; TH, tyrosine hydroxylase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NeuN, neuronal nuclei; FITC, fluorescein isothiocyanate; Fc, crystallizable fragment; E15, embryonic day 15; G28, gestation day 28; PAEC, Pig aortic endothelial cells; U, unit; FCS, fetal calf serum; Tuj-1, β-III tubulin; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; SEM, standard error of the mean; ANOVA, analysis of variance; P, probability; D, day; MIP, macrophage inflammatory protein

The work was supported by the “Fédération des Groupements de Parkinsoniens”: CECAP and Progrefe foundation.

Abstract

Xenogenic fetal neuroblasts are considered as a potential source of transplantable cells for the treatment of neurodegenerative diseases but the immunological barriers limit their use in clinic. Whilst considerable work has been achieved to decipher the role of the cellular immune response in the rejection of intracerebral xenotransplant, there is much still to learn about the humoral reaction. To this end, IgG response to the transplantation of fetal porcine neural cells into the rat brain was analyzed. Rat sera did not contain preformed antibodies against porcine neural cells, but elicited anti-porcine IgG was clearly detected in the host blood once the graft was rejected. Only the IgG1 and IgG2a subclasses were upregulated, arguing for a TH2 immune response. The main target of these elicited IgG antibodies was porcine neurons as determined by double labeling in vitro and in vivo. Complement and anti-porcine IgG were present in the rejecting grafts, suggesting an active role of the host humoral response in graft rejection. This hypothesis was confirmed by the long-term survival of fetal porcine neurons in the striatum of immunoglobulin-deficient rats. These data suggest that the long-term survival of intracerebral xenotransplant relies on the control of both cell-mediated and humoral immune response.

Introduction

Launched in the years 1980 as a potential treatment for neurodegenerative diseases, the transplantation of neural cells into the brain is still the only curative option for disorders such as Parkinson (PD) and Huntington (HD) diseases. Clinical trials between 1990 and 2005 have provided proof-of-principle that human fetal neurons can be transplanted and function into the striatum of patients, thus confirming the results of two decades of animal experimentation (1–3). A direct clinical application was however severely hampered by ethical concerns and shortage of the human fetal tissue. Alternative strategies have therefore to be considered, including the possibility of transplanting stem cells derived from human tissue or neuroblasts isolated from animals like pig (4). Whereas stem cell grafting has to face tumor risk and defective cell differentiation, the transplantation of xenogenic cells in the brain is preempted by a slow but fatal host immune response that leads to the rejection of porcine cells (5,6). Despite the presence of the blood brain barrier and the absence of classic lymphatic drainage in the central nervous system, intracerebral xenografts are targeted by a host cell-mediated immune response which has been well characterized using as a model the transplantation of porcine neuroblasts into the rat striatum. In the absence of immunosuppressors, fetal porcine neurons are rejected within 5-7 weeks. The rejection process is characterized by a strong inflammatory response with extensive activation of microglial cells, and the recruitment of immune effector cells such as T lymphocytes and dendritic cells (7). This late recruitment which coincides with a marked accumulation of transcripts encoding the monocyte chemoattractants MCP-1 (8), suggests an indirect T cell activation initiated by dendritic cells and favoring CD4 T helper cells over CD8 T suppressor cells (9). A central role of CD4 T cells is further supported by the prolonged survival of xenografts after CD4 but not CD8 depletion (10) or in the brain of MHC class II, but not class I-deficient mice (11). Immunosuppressive treatment with cyclosporine A (12–14), methylprednisolone (15) or minocycline (7) also improve the survival of intracerebral xenograft but a major role of cell-mediated immune response does not exclude a critical contribution of the host humoral response which might have been underestimated due to the absence of hyperacute rejection (HAR).

Indeed, vascularized pig organs transplanted in primates are rejected within hours due to pre-existing anti-porcine antibodies in the sera of human and non human primates (NHP). Interactions of these xenoreactive natural immunoglobulins with their primary target, the carbohydrate Gal α 1,3 Gal, on donor endothelial cells, lead to complement activation,

hemorrhage, oedema and intravascular coagulation (16–18). This rapid process called hyperacute rejection (HAR) is not observed after the transplantation of xenogenic neural cells in the brain, probably due to the fact that the graft is not vascularized. Vascularization of the graft occurs within few days but an acute attack is unlikely as the vessels inside the porcine neural grafts are mainly composed of host endothelial cells (19). Contribution of the humoral immune response to the rejection of porcine neural xenograft was suggested by Barker et al., who detected IgM and complement binding in the brain of transplanted rat (20). Although they did not observe a systemic antibody response, a possible contribution of the host humoral reaction must be taken into account as antibodies could affect graft survival when they form immune complexes and recruit cytotoxic effector cells by activating complement or Fc gamma receptors (Fc γ R) (21).

In the present paper, we have transplanted porcine neural cells into the rat striatum to characterize the humoral immune response and evaluate its implication in the rejection of intracerebral xenograft. The data presented herein, indicate that rats do not have pre-existing antibodies directed against porcine neural cells, but their intracerebral transplantation triggers a humoral immune response characterized by the production of specific anti-porcine IgG. These elicited anti-porcine IgG were found within the rejecting grafts but also in the sera of rats that had rejected their transplant. The specific induction of IgG1 and IgG2a isotypes suggests a Th2 immune response, whilst double labeling of cultured cells and xenografted brains reveals that porcine neurons are major target cells for these elicited antibodies. Finally, an active role of the humoral response in the rejection of intracerebral transplantation was demonstrated by the long survival of porcine neural cells in the brain of immunoglobulin-deficient rats.

Materials and Methods

Animals

Porcine fetuses (G28) were obtained from domestic Large White pigs (INRA, Nouzilly, France). Lewis 1A rats were purchased from Janvier CERJ (Le Genest saint Isle, France). The homozygous immunoglobulin deficient rats (IgM KO) were bred and grown in our animal facility (Platform Rat Transgenesis IBSA-CNRS). These IgM KO rats lack detectable immunoglobulins of all isotypes and have virtually absent mature B cells (22,23). Animal manipulations were performed in accordance with the ethical guidelines of the French veterinary service and all procedures were conducted under protocols approved by the Departmental Ethics Committee for animal research. Every effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used.

Stereotaxic implantation of porcine mesencephalic cells into the rat striatum

Porcine mesencephalic cells were prepared from the ventral mesencephalon of G28 fetuses as previously described (24). Rats were anesthetized with an intramuscular injection of 2% Rampun and 50 mg/ml ketamine (1.6 ml/kg) (PanPharma, Fougères, France) and the porcine neural cells were injected into the striatum by stereotaxy at the following coordinates according to the Bregma: anterior +0.7mm, lateral -2.8, ventral -6 and -5.6, incisor bar -3.3, as previously described (25). Each site received 1µl of the cell suspension (2×10^5 cells/µl). Sera were collected weekly or at euthanasia.

Immunohistochemistry

Anesthesia, perfusion of the rats with 4% paraformaldehyde and preparation of the frozen brain sections (16 µm) were as described by Michel et al., (2006) (9). After neutralization of endogenous peroxidase, the brain sections were incubated for 45 min in blocking solution composed of 10% normal donkey or goat serum (NDS, NGS; Sigma) and 4% bovine serum albumine (BSA; Sigma) in PBS. Then slides were exposed to primary antibodies. Porcine neurons were stained using a monoclonal antibody that recognized the 70 kDA porcine neurofilament protein NF70 (clone DP5, 1/500; Dr Denise Paulin, Université Paris 7, France). Dopaminergic neurons were detected with a polyclonal anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (1/1000; Covance, Princeton, NJ). R73 antibody directed against αβ T-cell receptor (European Collection of Cell Culture, Salisbury, UK) and OX42 directed against CD11b integrin were used to identify T cells and microglial cells, respectively. Complement was revealed with an anti-C4d polyclonal antibody (1/500; kindly provided by Dr. BaldwinJohn

Hopkins Medical School, Baltimore, MD). After one night at 4°C, brain sections were incubated with biotinylated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (1/500 in PBS, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK), exposed to the avidin-biotinylated-peroxidase complex and incubated with the vector intense purple substrate or diaminobenzidine (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The brain sections were then dehydrated and mounted with neomount (VWR). Analysis of IgG deposit and double labeling were performed with fluorescent conjugated antibodies. After rehydration in PBS and incubation in blocking solution, the brain sections were exposed to a monoclonal anti-GFAP antibody (1/500; Sigma) that label astrocytes or to a monoclonal anti-NeuN antibody (1/1000; Millipore, Billerica, MA) that label neurons. After one night at 4°C, IgG deposits were detected with FITC-anti-rat IgG (Fc fragment specific, Jackson ImmunoResearch) whereas cell types was revealed with Alexa 568-anti mouse IgG (1/500; Invitrogen, Saint Aubin, France). Slides were mounted in Prolong (Invitrogen).

Cell cultures

Porcine neural cells-Porcine and rat neural cells were prepared from the cortex of G28 porcine fetuses and E15 rat fetuses, respectively, as previously described (26). The cells were plated overnight in serum-supplemented media and then, cultured for 5 days in N2-supplemented medium (Invitrogen). Freshly isolated porcine neural cells were isolated in the same conditions but they were not cultured.

Porcine astrocytes-Porcine astrocytes were established from the cortex of newborn piglet as previously described(26). Astrocytes were grown for 15 days in serum-supplemented media, trypsinized and keep frozen until their use. Only P1 astrocytes were used.

Pig aortic endothelial cells (PAEC)-PAEC were generated as previously described (27,28). Aortas were digested with collagenase (1 U/ml; Boehringer, Mannheim, Germany) then cultured on gelatin-coated tissue culture plates with serum-supplemented medium. Cells were used between passages two and five.

Rat sera analyses

Flow cytometry

Cells were resuspended in PFN (PBS 1X, 2% FCS, 0.1% sodium azide), distributed into 96-well U-bottomed microtiter plates (Nunc). Anti-porcine IgG were detected by incubating the porcine neural cells, the porcine astrocytes or the PAEC with the heat-inactivated rat sera (1/100 in PFN). Revelation was performed with the FITC-anti-rat IgG (1/100 in PFN). Immunoglobulin isotypes were determined by incubating the porcine neural cells with

antibodies directed against rat IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG2c (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Revelation was performed with FITC-anti-mouse IgG (1/100, Jackson). Fluorescent labeling was measured using a Canto cytometer (BD biosciences) and analyzed with the FlowJo software.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, incubated in blocking solution and exposed to heat-inactivated rat sera (1/100 in PBS, 1% BSA). After one night at 4°C, cells were incubated with an FITC-anti-rat IgG (Fc fragment, 1/100, Jackson ImmunoResearch) for 2 h. For the double labeling, cells were fixed with 4% paraformaldehyde after the first labeling, exposed to anti-GFAP (1/500; Sigma) or anti-Tuj-1 (β -III tubulin 1/1000; Sigma) antibodies overnight at 4°C and incubated with Alexa 568-anti mouse IgG for 2 h. After mounting in Prolong with Dapi, labeled cells were observed using an Axioskop microscope and pictures were acquired using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software.

Statistics

Data are expressed as mean values $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post test, two way analysis of variance (Anova) and Mann Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Results

Transplantation of porcine mesencephalic cells into the rat striatum induces a late humoral immune response.

The humoral response to the intracerebral transplantation of xenogenic mesencephalic cells was evaluated by analyzing the IgG subclasses reactive against porcine neural cells. Sera collected at days 3, 28, 42, 63 post-transplantation were incubated with neural cells isolated from the cortex of G28 porcine fetuses and cultured for 5 days in defined medium. After exposure to FITC-anti-rat IgG, the porcine neural cells were analyzed by flow cytometry. As shown on the figure 1.A, a progressive increase in the median fluorescence intensity was observed over time and statistical significance was observed at D42 and D63. This increase was specific as it was not observed using neural cells isolated from the cortex of rat embryos (data not shown). We then correlated the presence of anti-porcine neural cells IgG with the graft status. The graft status was determined by immunohistochemistry using an anti-NF70 antibody that recognizes specifically porcine neurons (NF70) and an anti- $\alpha\beta$ TCR antibody that stains T cells (R73). Indeed, all the grafts were perfectly healthy (no sign of degeneration) with a quite similar appearance in term of volume and NF70 immunostaining (healthy, NF70⁺R73⁻) until the sudden and strong invasion of the graft by numerous T cells (ongoing rejection, NF70⁺R73⁺). The next step is the rapid disappearance of the NF70 staining (rejected, NF70⁻R73⁺) which corresponds to neuronal degeneration. Finally, the T cells completely disappeared and the graft turned into a scar (scar, NF70⁻R73⁻) (Figure S1; Table 1). As illustrated in the Figure 1B, the levels of anti-porcine neural cells antibodies (black bars) were significantly higher in the sera of rats that had already rejected their transplant (rejected and scar groups) as compared to the healthy and rejecting groups. Similar increase was observed when incubating the sera with freshly isolated porcine neural cells (Fig 1B, open bars), however, the median of fluorescence value was much lower than the one obtained with cultured porcine neural cells (47.45 $\pm$ 12.16 vs. 316 $\pm$ 47.89 for the scar group). We then characterized the IgG subclasses induced by the transplantation of porcine neural cells. As expected, low amount of IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c were found in the rat sera collected at D3 post-transplantation (healthy group) (Fig 1C). A higher level of IgG subclasses was found at D63 (scar group) but the difference was only significative for the IgG1 and IgG2a isotypes.

Neurons are the major cell target of the anti-porcine elicited IgG antibodies

Cell specificity of the humoral immune response was investigated by characterizing the cells that bind the anti-porcine antibodies induced by the transplantation of porcine neural cells into the rat brain. Incubation of porcine astrocytes (Fig 2A) or pig aortic endothelial cells (PAEC) (Fig 2B) with the rat sera, generated positive signals on flow cytometry, but the mean fluorescence values were much lower than the value found with the porcine neural cells mostly composed of neurons (over 90%) (Fig 1B): porcine neural cells vs astrocytes: 316 ± 47.89 vs 34.92 ± 8.06 for the scar group; porcine neural cells vs PAEC: 316 ± 47.89 vs 30.79 ± 6.96 for the scar group. Maximum of fluorescence was found at the latest stage (D63, scar group) (Fig 2A and B), as observed for the porcine neural cells (Fig 1B). These observations were confirmed by immunocytochemistry. A strong staining was observed on primary cultures of porcine neural cells when using D63 rat sera whereas control sera (ungrafted rat) gave negative signal (Fig. 3A). A large number of positive cells exhibited a neuronal shape. Neuronal identity of these cells was confirmed by double immunocytochemistry using Tuj-1 antibody that labels the beta III tubulin in neurons. Tuj-1 positive cells were clearly immunostained with D63 rat sera (Fig 3B), and the co-localization was confirmed by confocal microscopy (Fig 3C). To determine if astrocytes expressed antigens that could be recognized by the anti-porcine elicited IgG antibodies, double immunocytochemistry was performed using CD44, an antibody that specifically labeled astrocytes. As shown on the figure 3D, CD44-positive cells were present in the cultures of porcine neural cells, but no colocalization with anti-porcine IgG was observed. Similar results were obtained using anti-GFAP antibodies labeling astrocytes (data not shown).

The humoral immune response was also characterized in vivo by analyzing the deposition of complement and anti-donor antibodies in the rejecting grafts. Using FITC-anti-rat IgG, we detected IgG deposits all over the transplant (Fig. 4A). This was associated with complement activation as evidenced by C4d deposit (Fig 4B). Double immunohistochemistry revealed that IgG deposition was mainly in NeuN-positive neurons (Fig 4C), but a colocalisation was also found in some GFAP-positive cells (Fig 4D).

Rejection is delayed in immunoglobulin-deficient rats

Role of the humoral response in the rejection of intracerebral xenotransplant was investigated by transplanting porcine mesencephalic cells into the striatum of IgM KO rats which lack mature B cells and detectable IgA, IgE, IgG and IgM (22,23). As illustrated in the figure 5, 100% of the IgM KO rats exhibited healthy grafts at D63 post-transplantation whereas 50% of

the wild-type rats had rejected their transplants at this stage (Fig 5A). The healthy grafts in IgM KO rats contained numerous porcine neurons as detected with the anti-pNF70 antibody (Fig 5B). Neurons with dopaminergic phenotypes were also observed as revealed by anti-TH immunostaining (TH, Fig 5C). Infiltration of the grafts by immune cells was evaluated using OX42 and R73 antibodies. As observed in the figure 5D and 5E, very few activated microglial cells and rare R73⁺ cells were present within and around the grafts at day 63 (Fig 5F).

Discussion

In the present paper, we show that the transplantation of porcine neural cells into the striatum of immunocompetent rats induces a specific humoral immune response as demonstrated by the deposition of complement and xenoreactive IgG in the brain parenchyma, and the appearance of elicited anti-porcine IgG in the rat sera.

At early time-points, we did not detect anti-donor antibodies in the rat sera indicating that rats do not produce natural antibodies against porcine neurons, porcine astrocytes or PAEC. This observation is in agreement with the results of Barker et al., who did not find anti-porcine IgM in the sera of transplanted rats up to 10 days post-transplantation (20). At late time-points such as days 42 or 63, we clearly observed anti-donor antibodies in the rat sera but individual analysis revealed that the level of anti-porcine antibodies remained low until the complete rejection of the graft. These results are consistent with previous findings showing that the anti-donor antibodies present within kidney transplants are detected in the peripheral traffic only after rejection of the graft (29,30). Timing of these events suggests that in the brain, the antibodies are trapped inside the graft until its rejection.

The fetal ventral midbrain contains neural precursors, neuroblasts and glioblasts that rapidly differentiate into neurons or glial cells after their transplantation into the striatum. Immunogenicity of these different cell types remains to be clearly determined, but here we show that differentiated neurons are the major target of the anti-porcine IgG induced by the transplantation of porcine mesencephalic neural cells into the rat brain. This statement is supported by the strong binding of elicited IgG to differentiated porcine neurons in culture, and to most pNF70⁺ neurons present in the transplant. In addition, very low binding was observed with freshly isolated porcine neural cells mainly composed of immature neural cells. Staining of the porcine astrocytes is more difficult to interpret as the low but positive staining observed in vitro by FACS was not detected by immunocytochemistry. This discrepancy is probably due to low-affinity or low-concentration of the seric IgG directed against porcine astrocytes, as FACS is more sensitive than immunocytochemistry. Interestingly, IgG deposition was observed in the astrocytes present within the graft but they were few in number. As rat reactive astrocytes could infiltrate the graft (25) and as IgG could be trapped by reactive astrocytes (31), it is difficult to conclude here on this observation, but if rat seric IgG specifically bind to particular porcine astrocytes, then it would be of great interest to characterize their phenotype.

The humoral immune response is specific as only the IgG1 and IgG2a subclasses are significantly increased after the transplantation of VM porcine neural cells into the striatum of immunocompetent rats. In rat, these two isotypes are both controlled by Th2 cytokines, known for their role in mediating the activation and maintenance of the humoral response (32–34). Whether Th2 cytokines are involved in IgG1a and IgG2a upregulation after intracerebral xenotransplantation remains to be determined but 35 days post-transplantation, an increase of IL-10 and TGF β expression was detected at the site graft. Interestingly, this increase was preceded by an upregulation of INF γ (8) (Lévêque et al, submitted). This balance between Th1 and Th2 cytokines is probably necessary for proper control of the cellular and humoral reaction as well must be the IgG1 and IgG2a upregulation. What the functional meaning of IgG1 and IgG2a upregulation is will hopefully be addressed by future investigations, but it is already known that each IgG subclass has a distinct range of potential effector functions. First, rat, mouse and human IgG subclasses have their own properties in term of ability to fix or activate the complement system (35). For instance, rat IgG2a has a lower avidity index than rat IgG1, IgG2b and IgG2c whereas IgG2a-containing complexes display a remarkable complement activating capacity (36). Using chimeric antibodies, Brüggeman et al., show that both rat IgG2b and IgG2c bind C1q, but only rat IgG2b mediates complement (CDC)-dependent cell-mediated cytotoxicity (37). The functional specificity of rat IgG subclasses in the rejection of xenotransplant was emphasized by Miyatake et al., who showed in a model of hamster to rat cardiac xenografts that only some subclasses of elicited IgG were able to induce xenograft rejection in a complement-dependent manner (38). A second particularity of the IgG subclasses is that they bind with varying affinity and specificity to the different Fc γ R (39). For instance, complexed IgG1, IgG2a and IgG2b bind with a low-affinity receptor for the Fc γ RIII whereas the high-affinity Fc γ RI bind IgG2a exclusively (40). This specificity is important as activation of FcR in immune cells initiates a range of biological responses that may contribute to the rejection of porcine neurons, such as phagocytosis, cytolysis and transcriptional activation of inflammatory cytokines. The exact role of IgG1 or IgG2a in the context of intracerebral xenotransplantation is undefined but several observations argue for a role on the macrophages/microglial cells present inside and around the xenografts. First, these cells express stimulatory and inhibitory Fc γ R (41). Second, Fc γ R expression is upregulated in microglial cells under inflammatory conditions (42,43), and upon INF γ stimulation, Fc binding on rat microglial cells is even greater than on their peripheral counterpart (42). Third, immune complexes containing IgG1, IgG2a and IgG3, but not IgG2b,

induce expression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and phagocytosis in human microglial through Fc γ R activation (44). Fourth, incubation of microglial cells with immune complexes induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and oxidative burst (45). Alternatively, IgG1 and IgG2a may act on astrocytes as these cells massively activated in and around the graft at the time of rejection (25), were shown to express Fc γ R and mediate ADCC in vitro (46). Whether the IgG1 and IgG2a elicited in response to intracerebral transplantation of porcine neural cells act via the complement pathway (CDCC) or ADCC remains to be determined but their presence at the graft site together with complement raises the possibility of an active role in the rejection of intracerebral xenograft.

A large number of studies agree on the fact that the cellular immune response is the major component in the rejection of intracerebral neural xenograft (10,11,24). Here, we show that the host humoral response is an important parameter that should not be neglected. Indeed, nine weeks after the transplantation of porcine neural cells into the rat striatum, 50% of the wild-type animals have rejected their transplant whereas all the grafts were healthy in the rats lacking IgA, IgE, IgG and IgM. Our findings is supported by the results of Larsson et al., who observed a longer survival of porcine neural cells in the brain of IgM KO mice as compared to control mice (47). The two models are however quite different since the rejection of neural cells occurred very early in control mice (day 4), as observed when PAEC were transplanted into the striatum of immunocompetent rats (24). Furthermore, the IgM KO mice end up rejecting their graft at four weeks with a CD8 mediated immune response whereas no sign of rejection was observed up to D63 in the Ig-deficient rats. Further experiments would be necessary to determine whether this discrepancy is only due to inter-specie differences, but the long-term survival of xenograft in the brain of Ig-deficient rats argues for a critical role of the host humoral response in the rejection of xenogenic neurons.

In the present paper, we provide the first evidence that neurons are the main target of the IgG immune response to the intracerebral implantation of ventral midbrain cells. We also show that deposition of elicited IgG and complement in the brain parenchyma occurs before the detection of anti-donor antibodies in the sera. The host humoral response is specific as only IgG1 and IgG2a subclasses show significant induction. Taken together, these observations suggest that both cell-mediated and humoral immune response should be controlled to ensure the long-term survival of xenogenic neurons in the brain.

Acknowledgments

E.Mathieux was supported by CECAP and Progreffe foundation.

Disclosure

The authors indicate no potential conflicts of interest.

References

1. Barker RA, Barrett J, Mason SL, Björklund A. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2013 Jan;12(1):84–91.
2. Brundin P, Barker RA, Parmar M. Neural grafting in Parkinson's disease Problems and possibilities. *Prog Brain Res*. 2010;184:265–94.
3. Winkler C, Kirik D, Björklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends in Neurosciences*. 2005 février;28(2):86–92.
4. Lévêque X, Cozzi E, Naveilhan P, Neveu I. Intracerebral xenotransplantation: recent findings and perspectives for local immunosuppression. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Apr;16(2):190–4.
5. Brevig T, Holgersson J, Widner H. Xenotransplantation for CNS repair: immunological barriers and strategies to overcome them. *Trends Neurosci*. 2000 Aug;23(8):337–44.
6. Larsson LC, Widner H. Neural tissue xenografting. *Scand J Immunol*. 2000 Sep;52(3):249–56.
7. Michel-Monigadon D, Nerrière-Daguin V, Lévêque X, Plat M, Venturi E, Brachet P, et al. Minocycline promotes long-term survival of neuronal transplant in the brain by inhibiting late microglial activation and T-cell recruitment. *Transplantation*. 2010 Apr 15;89(7):816–23.
8. Melchior B, Rémy S, Nerrière-Daguin V, Heslan J-M, Soulillou J-P, Brachet P. Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. *J Neurosci Res*. 2002 May 1;68(3):284–92.
9. Michel DC, Nerrière-Daguin V, Josien R, Brachet P, Naveilhan P, Neveu I. Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. *Exp Neurol*. 2006 Nov;202(1):76–84.
10. Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, Charlton HM. Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience*. 1996 Feb;70(3):775–89.

11. Duan W-M, Westerman MA, Wong G, Low WC. Rat nigral xenografts survive in the brain of MHC class II-, but not class I-deficient mice. *Neuroscience*. 2002;115(2):495–504.
12. Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Björklund A. Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res*. 1989;75(1):195–207.
13. Larsson LC, Frielingsdorf H, Mirza B, Hansson SJ, Anderson P, Czech KA, et al. Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp Neurol*. 2001 Nov;172(1):100–14.
14. Pakzaban P, Isacson O. Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience*. 1994 Oct;62(4):989–1001.
15. Duan WM, Brundin P, Grasbon-Frodl EM, Widner H. Methylprednisolone prevents rejection of intrastriatal grafts of xenogeneic embryonic neural tissue in adult rats. *Brain Res*. 1996 Mar 18;712(2):199–212.
16. Collins BH, Cotterell AH, McCurry KR, Alvarado CG, Magee JC, Parker W, et al. Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the alpha-galactosyl determinant in hyperacute rejection. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5500–10.
17. Galili U. Evolution and pathophysiology of the human natural anti-alpha-galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer Semin Immunopathol*. 1993;15(2-3):155–71.
18. Galili U, Anaraki F, Thall A, Hill-Black C, Radic M. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood*. 1993 Oct 15;82(8):2485–93.
19. Harrower TP, Tyers P, Hooks Y, Barker RA. Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2006 Jan;197(1):56–69.
20. Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB. A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2000 May 1;20(9):3415–24.
21. Ravetch JV. A full complement of receptors in immune complex diseases. *J Clin Invest*. 2002 Dec 15;110(12):1759–61.
22. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):433.

23. Ménoret S, Iscache A-L, Tesson L, Rémy S, Usal C, Osborn MJ, et al. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur J Immunol*. 2010 Oct;40(10):2932–41.
24. Rémy S, Canova C, Daguin-Nerrière V, Martin C, Melchior B, Neveu I, et al. Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotransplantation*. 2001 May;8(2):136–48.
25. Michel-Monigadon D, Bonnamain V, Nerrière-Daguin V, Dugast A-S, Lévêque X, Plat M, et al. Trophic and immunoregulatory properties of neural precursor cells: benefit for intracerebral transplantation. *Exp Neurol*. 2011 Jul;230(1):35–47.
26. Sergent-Tanguy S, Chagneau C, Neveu I, Naveilhan P. Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population. *J Neurosci Methods*. 2003 Oct 15;129(1):73–9.
27. Azimzadeh A, Wolf P, Thibaudeau K, Cinqualbre J, Soullillou JP, Anegón I. Comparative study of target antigens for primate xenoreactive natural antibodies in pig and rat endothelial cells. *Transplantation*. 1997 Oct 27;64(8):1166–74.
28. Charreau B, Coupel S, Boulday G, Soullillou JP. Cyclosporine inhibits class II major histocompatibility antigen presentation by xenogeneic endothelial cells to human T lymphocytes by altering expression of the class II transcriptional activator gene. *Transplantation*. 2000 Jul 27;70(2):354–61.
29. Lee P-C, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee P-H, Hung C-J, Chen Y-L, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*. 2002 Oct 27;74(8):1192–4.
30. Worthington JE, Martin S, Dyer PA, Johnson RW. An association between posttransplant antibody production and renal transplant rejection. *Transplant Proc*. 2001 Mar;33(1-2):475–6.
31. Bernstein JJ, Willingham LA, Goldberg WJ. Sequestering of immunoglobulins by astrocytes after cortical lesion and homografting of fetal cortex. *Int J DevNeurosci*. 1993 Apr;11(2):117–24.
32. Binder J, Graser E, Hancock WW, Wasowska B, Sayegh MH, Volk HD, et al. Downregulation of intragraft IFN-gamma expression correlates with increased IgG1 alloantibody response following intrathymic immunomodulation of sensitized rat recipients. *Transplantation*. 1995 Dec 27;60(12):1516–24.
33. Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol*. 1996 Jun;26(6):1217–21.
34. Saoudi A, Kuhn J, Huygen K, de Kozak Y, Velu T, Goldman M, et al. TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease. *Eur J Immunol*. 1993 Dec;23(12):3096–103.

35. Roos A, Essers M, van Gijlswijk-Janssen D, Bovin NV, Daha MR. Both IgG and IgM anti-pig antibodies induce complement activation and cytotoxicity. *Xenotransplantation*. 2001 Feb;8(1):3–14.
36. Medgyesi GA, Miklós K, Kulics J, Füst G, Gergely J, Bazin H. Classes and subclasses of rat antibodies: reaction with the antigen and interaction of the complex with the complement system. *Immunology*. 1981 May;43(1):171–6.
37. Brüggemann M, Teale C, Clark M, Bindon C, Waldmann H. A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. Identification and biological properties of rat H chain constant regions mu, gamma 1, gamma 2a, gamma 2b, gamma 2c, epsilon, and alpha. *J Immunol*. 1989 May 1;142(9):3145–50.
38. Miyatake T, Sato K, Takigami K, Koyamada N, Hancock WW, Bazin H, et al. Complement-fixing elicited antibodies are a major component in the pathogenesis of xenograft rejection. *J Immunol*. 1998 Apr 15;160(8):4114–23.
39. Okun E, Mattson MP, Arumugam TV. Involvement of Fc receptors in disorders of the central nervous system. *Neuromolecular Med*. 2010 Jun;12(2):164–78.
40. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 2006 Jan;24(1):19–28.
41. Vedeler C, Ulvestad E, Grundt I, Conti G, Nyland H, Matre R, et al. Fc receptor for IgG (FcR) on rat microglia. *J Neuroimmunol*. 1994 Jan;49(1-2):19–24.
42. Woodroffe MN, Hayes GM, Cuzner ML. Fc receptor density, MHC antigen expression and superoxide production are increased in interferon-gamma-treated microglia isolated from adult rat brain. *Immunology*. 1989 Nov;68(3):421–6.
43. Loughlin AJ, Woodroffe MN, Cuzner ML. Modulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II and Fc receptor expression on isolated microglia by transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, noradrenaline and glucocorticoids. *Immunology*. 1993 May;79(1):125–30.
44. Song X, Shapiro S, Goldman DL, Casadevall A, Scharff M, Lee SC. Fcgamma receptor I- and III-mediated macrophage inflammatory protein 1alpha induction in primary human and murine microglia. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):5177–84.
45. Ulvestad E, Williams K, Matre R, Nyland H, Olivier A, Antel J. Fc receptors for IgG on cultured human microglia mediate cytotoxicity and phagocytosis of antibody-coated targets. *J NeuropatholExp Neurol*. 1994 Jan;53(1):27–36.
46. Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Expression of Fc gamma receptors on astroglial cell lines and their role in the central nervous system. *Neurosurgery*. 1992 Jul;31(1):83–87; discussion 87–88.

47. Larsson LC, Czech KA, Widner H, Korsgren O. Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. *Transplantation*. 1999 Oct 27;68(8):1153–60.

	D3	D28	D35	D42	D63	Total
Total number of rats	6	9	4	14	13	46
Healthy NF70⁺/R73⁻	6	6	2	2	0	16
Ongoing rejection NF70⁺/R73⁺	0	3	0	5	0	8
Rejected NF70⁻/R73⁺	0	0	2	5	0	7
Scar NF70⁻/R73⁻	0	0	0	2	13	15

Table 1: Classification of the rat sera. Sera were classified according to the delay after the intracerebral transplantation of porcine mesencephalic neural cells into the rat striatum and the immunological status of the graft as determined using anti-pNF70 and R73 antibodies: healthy (NF70⁺R73⁻), ongoing rejection (NF70⁺R73⁺), rejected (NF70⁻R73⁺) and scar (NF70⁻R73⁻).

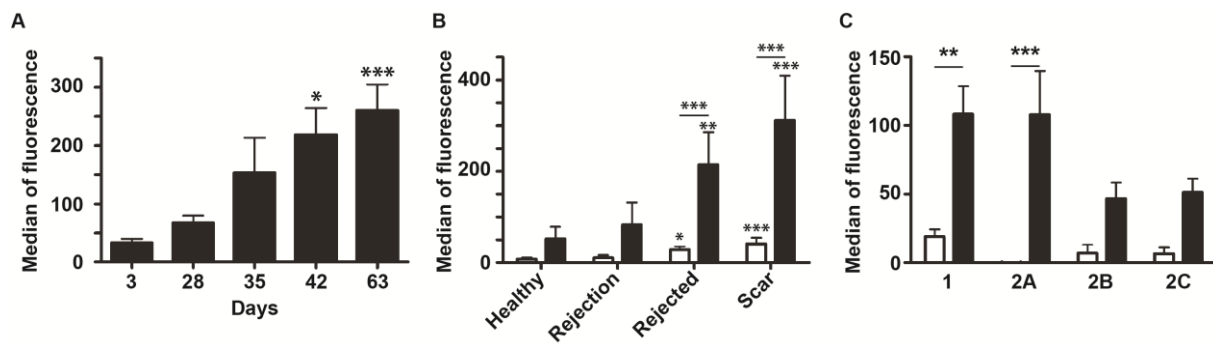


Figure 1: Analysis of the rat sera for the presence of anti-porcine IgG. Ratsera were collected at D3, D28, D35, D42 or D63 following intrastriatal transplantation of porcine neural cells. IgG reactivity was tested by incubating heat-inactivated sera (1/100) with porcine neural cells. Bound antibodies were detected by flow cytometry using FITC-anti-rat IgG subtypes. A) Levels of IgG directed against cultured porcine neural cells, mostly composed of neurons (n= see table 1). B), Levels of IgG directed against freshly isolated porcine neural cells (open bar) (n=3) or cultured porcine neural cells (black bar) (n=3). The results are expressed according to the immunological status of the graft. C), Levels of anti-porcine IgG1, IgG2A, IgG2B and IgG2C in the sera at D3 (open bars) and D63 (black bars) post-transplantation as determined using cultured porcine neural cells (n= see table 1). Results are expressed in mean value $\pm$ SEM (Kruskal-Wallis test and Dunns post test (A, B) and two way Anova test and Bonferroni post test (B, C); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. D3 and healthy, respectively).

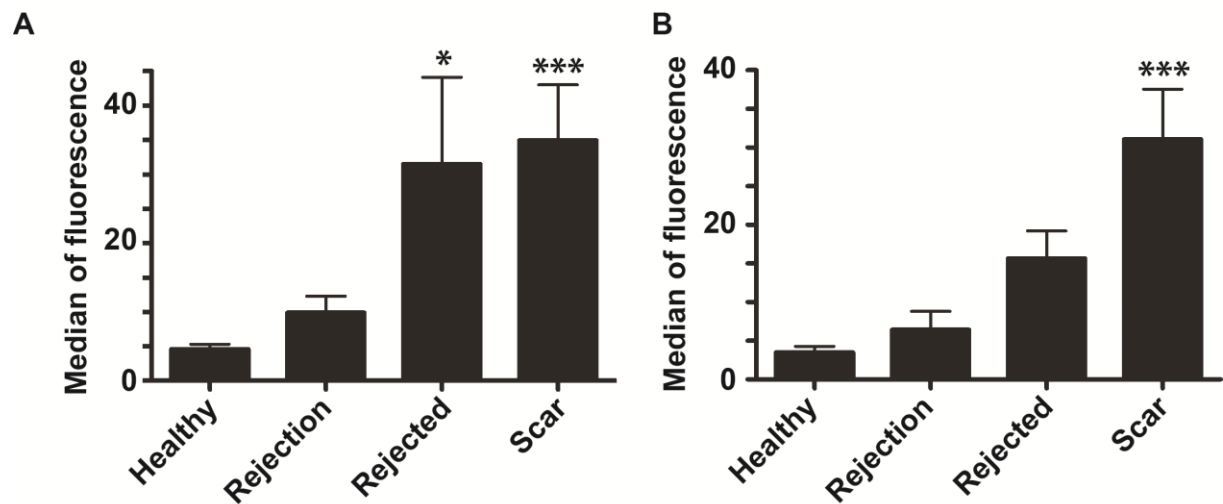


Figure 2: Analysis of the rat sera for the presence of IgG directed against porcine astrocytes or PAEC. Immunoreactivity of the rat sera was tested on porcine astrocytes (A) or PAEC (B) as described in Figure 1 (n=see table 1). The results are expressed according to the immunological status of the transplants. Mean value $\pm$ SEM are presented (Kruskal-Wallis test and Dunns post test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

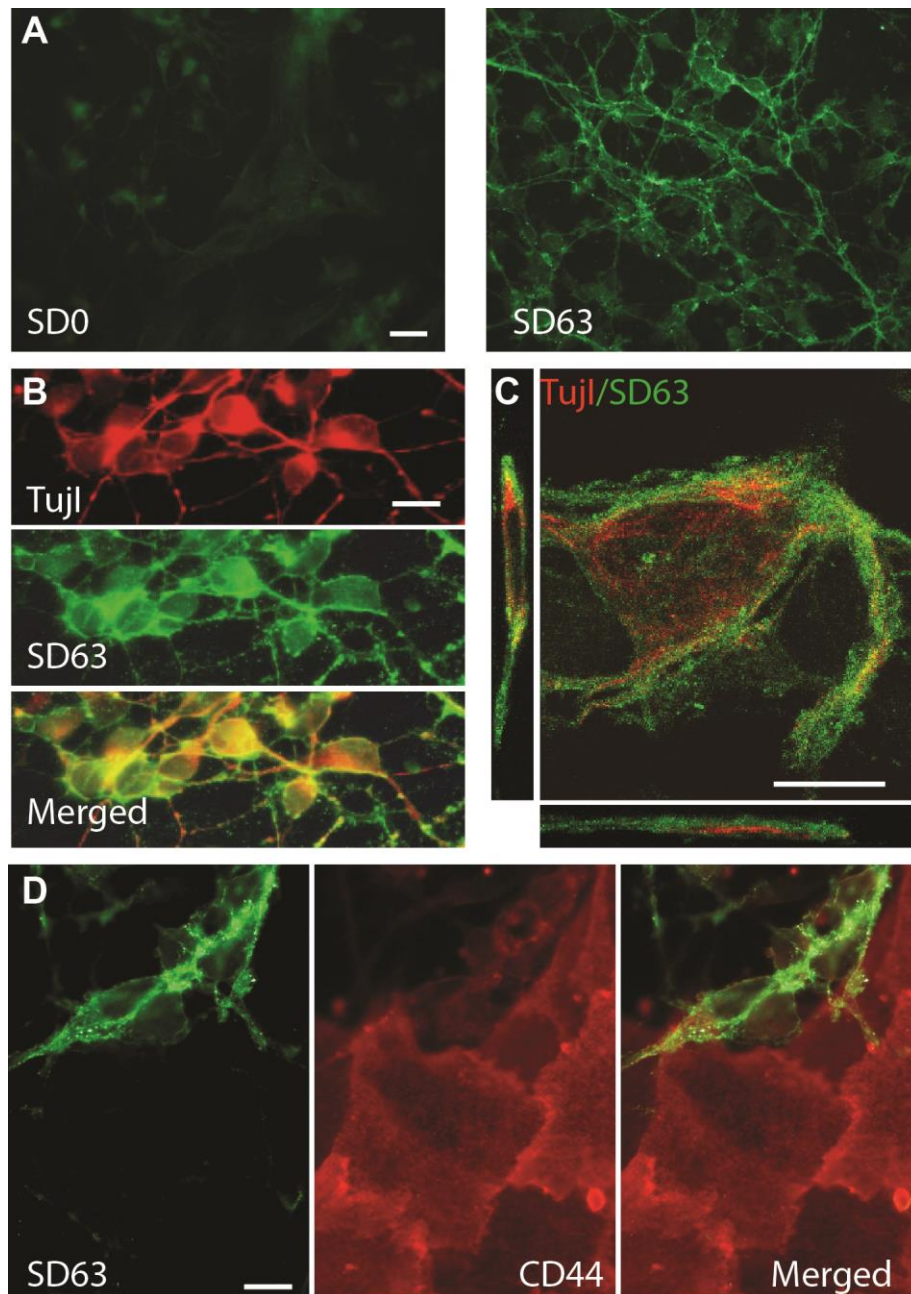


Figure 3: Cell specificity of anti-porcine IgG: immunocytochemical analyses on cultured porcine neural cells A), Staining of porcine neural cells with sera collected at D0 (SD0, ungrafted) or D63 (SD63) and revelation with FITC anti-rat IgG antibody. B-D), Double staining of porcine neural cells with D63 sera and anti-Tuji-1 (B) or anti-CD44 (D) antibodies, labeling neurons and astrocytes, respectively. Confocal analyses of Tuji-1/SD63 co-staining (C). Scale bars: A, 40 μm; B and D, 20 μm; C, 10μm.

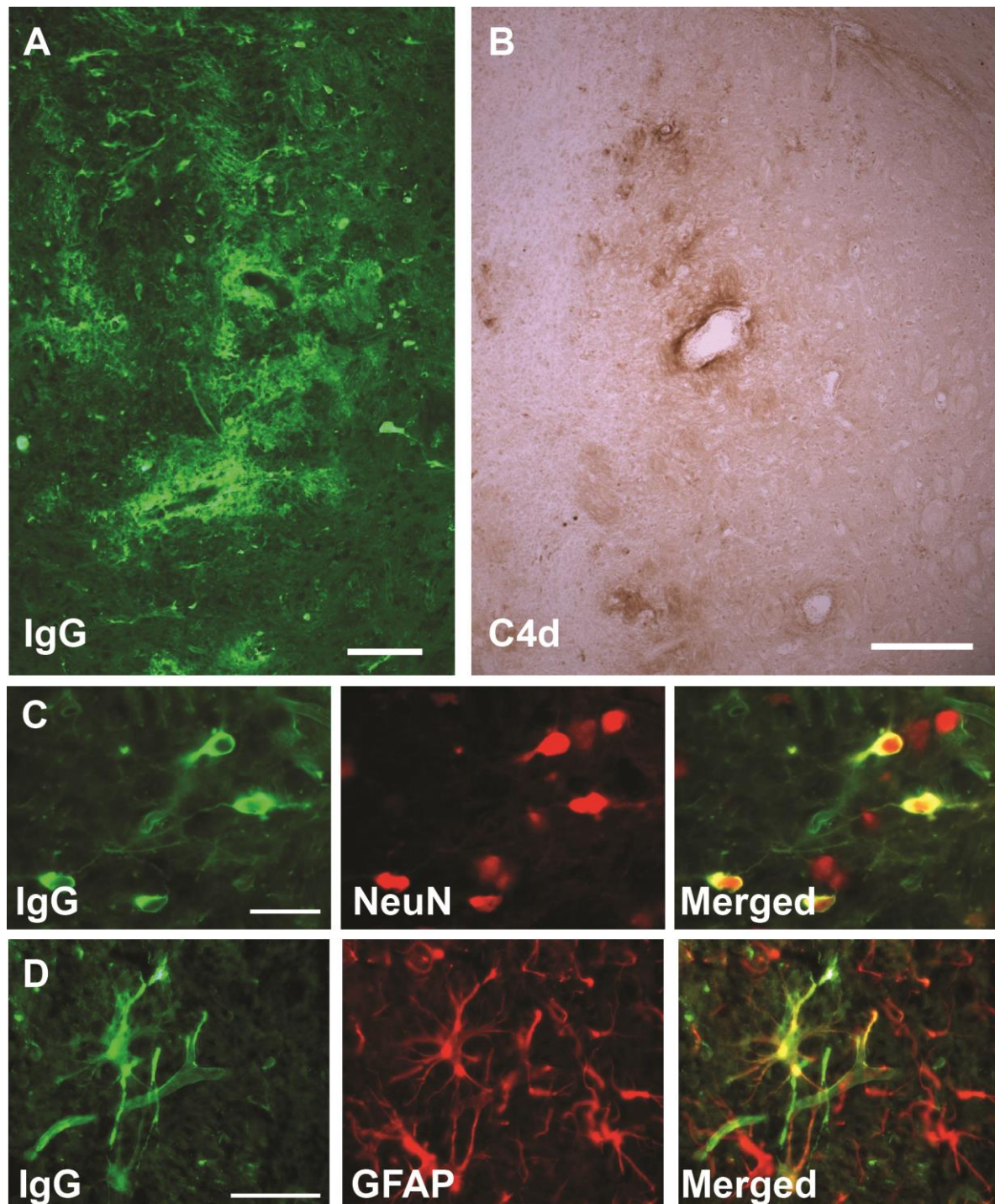


Figure 4: Analyse of the humoral immune response in vivo: immunohistochemical analyses of porcine neural transplants at the time of rejection: A), IgG deposits. B), Complement C4d deposits. C-D), Cell specificity of anti-porcine IgG as detected by double immunohistochemistry. Anti-porcine IgG are detected in NeuN-positive cells (C) and in GFAP-positive cells (D). Scale bars: A-B, 200 µm; C, 50 µm; D, 25 µm.

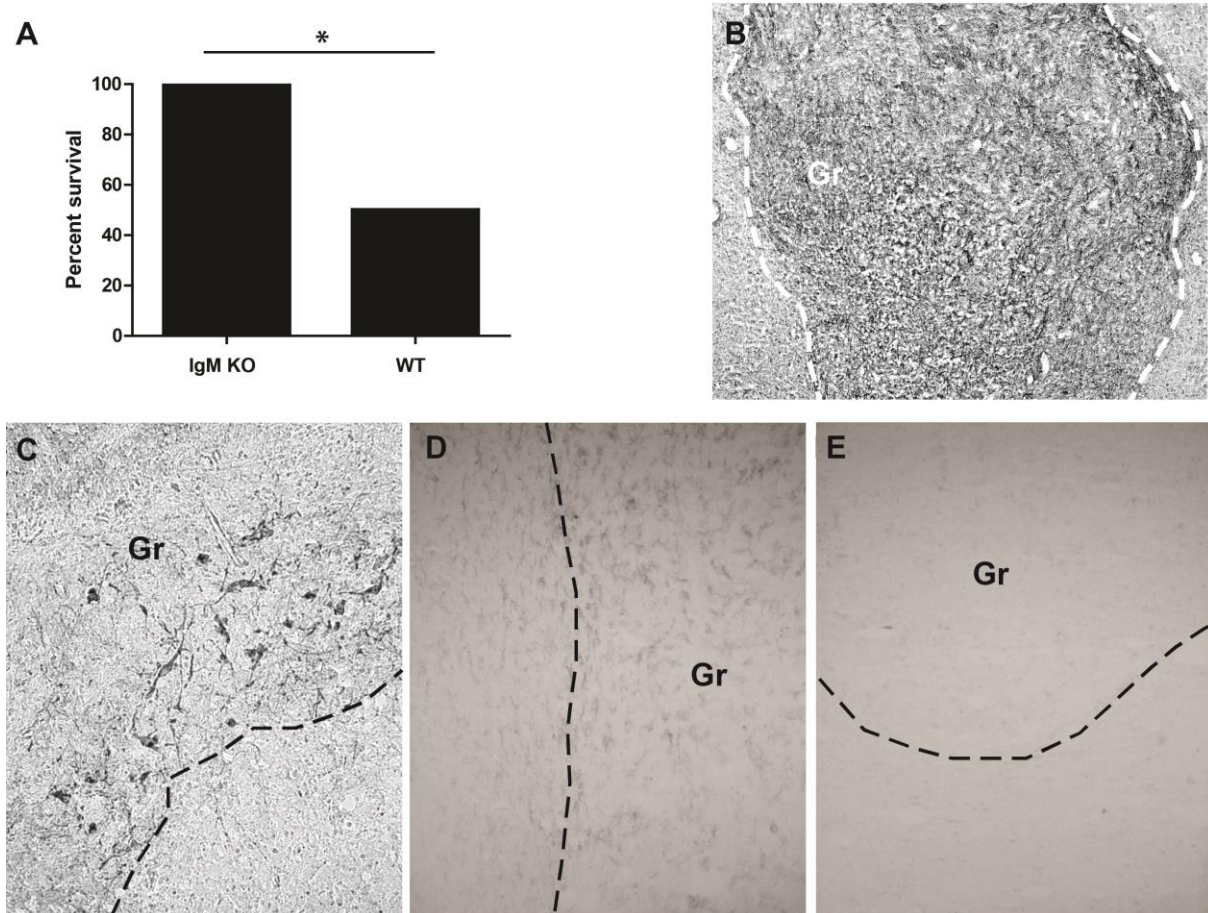


Figure 5: Immunohistological analyses of porcine neural graft in the striatum of IgM knock-out rat at day 63. A), Percent of rats that exhibited a graft (Gr) with pNF70-positive neurons 63 days after the transplantation of mesencephalic neural cells into the striatum of wild-type (WT, n=8) and IgM knock-out (IgM KO, n=6) rats. Mean value $\pm$ SEM are presented (Mann Whitney test; * $p < 0.05$). B), Porcine neurons 63 days after their transplantation into the striatum of IgM KO rats, as detected by anti-NF70 immunostaining C), Dopaminergic neurons as detected by anti-TH immunostaining D), Microglial cells as detected by OX42 immunostaining E), T cells as identified by R73 immunostaining.

Supporting figure

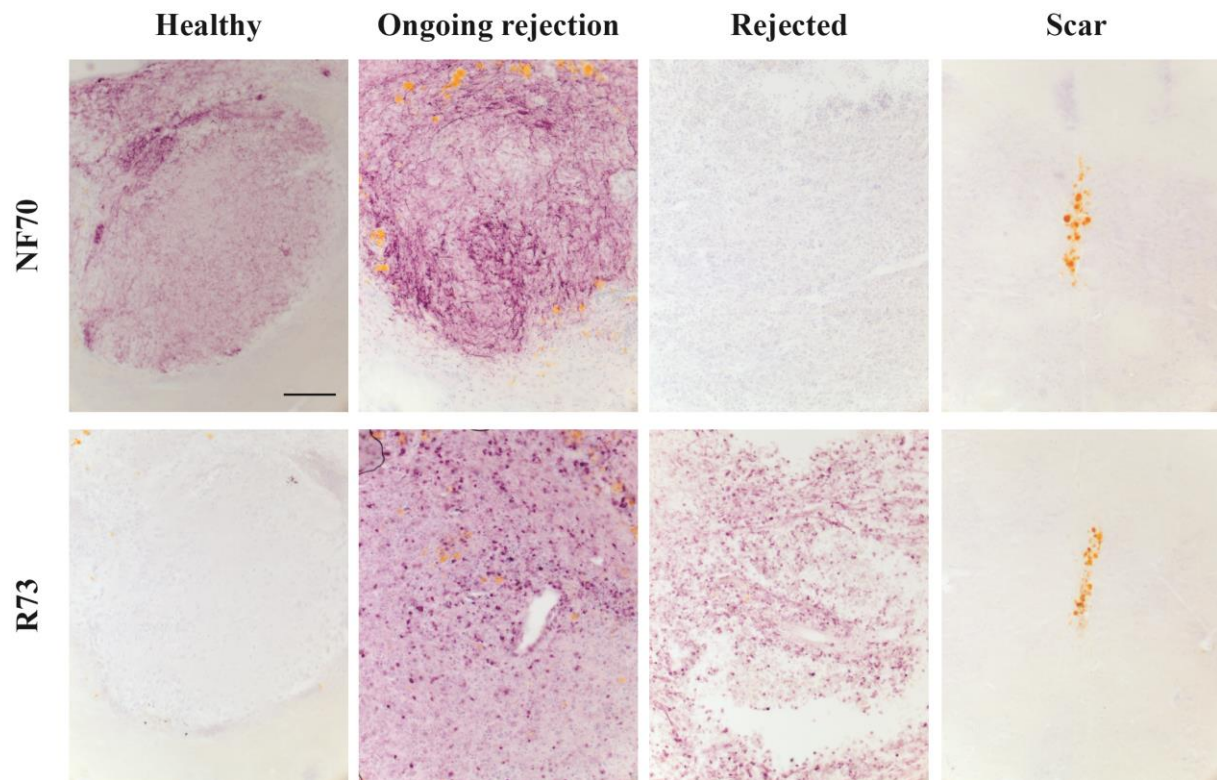


Figure S1: Classification of the graft. Brain sections were labeled with anti-pNF70 and R73 antibodies to classify the graft in function of the presence of porcine neurons (pNF70⁺ cells) and T cells (R73⁺ cells). The grafts were classified in four groups: healthy (NF70⁺R73⁻), ongoing rejection (NF70⁺R73⁺), rejected (NF70⁻ R73⁺) scar (NF70⁻R73⁻) 100 μ m.

Discussion

Cette étude est la première à caractériser une réaction humorale spécifique en réponse à une xénogreffe de cellules mésencéphaliques porcines dans le cerveau de rat. Elle met notamment en évidence une production d'IgG ciblant principalement les neurones.

Afin de suivre la cinétique d'apparition d'IgG dans le sérum des rats greffés et de corréler leur présence avec le statut de la greffe, les sérums sont classés en fonction de la date de prélèvement et du statut de la greffe au moment du prélèvement. Pour cela, quatre groupes sont établis selon la présence ou non de neurones porcins pNF70+ et de cellules T R73+ : Les greffes sont classées comme suit : greffe saine (NF70+/R73-), en rejet (NF70+/R73+), rejetée (NF70-/R73+) et cicatrice (scar, NF70-/R73-) (figure S1). Les premières greffes commencent à être rejetées à partir de J28 et à J63, aucune greffe ne subsiste (table 1). Aucun xénoanticorps préformé n'est détecté dans le sérum des rats avant la greffe (figure 3a) mais une production d'IgG dirigées contre les cellules neurales porcines est clairement présente suite à la transplantation de cellules mésencéphaliques porcines (figure 1a). Ces IgG sont spécifiques des cellules porcines car elles ne reconnaissent pas les cellules de rat. Les IgG dirigées contre les cellules corticales porcines apparaissent tardivement dans le sang puisqu'on ne les détecte que lorsque la greffe est rejetée (figure 1b). Une des hypothèses est qu'à des temps plus précoces, les IgG sont attirées au sein de la greffe. Cette possibilité est confortée par la présence d'IgG dans des greffes en cours de rejet (figure 4a) avec notamment la présence des molécules du complément (figure 4b). Nos observations sont en adéquation avec les résultats de Barker et al., qui ne détectaient pas la présence d'immunoglobulines dans le sang durant les 10 premiers jours post-greffe (Barker et al., 2000). Les anticorps peuvent pénétrer dans le parenchyme cérébral durant les deux premières semaines lorsque la BHE est ouverte (Brundin et al., 1989) mais également lorsque celle-ci est intacte. En effet, les antigènes présents dans le cerveau peuvent être drainés jusqu'aux ganglions lymphatiques (Cserr et al., 1992) et les cellules B activées migrent alors dans le parenchyme pour sécréter les anticorps spécifiques de l'antigène (Knopf et al., 1998). Il est alors vraisemblable de penser que les anticorps sont, tout d'abord, sécrétés au sein de la greffe avant que la réponse humorale ne s'amplifie et qu'ils soient retrouvés au niveau systémique. L'apparition tardive des IgG en systémique est aussi observée lors d'une greffe rénale. Dans ce cas, les anticorps

anti-donneurs sont retrouvés au niveau de la greffe précocement mais ils n'apparaissent dans la circulation sanguine qu'après le rejet définitif de la greffe (Lee et al., 2002; Worthington et al., 2001). Les anticorps pourraient participer à la mise en place de la réponse immune par liaison au récepteur pour le fragment Fc des IgG (FcγR) et le recrutement des cellules effectrices cytotoxiques par un mécanisme appelé ADCC (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity). Cependant, l'observation d'un dépôt de complément avec la présence d'IgG anti-porc au sein de la greffe en rejet met aussi en avant la mise en place d'une réponse humorale dépendante de l'activation du complément.

Cette réponse humorale est très spécifique car seules les sous-classes d'IgG1 et IgG2a de rat sont présentes dans la circulation sanguine à un niveau significatif (figure 1c). Chez le rat, plusieurs particularités diffèrent selon les différentes sous-classes. En effet, les IgG2a ont un plus faible index d'avidité qu'IgG1 et les autres sous-classes mais elles possèdent une très forte capacité à activer le complément (Medgyesi et al., 1981). Les IgG2a sont également les plus efficaces pour induire une cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDCC) en se liant à la molécule C1q (Brüggemann et al., 1989). De la même manière, IgG1 et IgG2a ont été décrites comme possédant la plus grande efficacité pour recruter des cellules effectrices cytotoxiques par ADCC (Brüggemann et al., 1989). Les sous-classes d'IgG vont aussi posséder des différences dans leur affinité et spécificité de liaison au FcγR (Okun et al., 2010). Il existe quatre classes de FcγR : I, II, III, IV. FcγRI va se lier exclusivement et avec une haute affinité avec IgG2a. FcγRIII va se lier avec une faible affinité avec IgG1, 2a, 2b (Nimmerjahn and Ravetch, 2006). Un rôle de la microglie activée peut être envisagé car ces cellules expriment les FcγR (Vedeler et al., 1994a) et leur expression est augmentée en conditions inflammatoires (Loughlin et al., 1993; Woodroffe et al., 1989). L'interaction des FcγR des cellules microgliales au complexe immunitaire peut entraîner une phagocytose, l'ADCC, des réactions d'oxydation ainsi que la production de molécules inflammatoires (Ulvestad et al., 1994c; Vedeler et al., 1994b). Les astrocytes activés présents au niveau de la greffe lors du rejet (Michel et al., 2006) peuvent aussi être impliqués car les astrocytes expriment les FcγR et peuvent déclencher l'ADCC *in vitro* (Nitta et al., 1992; Okun et al., 2010). Au vu de ces données, les voies de l'ADCC et du CDCC pourraient donc être impliquées dans la réponse humorale lors du rejet de xénogreffes intracérébrales de cellules neurales porcines. Chez le rat, les sous-classes IgG1 et 2a sont aussi connues pour être contrôlées par les cytokines de type Th2 qui favorisent la réponse humorale et la sécrétion d'anticorps (Binder et al., 1995; Saoudi et al., 1993). Cette observation corrèle avec ce que

nous avons pu constater dans l'article 1 où a été observée une sur-régulation de TGF β et d'IL-10 à 35 jours post-transplantation. Cette observation conforte un rôle de la microglie et des astrocytes activés dans la régulation de la réponse Th2 (Aloisi et al., 1998, 1999, 2000b).

Les cibles des IgG induites suite à la transplantation de cellules mésencéphaliques porcines seraient préférentiellement des cellules différenciées matures. En effet, les IgG présentes dans le sérum des rats greffés reconnaissent en plus forte proportion les cellules neurales porcines cultivées durant 5 jours *in vitro* que les cellules immatures fraîchement isolées du cerveau de fœtus de porc (figure 1b).

La caractérisation du phénotype des cellules cibles des IgG indique que les neurones sont leur cible préférentielle. Effectivement, bien que les IgG reconnaissent des épitopes à la surface des astrocytes de porc et des cellules endothéliales d'aorte de porc, cette immunoréactivité est très faible comparée à celle observée avec les cellules neurales (figure 2a et b). Ceci est confirmé par immunocytochimie où nous observons une co-localisation entre les IgG et le marqueur Tuj1 des neurones alors qu'il n'y a pas de co-localisation avec le marqueur CD44 des astrocytes (figure 3b, c et d). De la même façon, dans la greffe, les IgG ciblent préférentiellement les neurones même si quelques co-marquages avec des astrocytes GFAP⁺ ont été observés (figure 4c et d). Les IgG présentes dans le sérum des rats greffés avec des cellules mésencéphaliques porcines ciblent donc principalement les neurones et dans une beaucoup plus faible mesure, les astrocytes et les PAEC. Le fait que l'immunoréactivité contre les astrocytes ne soit pas détectable en culture par immunocytochimie doit être dû à la plus faible sensibilité de cette méthode.

Afin de déterminer l'importance de la réponse humorale dans le rejet de greffe, nous avons transplanté des cellules issues du mésencéphale ventral de fœtus de porc dans le striatum de rats déficients pour les immunoglobulines (IgM KO). Chez ces rats, nous observons une survie prolongée de la greffe puisque 100% de ces rats IgM KO présentent une greffe avec une différenciation dopaminergique à 63 jours alors que 50% des rats Wild Type ont rejeté leur greffe à ce stade (figure 5a, b et c). Cette observation est en accord avec l'étude de Larsson et al., qui détectait aussi une survie du xénotransplant intracérébral chez des souris IgM KO par rapport aux souris contrôles (Larsson et al., 1999). Cependant, dans leurs expériences, les souris IgM KO présentaient une réponse cellulaire avec une activation microgliale et une infiltration de lymphocytes T CD8⁺ à 4 semaines, alors que dans notre modèle, aucune réponse T (R73), ni d'activation microgliale ne sont détectées (OX42) (figure

5d et e). Les greffes présentes à 63 jours sont saines sans aucun signe de rejet. Ces différences peuvent être liées aux disparités d'espèces. La survie des greffes pouvant être due à un défaut de la réponse cellulaire T chez les rats IgM KO, nous avons regardé si les cellules T étaient capables de réagir contre les cellules de porc. Pour cela, des PBMC isolées du sang de porc par ficoll et irradiées à 35 grays ont été placées au contact de cellules T isolées à partir de la rate de rat IgM KO par déplétion des cellules NK, B et monocytes (Bonnamain et al., 2011). La prolifération des cellules T a été observée par incorporation de thymidine tritiée. Les LT des rat IgM KO prolifèrent bien en présence des PBMC de porc, suggérant un état fonctionnel des cellules T capables de réagir contre les cellules porcines (**Figure 38**).

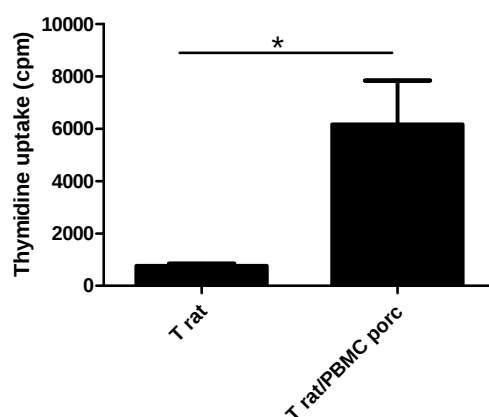


Figure 38 : Prolifération des cellules T de rat IgM KO en présence de PBMC de porc. Les cellules T de la rate de rats IgM KO sont placées en présence de PBMC irradiées issues du sang de porc. La prolifération est observée par incorporation de thymidine tritiée. Test statistique : test de Mann Withney (*: $p < 0.05$ par rapport à la condition cellules T seules).

En conclusion, notre étude démontre un rôle non négligeable de la réponse humorale dans le rejet de cellules neurales porcines. Un dépôt d'IgG anti-porc et de complément se produit dans la greffe avant une détection des anticorps dans la circulation sanguine. C'est la première fois qu'il est démontré que les anticorps ciblent principalement les neurones et conduisent à une réponse humorale spécifique avec l'induction d'IgG1 et 2a. Cette étude pourrait être poursuivie en étudiant quels sont les épitopes reconnus à la surface des neurones porcins. Les mécanismes d'action pourraient également être étudiés en analysant notamment l'activité cytolytique dépendante du complément.

DISCUSSION ET

PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Depuis plusieurs années, notre équipe s'intéresse aux stratégies qui permettraient de remplacer les neurones affectés par des lésions ou des maladies neurodégénératives. En particulier, elle se soucie de la réponse immunitaire de l'hôte qui limite le développement de l'allo mais surtout de la xénotransplantation intracérébrale. Après avoir analysé la réponse cellulaire, notre équipe a entrepris d'étudier le potentiel immunosuppresseur des cellules souches et l'implication de la réponse humorale dans le rejet de xénogreffes neuronales.

➤ Les cellules souches multipotentes : des cellules au potentiel immunosuppresseur.

Depuis maintenant plusieurs années, les cellules souches sont au cœur de la recherche en transplantation. Leur facilité d'accès, leur capacité de prolifération et leur multipotence, en ont fait une source cellulaire de grand intérêt. A ces différentes propriétés s'ajoute un réel potentiel immunosuppresseur qui permettrait de limiter ou de prévenir, au moins en partie, la réaction de rejet en cas d'allo ou de xénotransplantation.

Nous avons pu confirmer ce potentiel immunosuppresseur en montrant qu'une co-greffe avec des cellules souches multipotentes comme les CSM prolongeait la survie de neurones porcins jusqu'à 120 jours sans affecter leur fonction. Le mécanisme d'action reste à définir mais les CSM de rat inhibent la prolifération des LT activés et les quelques résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent une implication de iNOS/NO dans cette inhibition. D'autres cellules multipotentes, comme les CSPN de rat, inhibent également la prolifération des LT activés de manière dose-dépendante. Son activité immunosuppressive est, elle aussi, permise en partie par des facteurs solubles mais le médiateur principal serait HO-1, une enzyme qui favorise la survie de greffes d'organes allo ou xénogéniques (Öllinger and Pratschke, 2010). Cette enzyme serait également impliquée dans l'activité immunosuppressive des CSE humaines (Trigona et al., 2007) ou des CSM humaines et de rat (Chabannes et al., 2007), mais elle n'interviendrait pas dans l'inhibition de la prolifération des cellules T par les CSPN de porc (Michel-Monigadon et al., 2011). Ces observations confortent l'idée d'une spécificité d'espèce (Ren et al., 2009) mais il est également probable que l'activité immunosuppressive des cellules souches résulte de l'action concertée entre plusieurs molécules. Nous avons ainsi montré que la voie NOS/NO contribuait en collaboration avec HO-1 à l'activité

immunosuppressive des CSPN de rat. Cet effet pourrait être dû à l'action stimulatrice de NO sur la synthèse d'HO-1 (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997).

Les propriétés immunosuppressives d'HO-1 permettent d'envisager son utilisation pour augmenter la survie des xénogreffes intracérébrales. Il serait notamment intéressant d'étudier si la surexpression de cette molécule, grâce à des vecteurs comme l'AAV, permettra une survie à long-terme de neuroblastes porcins. Une surexpression d'HO-1 par les CSPN pourrait également être étudiée. Des techniques de transfert du gène HO-1 ont déjà été utilisées pour augmenter la survie de greffes d'organes (Bouche et al., 2002; Braudeau et al., 2004). Une immunosuppression locale pouvant ne pas suffire, elle pourrait être accompagnée de faibles doses d'immunosuppresseurs administrés en systémique.

Les LT ayant un rôle clé dans le rejet des xénogreffes intracérébrales, nous avons focalisé notre attention sur les interactions entre les cellules souches et les LT mais l'action immunosuppressive des cellules souches multipotentes peut également s'exercer sur d'autres cellules immunes. Ainsi, il a été démontré que les CSM et les CSPN inhibaient la différenciation et la maturation des cellules dendritiques et que les CSM avaient un effet direct sur les cellules NK et les lymphocytes B (Nauta and Fibbe, 2007; Pluchino et al., 2009b). Les molécules impliquées peuvent donc différer selon les cibles cellulaires, certaines pouvant agir sur plusieurs types cellulaires. Dans le même ordre d'idée, des molécules produites par les cellules souches peuvent agir sur un même type cellulaire, mais produire des effets différents. Ainsi, une étude a montré qu'iNOS intervenait dans la suppression de la prolifération des LT alors que les prostaglandines étaient nécessaires pour l'inhibition de la sécrétion des cytokines inflammatoires par les LT (Zinöcker and Vaage, 2012). Les cellules souches vont aussi différer dans leurs mécanismes suppresseurs en fonction de la proximité avec les cellules immunes. En effet, des molécules comme NO nécessitent une localisation proche entre les CSM et les cellules T (Ren et al., 2008; Zinöcker and Vaage, 2012), alors que d'autres molécules sont plus diffusibles. De ce principe, les CSM et les CSPN vont sécréter des chimiokines ou des récepteurs aux chimiokines et aux intégrines pour se retrouver à proximité des cellules immunes (Pluchino et al., 2005; Ren et al., 2008). Un autre point important est que les différentes cellules souches ne possèdent pas la même efficacité sur certains types cellulaires. Pour exemple, les CSN seraient moins efficaces que les CSM pour inhiber la différenciation des monocytes en cellules dendritiques mais les deux types cellulaires posséderaient la même capacité à inhiber la maturation et la fonction des cellules

dendritiques (Shahbazi et al., 2013). Dans ce sens, il faudrait pouvoir analyser l'impact des CSPN sur les différents types de cellules immunes.

En éliminant les problèmes éthiques liés à l'utilisation de tissu fœtal d'origine humaine, les iPSC ont ouvert de nouvelles perspectives en transplantation. Les travaux préliminaires que nous avons réalisés indiquent que les CSN dérivées d'iPSC humaines possèdent elles aussi la capacité d'inhiber la prolifération des PBMC humaines. Cette activité immunosuppressive fait intervenir des molécules solubles qui restent encore à caractériser. A ce propos, Lin et al., ont récemment montré qu'HO-1 avait un rôle critique pour la survie et la différenciation des iPSC (Lin et al., 2012), soulignant l'importance de cette molécule. Les CSN pouvant également être dérivées des CSE, il serait important de comparer le potentiel suppressif de ces deux types cellulaires.

La reprogrammation de cellules somatiques ouvre la possibilité d'une transplantation autologue mais les manipulations génétiques peuvent induire l'expression de molécules immunogènes et augmenter le risque de rejet. Quelques études sont déjà publiées sur ce sujet. Selon Liu et al., les cellules progénitrices neurales dérivées d'iPSC reprogrammées à partir de CSM issues de cordon ombilical seraient moins immunogènes que celles reprogrammées à partir de fibroblastes (Liu et al., 2013b). Les travaux de Emborg ont révélé une présence minimale des cellules immunes et de glie réactive, six mois après la transplantation syngénique de progéniteurs neuronaux dérivés d'iPSC dans le cerveau d'un singe, modèle préclinique de la maladie de Parkinson (Emborg et al., 2013).

Un autre problème inhérent à l'utilisation des iPSC et des CSE en transplantation est le risque de formation de tératome. Bien que les premières analyses n'aient pas mis en évidence d'apparition de tumeurs dans des études précliniques avec des CSPN dérivées d'iPSC (Emborg et al., 2013; Kobayashi et al., 2012), le risque ne peut être écarté. Une solution envisagée serait de dériver des CSN directement de fibroblastes sans passer par le stade pluripotent (Matsui et al., 2012). Il faudrait alors déterminer si cette nouvelle source cellulaire aurait elle aussi des propriétés immunomodulatrices.

➤ Le rôle essentiel de la réponse humorale dans le rejet de xénogreffes porcines.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence que le rejet de xénogreffes intracérébrales n'était pas seulement dû à une réponse cellulaire T, mais qu'il faisait également intervenir une réponse humorale.

En démontrant que la greffe de cellules mésencéphaliques porcines dans le cerveau de rat immunocompétent stimule la production d'IgG qui se lie préférentiellement aux neurones porcins, nous apportons les premiers éléments pour dire que les neurones sont la principale cible des anticorps induits par une xénogreffe de cellules fœtales issues du SNC. La prochaine étape consistera à caractériser les épitopes et à déterminer pourquoi les astrocytes de porc et les PAEC sont faiblement reconnus par les xénoanticorps.

La réponse humorale est spécifique avec une plus grande production d'IgG 1 et 2a contrôlées par les cytokines Th2. Les IgG pourraient agir via des mécanismes d'ADCC et CDCC mais les différents effecteurs restent à être caractérisés. Il serait intéressant de regarder un potentiel rôle des cellules microgliales et des astrocytes dans le mécanisme ADCC car ces cellules expriment les FcγR (Okun et al., 2010; Vedeler et al., 1994b).

La longue survie des neuroblastes porcins dans le cerveau de rats immunodéficients pour les immunoglobulines, démontre un rôle de la réponse humorale dans le rejet de xénogreffe intracérébrale. Il apparaît donc comme essentiel de tester des régimes immunosuppresseurs ciblant à la fois, les réponses cellulaires et humorales. Par ailleurs, il serait intéressant de regarder l'impact des cellules souches sur l'activation des cellules B et sur la production d'immunoglobulines. A ce propos, une première approche serait de contrôler une éventuelle absence d'IgG dans les sérums et les cerveaux des rats greffés soit avec des CSPN soit avec des CSM et des neuroblastes porcins.

CONCLUSION

La transplantation intracérébrale est toujours prometteuse pour restaurer les populations neuronales affectées par les maladies neurodégénératives et de nouvelles perspectives sont apparues, avec la possibilité de faire proliférer des cellules souches avant de les différencier en neurones d'un phénotype particulier. Un grand nombre de ces cellules s'est avéré difficile à différencier en neurones dopaminergiques fonctionnels. En revanche, elles sont apparues comme des cellules à fort pouvoir immunosuppresseur, ce qui a renforcé leur intérêt thérapeutique. En effet, même en cas d'allotransplantation dans le cerveau, il est recommandé de maintenir une immunosuppression pour prévenir un éventuel rejet. La longue survie des CSPN xenogéniques dans le cerveau ou la capacité des CSM à prévenir le rejet de neurones xénogéniques suggèrent que ces cellules pourraient être utilisées pour limiter et parfaire l'utilisation d'immunosuppresseurs systémiques. Les expériences *in vitro* ont clairement mis en évidence un effet inhibiteur des CSPN, des CSM mais également des CSN dérivées d'iPSC sur la prolifération des LT activés. L'analyse des voies de signalisation suggère l'implication d'enzymes comme HO-1 ou NO, sans exclure d'autres médiateurs possibles. De même, ces cellules souches pourraient affecter d'autres cellules immunes comme les cellules NK, les cellules dendritiques mais également les lymphocytes B. Ce dernier point serait particulièrement intéressant à étudier car nous avons démontré un rôle de la réponse humorale dans le rejet des xénogreffes intracérébrales.

Outre leur intérêt d'un point de vue fondamental, l'ensemble de ces résultats ouvre des nouvelles perspectives pour parvenir à contrôler le rejet de xénogreffes intracérébrales. En l'occurrence, on pourrait espérer qu'une immunosuppression locale, basée sur la transplantation de cellules souches associées à une administration systémique d'immunosuppresseurs ciblant les réponses humorales et cellulaires, soit suffisamment efficace pour assurer la survie à long terme de cellules neurales xénogéniques dans un cerveau.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

Aarsland D, A.K. (2003). Prevalence and characteristics of dementia in parkinson disease: An 8-year prospective study. *Arch. Neurol.* 60, 387–392.

Abbas, N., Lücking, C.B., Ricard, S., Dürr, A., Bonifati, V., Michele, G.D., Bouley, S., Vaughan, J.R., Gasser, T., Marconi, R., et al. (1999). A Wide Variety of Mutations in the Parkin Gene Are Responsible for Autosomal Recessive Parkinsonism in Europe. *Hum. Mol. Genet.* 8, 567–574.

Abbott, N.J., Rönnebeck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.

Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M.K., McDonald, N.Q., Yang, Y.X., Gandhi, S., Healy, D.G., Harvey, K., Harvey, R.J., Deas, E., Bhatia, K., et al. (2006). A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson’s disease? *Ann. Neurol.* 60, 414–419.

Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815–1822.

Akesson, E., Wolmer-Solberg, N., Cederarv, M., Falci, S., and Odeberg, J. (2009). Human neural stem cells and astrocytes, but not neurons, suppress an allogeneic lymphocyte response. *Stem Cell Res.* 2, 56–67.

Albina, J.E., Abate, J.A., and Henry, W.L., Jr (1991). Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 147, 144–148.

Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 117, 145–152.

Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* 36, 165–179.

Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., and Adorini, L. (1998). Microglia Are More Efficient Than Astrocytes in Antigen Processing and in Th1 But Not Th2 Cell Activation. *J. Immunol.* 160, 4671–4680.

Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., Hess, H., Penna, G., and Adorini, L. (1999). Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4⁺ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur. J. Immunol.* 29, 2705–2714.

Aloisi, F., Simone, R.D., Columba-Cabezas, S., Penna, G., and Adorini, L. (2000a). Functional Maturation of Adult Mouse Resting Microglia into an APC Is Promoted by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interaction with Th1 Cells. *J. Immunol.* 164, 1705–1712.

- Aloisi, F., Ria, F., and Adorini, L. (2000b). Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today* 21, 141–147.
- Ben-Ami, E., Berrih-Aknin, S., and Miller, A. (2011). Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 10, 410–415.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.-P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Dev. Biol.* 227, 271–278.
- Andersson, E.K.I., Irvin, D.K., Ahlsjö, J., and Parmar, M. (2007). Ngn2 and Nurr1 act in synergy to induce midbrain dopaminergic neurons from expanded neural stem and progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 313, 1172–1180.
- Anker, P.S. in 't, Scherjon, S.A., Keur, C.K. der, Noort, W.A., Claas, F.H.J., Willemze, R., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H.H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548–1549.
- Annett, L.E., Martel, F.L., Rogers, D.C., Ridley, R.M., Baker, H.F., and Dunnett, S.B. (1994). Behavioral assessment of the effects of embryonic nigral grafts in marmosets with unilateral 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.* 125, 228–246.
- Annett, L.E., Torres, E.M., Clarke, D.J., Ishida, Y., Barker, R.A., Ridley, R.M., Baker, H.F., and Dunnett, S.B. (1997). Survival of nigral grafts within the striatum of marmosets with 6-OHDA lesions depends critically on donor embryo age. *Cell Transplant.* 6, 557–569.
- Arjona, V., Mínguez-Castellanos, A., Montoro, R.J., Ortega, A., Escamilla, F., Toledo-Aral, J.J., Pardal, R., Méndez-Ferrer, S., Martín, J.M., Pérez, M., et al. (2003). Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* 53, 321–328; discussion 328–330.
- Armstrong, R.J., Harrower, T.P., Hurelbrink, C.B., McLaughlin, M., Ratcliffe, E.L., Tyers, P., Richards, A., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., and Barker, R.A. (2001). Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience* 106, 201–216.
- Armstrong, R.J.E., Hurelbrink, C.B., Tyers, P., Ratcliffe, E.L., Richards, A., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., and Barker, R.A. (2002). The potential for circuit reconstruction by expanded neural precursor cells explored through porcine xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 175, 98–111.
- Armstrong, R.J.E., Tyers, P., Jain, M., Richards, A., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., and Barker, R.A. (2003). Transplantation of expanded neural precursor cells from the developing pig ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 151, 204–217.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557–561.

Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C.-P., Kuroda, Y., Kandeel, F., and Mullen, Y. (2009). Mesenchymal stem cells suppress B cell terminal differentiation. *Exp. Hematol.* 37, 604–615.

Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M.G., O'Reilly, E., McCullough, M.L., Calle, E.E., Schwarzschild, M.A., and Thun, M.J. (2006). Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 60, 197–203.

Aschner, M. (1998). Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol. Lett.* 102-103, 283–287.

Auchincloss, H., Jr, and Sachs, D.H. (1998). Xenogeneic transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 433–470.

Auerbach, J.M., Eiden, M.V., and McKay, R.D. (2000). Transplanted CNS stem cells form functional synapses in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1696–1704.

Azizi, S.A., Stokes, D., Augelli, B.J., DiGirolamo, C., and Prockop, D.J. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3908–3913.

B

Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152, 879–884.

Bai, L., Lennon, D.P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A.I., Miller, S.D., and Miller, R.H. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 57, 1192–1203.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., and Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. *Dev. Biol.* 168, 342–357.

Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H., and Lee, G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* 57, 874–882.

Bao, X., Wei, J., Feng, M., Lu, S., Li, G., Dou, W., Ma, W., Ma, S., An, Y., Qin, C., et al. (2011). Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1367, 103–113.

Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N.Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A.L., Bruses, J., Rubio, M.E., Topf, N., et al. (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat. Biotechnol.* 21, 1200–1207.

Barker, R.A., and Widner, H. (2004). Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 1, 472–481.

- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3415–3424.
- Barker, R.A., Barrett, J., Mason, S.L., and Björklund, A. (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 12, 84–91.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 30, 42–48.
- Bauer, J., Bradl, M., Hickey, W.F., Forss-Petter, S., Breitschopf, H., Linington, C., Wekerle, H., and Lassmann, H. (1998). T-Cell Apoptosis in Inflammatory Brain Lesions. *Am. J. Pathol.* 153, 715–724.
- Bayer, S.A., Yackel, J.W., and Puri, P.S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216, 890–892.
- Becher, B., and Antel, J.P. (1996). Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia* 18, 1–10.
- 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., Kwidzinski, E., Kovac, A.D., Simbürger, E., Horvath, T., Gimsa, U., Dirnagl, U., Priller, J., and Nitsch, R. (2001). Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp. Neurol.* 168, 242–249.
- Bedoui, S., Kawamura, N., Straub, R.H., Pabst, R., Yamamura, T., and von Hörsten, S. (2003). Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J. Neuroimmunol.* 134, 1–11.
- 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.
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105, 2214–2219.
- Bezzi, P., Domercq, M., Vesce, S., and Volterra, A. (2001). Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Prog. Brain Res.* 132, 255–265.
- Bieberich, E., Silva, J., Wang, G., Krishnamurthy, K., and Condie, B.G. (2004). Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants. *J. Cell Biol.* 167, 723–734.

- Bifari, F., Pacelli, L., and Krampera, M. (2010). Immunological properties of embryonic and adult stem cells. *World J. Stem Cells* 2, 50–60.
- Binder, J., Graser, E., Hancock, W.W., Wasowska, B., Sayegh, M.H., Volk, H.D., and Kupiec-Weglinski, J.W. (1995). Downregulation of intragraft IFN-gamma expression correlates with increased IgG1 alloantibody response following intrathymic immunomodulation of sensitized rat recipients. *Transplantation* 60, 1516–1524.
- Bjorklund, L.M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y.C., McNaught, K.S.P., Brownell, A.-L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.-S., et al. (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.
- Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., and Iversen, S.D. (1981). Functional reactivation of the deafferented neostriatum by nigral transplants. *Nature* 289, 497–499.
- Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringdén, O. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 57, 11–20.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Götherström, C., Seidel, C., Sundberg, B., Sundin, M., Rosendahl, K., Tammik, C., and Ringdén, O. (2004). Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 60, 307–315.
- Blandini, F., Cova, L., Armentero, M.-T., Zennaro, E., Levandis, G., Bossolasco, P., Calzarossa, C., Mellone, M., Giuseppe, B., Delilieri, G.L., et al. (2010). Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplant.* 19, 203–217.
- Block, M.L., and Hong, J.-S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76, 77–98.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57–69.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R., and Verna, J.M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65, 135–172.
- Boer, G.J. (1994). Ethical guidelines for the use of human embryonic or fetal tissue for experimental and clinical neurotransplantation and research. Network of European CNS Transplantation and Restoration (NECTAR). *J. Neurol.* 242, 1–13.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C.J., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., et al. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256–259.
- Bonnemain, V., Neveu, I., and Naveilhan, P. (2011). In vitro analyses of the immunosuppressive properties of neural stem/progenitor cells using anti-CD3/CD28-activated T cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 677, 233–243.

- Bonnemain, V., Neveu, I., and Naveilhan, P. (2012). Neural stem/progenitor cells as a promising candidate for regenerative therapy of the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 6, 17.
- Bouche, D., Chauveau, C., Roussel, J.C., Mathieu, P., Braudeau, C., Tesson, L., Soullillou, J.P., Iyer, S., Buelow, R., and Anegón, I. (2002). Inhibition of graft arteriosclerosis development in rat aortas following heme oxygenase-1 gene transfer. *Transpl. Immunol.* 9, 235–238.
- Bouchez, G., Sensebé, L., Vourc'h, P., Garreau, L., Bodard, S., Rico, A., Guilloteau, D., Charbord, P., Besnard, J.-C., and Chalon, S. (2008). Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 52, 1332–1342.
- Bouvier, M.M., and Mytilineou, C. (1995). Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J. Neurosci.* 15, 7141–7149.
- Braak, H., Tredici, K.D., Rüb, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Braudeau, C., Bouchet, D., Tesson, L., Iyer, S., Rémy, S., Buelow, R., Anegón, I., and Chauveau, C. (2004). Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther.* 11, 701–710.
- Brederlau, A., Correia, A.S., Anisimov, S.V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., et al. (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 1433–1440.
- Brett, J., Gerlach, H., Nawroth, P., Steinberg, S., Godman, G., and Stern, D. (1989). Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J. Exp. Med.* 169, 1977–1991.
- 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., Holgersson, J., and Widner, H. (2000). Xenotransplantation for CNS repair: immunological barriers and strategies to overcome them. *Trends Neurosci.* 23, 337–344.
- 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.
- Brito, C., Simão, D., Costa, I., Malpique, R., Pereira, C.I., Fernandes, P., Serra, M., Schwarz, S.C., Schwarz, J., Kremer, E.J., et al. (2012). 3D cultures of human neural progenitor cells: dopaminergic differentiation and genetic modification. [corrected]. *Methods San Diego Calif* 56, 452–460.

Brooks, A., Chadwick, C., Gelbard, H., Cory-Slechta, D., and Federoff, H. (1999). Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.* 823, 1–10.

Brüggemann, M., Teale, C., Clark, M., Bindon, C., and Waldmann, H. (1989). A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. Identification and biological properties of rat H chain constant regions mu, gamma 1, gamma 2a, gamma 2b, gamma 2c, epsilon, and alpha. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 142, 3145–3150.

Brundin, P., Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Lindvall, O., Astedt, B., and Björklund, A. (1986). Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 65, 235–240.

Brundin, P., Widner, H., Nilsson, O.G., Strecker, R.E., and Björklund, A. (1989). Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 75, 195–207.

Brundin, P., Barker, R.A., and Parmar, M. (2010). Neural grafting in Parkinson's disease Problems and possibilities. *Prog. Brain Res.* 184, 265–294.

Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.-L., and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135, 1287–1298.

Burch, D., and Sheerin, F. (2005). Parkinson's disease. *Lancet* 365, 622–627.

Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., and Kopin, I.J. (1983). A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4546–4550.

Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297–308.

Buytaert-Hoefen, K.A., Alvarez, E., and Freed, C.R. (2004). Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 669–674.

Bużańska, L., Machaj, E.K., Zabłocka, B., Pojda, Z., and Domańska-Janik, K. (2002). Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J. Cell Sci.* 115, 2131–2138.

C

Cai, J., Yang, M., Poremsky, E., Kidd, S., Schneider, J.S., and Iacovitti, L. (2010). Dopaminergic Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Survive and Integrate into 6-OHDA-Lesioned Rats. *Stem Cells Dev.* 19, 1017–1023.

- Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476, 224–227.
- Caldwell, M.A., He, X., Wilkie, N., Pollack, S., Marshall, G., Wafford, K.A., and Svendsen, C.N. (2001). Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat. Biotechnol.* 19, 475–479.
- Cameron, H.A., and McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435, 406–417.
- Caparros-Lefebvre, D., Blond, S., Vermersch, P., Pecheux, N., Guieu, J.D., and Petit, H. (1993). Chronic thalamic stimulation improves tremor and levodopa induced dyskinesias in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 56, 268–273.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 9, 641–650.
- Carlén, M., Cassidy, R.M., Brismar, H., Smith, G.A., Enquist, L.W., and Frisé, J. (2002). Functional integration of adult-born neurons. *Curr. Biol. CB* 12, 606–608.
- Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C.P., and Rao, M.S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp. Neurol.* 172, 383–397.
- Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., and Lo, D. (1998). Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22, 72–85.
- Cascalho, M., and Platt, J.L. (2001). Xenotransplantation and other means of organ replacement. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 154–160.
- Cash, E., and Rott, O. (1994). Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the central nervous system. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 313–318.
- Castañó, A., Herrera, A.J., Cano, J., and Machado, A. (1998). Lipopolysaccharide Intranigral Injection Induces Inflammatory Reaction and Damage in Nigrostriatal Dopaminergic System. *J. Neurochem.* 70, 1584–1592.
- Castañó, A., Herrera, A.J., Cano, J., and Machado, A. (2002). The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF- α , IL-1 β and IFN- γ . *J. Neurochem.* 81, 150–157.
- Castro, R.F., Jackson, K.A., Goodell, M.A., Robertson, C.S., Liu, H., and Shine, H.D. (2002). Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 297, 1299.
- Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Soulillou, J.P., Anegón, I., and Cuturi, M.C. (2007). A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 110, 3691–3694.

Chang, M.-Y., Kim, D., Kim, C.-H., Kang, H.-C., Yang, E., Moon, J.-I., Ko, S., Park, J., Park, K.-S., Lee, K.-A., et al. (2010). Direct reprogramming of rat neural precursor cells and fibroblasts into pluripotent stem cells. *PloS One* 5, e9838.

Chang, Y.-L., Chen, S.-J., Kao, C.-L., Hung, S.-C., Ding, D.-C., Yu, C.-C., Chen, Y.-J., Ku, H.-H., Lin, C.-P., Lee, K.-H., et al. (2012). Docosahexaenoic acid promotes dopaminergic differentiation in induced pluripotent stem cells and inhibits teratoma formation in rats with Parkinson-like pathology. *Cell Transplant.* 21, 313–332.

Chaudhuri, K.R. (2003). Nocturnal symptom complex in PD and its management. *Neurology* 61, S17–23.

Chaudhuri, K.R., Healy, D.G., and Schapira, A.H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235–245.

Chauveau, C., Rémy, S., Royer, P.J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F.-X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., et al. (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694–1702.

Chen, J.J., Sun, Y., and Nabel, G.J. (1998). Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 282, 1714–1717.

Cho, M.S., Lee, Y.-E., Kim, J.Y., Chung, S., Cho, Y.H., Kim, D.-S., Kang, S.-M., Lee, H., Kim, M.-H., Kim, J.-H., et al. (2008). Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3392–3397.

Choi, C., and Benveniste, E.N. (2004). Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 44, 65–81.

Choi-Lundberg, D.L., Lin, Q., Chang, Y.N., Chiang, Y.L., Hay, C.M., Mohajeri, H., Davidson, B.L., and Bohn, M.C. (1997). Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275, 838–841.

Chora, A.A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T.F., Cardoso, S., Ho, P.P., Lee, L.Y., Sobel, R.A., Steinman, L., and Soares, M.P. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Invest.* 117, 438–447.

Chu, K., Kim, M., Jeong, S.-W., Kim, S.U., and Yoon, B.-W. (2003). Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* 343, 129–133.

Chu, K., Kim, M., Park, K.-I., Jeong, S.-W., Park, H.-K., Jung, K.-H., Lee, S.-T., Kang, L., Lee, K., Park, D.-K., et al. (2004a). Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res.* 1016, 145–153.

Chu, K., Kim, M., Chae, S.-H., Jeong, S.-W., Kang, K.-S., Jung, K.-H., Kim, J., Kim, Y.-J., Kang, L., Kim, S.U., et al. (2004b). Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci. Res.* 50, 459–465.

- Chung, S., Sonntag, K.-C., Andersson, T., Bjorklund, L.M., Park, J.-J., Kim, D.-W., Kang, U.J., Isacson, O., and Kim, K.-S. (2002). Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1829–1838.
- Chung, S., Shin, B.-S., Hedlund, E., Pruszek, J., Ferree, A., Kang, U.J., Isacson, O., and Kim, K.-S. (2006). Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J. Neurochem.* 97, 1467–1480.
- Cicchetti, F., Brownell, A.L., Williams, K., Chen, Y.I., Livni, E., and Isacson, O. (2002). Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur. J. Neurosci.* 15, 991–998.
- Clarke, D.L. (2003). Neural stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 32, S13–S17.
- Colasanti, M., Persichini, T., Menegazzi, M., Mariotto, S., Giordano, E., Caldarera, C.M., Sogos, V., Lauro, G.M., and Suzuki, H. (1995). Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 270, 26731–26733.
- Collins, B.H., Cotterell, A.H., McCurry, K.R., Alvarado, C.G., Magee, J.C., Parker, W., and Platt, J.L. (1995). Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the alpha-galactosyl determinant in hyperacute rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 154, 5500–5510.
- Constantin, G. (2008). Chemokine signaling and integrin activation in lymphocyte migration into the inflamed brain. *J. Neuroimmunol.* 198, 20–26.
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367–372.
- Cordenonsi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D.A.D., Kendrick-Jones, J., Shore, D., and Citi, S. (1999). Cingulin Contains Globular and Coiled-Coil Domains and Interacts with Zo-1, Zo-2, Zo-3, and Myosin. *J. Cell Biol.* 147, 1569–1582.
- Correia, A.S., Anisimov, S.V., Roybon, L., Li, J.-Y., and Brundin, P. (2007). Fibroblast growth factor-20 increases the yield of midbrain dopaminergic neurons derived from human embryonic stem cells. *Front. Neuroanat.* 1, 4.
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Salani, S., Del Bo, R., Ghezzi, S., Strazzer, S., et al. (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp. Neurol.* 205, 547–562.
- Coulombel, L. (2003). [Adult stem cells: seing is not being]. *Médecine Sci. MS* 19, 683–694.
- Cremer, J.E., Cunningham, V.J., and Seville, M.P. (1983). Relationships Between Extraction and Metabolism of Glucose, Blood Flow, and Tissue Blood Volume in Regions of Rat Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3, 291–302.

Cross, A.H., and Ku, G. (2000). Astrocytes and central nervous system endothelial cells do not express B7-1 (CD80) or B7-2 (CD86) immunoreactivity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 110, 76–82.

Cross, A.K., and Woodroffe, M.N. (1999). Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro. *Glia* 28, 183–189.

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.

Cserr, H.F., Harling-Berg, C.J., and Knopf, P.M. (1992). Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 2, 269–276.

D

D'Amato, R.J., Lipman, Z.P., and Snyder, S.H. (1986). Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. *Science* 231, 987–989.

Dai, Y., Vaught, T.D., Boone, J., Chen, S.-H., Phelps, C.J., Ball, S., Monahan, J.A., Jobst, P.M., McCreath, K.J., Lamborn, A.E., et al. (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 20, 251–255.

Dalmasso, A.P., Vercellotti, G.M., Fischel, R.J., Bolman, R.M., Bach, F.H., and Platt, J.L. (1992). Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am. J. Pathol.* 140, 1157–1166.

Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., and Kopin, I.J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1, 249–254.

Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 5 *Suppl.*, 1058–1061.

Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penney, D., Kassissieh, S., Dempsey, P., et al. (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.W., Pakzaban, P., Burns, L.H., Dinsmore, J., and Isacson, O. (1994). Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats. *Exp. Neurol.* 130, 151–167.

Defer, G.L., Geny, C., Ricolfi, F., Fenelon, G., Monfort, J.C., Remy, P., Villafane, G., Jeny, R., Samson, Y., Keravel, Y., et al. (1996). Long-term outcome of unilaterally transplanted parkinsonian patients. I. Clinical approach. *Brain J. Neurol.* 119 (*Pt 1*), 41–50.

Deleidi, M., Cooper, O., Hargus, G., Levy, A., and Isacson, O. (2011). Oct4-induced reprogramming is required for adult brain neural stem cell differentiation into midbrain dopaminergic neurons. *PloS One* 6, e19926.

- Deng, J., Petersen, B.E., Steindler, D.A., Jorgensen, M.L., and Laywell, E.D. (2006). Mesenchymal Stem Cells Spontaneously Express Neural Proteins in Culture and Are Neurogenic after Transplantation. *STEM CELLS* 24, 1054–1064.
- Depino, A.M., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., Del Rey, A., Pitossi, F.J., and Oertel, W.H. (2003). Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2731–2742.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial Import and Accumulation of α -Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic Neuronal Cultures and Parkinson Disease. *Brain. J. Biol. Chem.* 283, 9089–9100.
- Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., et al. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Invest.* 113, 1701–1710.
- Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., and Noël, D. (2007). Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *STEM CELLS* 25, 2025–2032.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.
- Dogali, M., Fazzini, E., Kolodny, E., Eidelberg, D., Sterio, D., Devinsky, O., and Berić, A. (1995). Stereotactic ventral pallidotomy for Parkinson's disease. *Neurology* 45, 753–761.
- Doi, D., Morizane, A., Kikuchi, T., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Motono, M., Sasai, Y., Saiki, H., Gomi, M., et al. (2012). Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 935–945.
- Doty, R.L., Stern, M.B., Pfeiffer, C., Gollomp, S.M., and Hurtig, H.I. (1992). Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 138–142.
- Dressel, R., Nolte, J., Elsner, L., Novota, P., Guan, K., Streckfuss-Bömeke, K., Hasenfuss, G., Jaenisch, R., and Engel, W. (2010). Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *FASEB J.* 24, 2164–2177.
- Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., and Benvenisty, N. (2002). Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9864–9869.
- Drukker, M., Katchman, H., Katz, G., Even-Tov Friedman, S., Shezen, E., Hornstein, E., Mandelboim, O., Reisner, Y., and Benvenisty, N. (2006). Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 221–229.

Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R.C., Gao, F., Bales, K.R., Triarhou, L.C., Chernet, E., Perry, K.W., Nelson, D.L.G., et al. (2001). Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14669–14674.

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. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 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., 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., Björklund, A., Stenevi, U., and Iversen, S.D. (1981). Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res.* 215, 147–161.

Dunnett, S.B., Björklund, A., and Lindvall, O. (2001). Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 365–369.

Durante, W., Kroll, M.H., Christodoulides, N., Peyton, K.J., and Schafer, A.I. (1997). Nitric Oxide Induces Heme Oxygenase-1 Gene Expression and Carbon Monoxide Production in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 80, 557–564.

Dziewczapolski, G., Lie, D.C., Ray, J., Gage, F.H., and Shults, C.W. (2003). Survival and differentiation of adult rat-derived neural progenitor cells transplanted to the striatum of hemiparkinsonian rats. *Exp. Neurol.* 183, 653–664.

E

Einstein, O., Karussis, D., Grigoriadis, N., Mizrachi-Kol, R., Reinhartz, E., Abramsky, O., and Ben-Hur, T. (2003). Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 1074–1082.

Einstein, O., Grigoriadis, N., Mizrachi-Kol, R., Reinhartz, E., Polyzoidou, E., Lavon, I., Milonas, I., Karussis, D., Abramsky, O., and Ben-Hur, T. (2006). Transplanted neural precursor cells reduce brain inflammation to attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp. Neurol.* 198, 275–284.

Einstein, O., Fainstein, N., Vaknin, I., Mizrachi-Kol, R., Reihartz, E., Grigoriadis, N., Lavon, I., Baniyash, M., Lassmann, H., and Ben-Hur, T. (2007). Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann. Neurol.* 61, 209–218.

Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P.J., Moisan, F., Galanaud, J.-P., Delemotte, B., Alperovitch, A., and Tzourio, C. (2009). Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 66, 494–504.

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.

Emborg, M.E., Liu, Y., Xi, J., Zhang, X., Yin, Y., Lu, J., Joers, V., Swanson, C., Holden, J.E., and Zhang, S.-C. (2013). Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells Survive and Mature in the Nonhuman Primate Brain. *Cell Reports* 3, 646–650.

Emgård, 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.

Emgård, M., Blomgren, K., and Brundin, P. (2002). Characterisation of cell damage and death in embryonic mesencephalic tissue: a study on ultrastructure, vital stains and protease activity. *Neuroscience* 115, 1177–1187.

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 2467–2474.

Engel, L., Checkoway, H., Keifer, M., Seixas, N., Longstreth, W., Scott, K., Hudnell, K., Anger, W., and Camicioli, R. (2001). Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup. Environ. Med.* 58, 582–589.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317.

Espejo, E.F., Montoro, R.J., Armengol, J.A., and López-Barneo, J. (1998). Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron* 20, 197–206.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Evans, J.R., Mason, S.L., and Barker, R.A. (2012). Current status of clinical trials of neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 200, 169–198.

F

Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991, 1–14.

Fainstein, N., Vaknin, I., Einstein, O., Zisman, P., Ben Sasson, S.Z., Baniyash, M., and Ben-Hur, T. (2008). Neural precursor cells inhibit multiple inflammatory signals. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 335–341.

Fairchild, P.J. (2010). The challenge of immunogenicity in the quest for induced pluripotency. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 868–875.

Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138–145.

Fiebig, U., Stephan, O., Kurth, R., and Denner, J. (2003). Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology* 307, 406–413.

Fink, J.S., Schumacher, J.M., Elias, S.L., Palmer, E.P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H.S., et al. (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant.* 9, 273–278.

Fink, K.D., Rossignol, J., Lu, M., Leveque, X., Hulse, T.D., Crane, A.T., Nerriere-Daguin, V., Wyse, R.D., Starski, P.A., Schloop, M.T., et al. (2013). Survival and Differentiation of Adenovirus-Generated Induced Pluripotent Stem Cells Transplanted into the Rat Striatum. *Cell Transplant.*

Finsen, B.R., Sørensen, 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.

Fishman, J.A. (1998). Infection and xenotransplantation. Developing strategies to minimize risk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862, 52–66.

Flügel, 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. Zurich Switz.* 10, 353–364.

Fontana, A., Fierz, W., and Wekerle, H. (1984). Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307, 273–276.

Di Fonzo, A., Rohé, C.F., Ferreira, J., Chien, H.F., Vacca, L., Stocchi, F., Guedes, L., Fabrizio, E., Manfredi, M., Vanacore, N., et al. (2005). A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *The Lancet* 365, 412–415.

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.

Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., and Samarut, J. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* 108, 3181–3188.

Freed, C.R., Breeze, R.E., Rosenberg, N.L., Schneck, S.A., Wells, T.H., Barrett, J.N., Grafton, S.T., Huang, S.C., Eidelberg, D., and Rottenberg, D.A. (1990). Transplantation of human fetal dopamine cells for Parkinson's disease. Results at 1 year. *Arch. Neurol.* 47, 505–512.

Freed, C.R., Breeze, R.E., Rosenberg, N.L., Schneck, S.A., Kriek, E., Qi, J.X., Lone, T., Zhang, Y.B., Snyder, J.A., and Wells, T.H. (1992). Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 327, 1549–1555.

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., et al. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 344, 710–719.

Freed, W.J., Morihisa, J.M., Spoor, E., Hoffer, B.J., Olson, L., Seiger, A., and Wyatt, R.J. (1981). Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature* 292, 351–352.

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., and Vingerhoets, F.J. (1995). Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 38, 379–388.

Freund, T.F., Bolam, J.P., Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., Powell, J.F., and Smith, A.D. (1985). Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 5, 603–616.

Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and Keiliss-Borok, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331–340.

Frigerio, R., Sanft, K.R., Grossardt, B.R., Peterson, B.J., Elbaz, A., Bower, J.H., Ahlskog, J.E., De Andrade, M., Maraganore, D.M., and Rocca, W.A. (2006). Chemical exposures and Parkinson's disease: A population-based case-control study. *Mov. Disord.* 21, 1688–1692.

Friling, S., Andersson, E., Thompson, L.H., Jönsson, M.E., Hebsgaard, J.B., Nanou, E., Alekseenko, Z., Marklund, U., Kjellander, S., Volakakis, N., et al. (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7613–7618.

Fritz, R.B., Wang, X., and Zhao, M.L. (2000). The fate of adoptively transferred quiescent encephalitogenic T cells in normal and antigen-tolerized mice. *J. Neuroimmunol.* 107, 66–72.

Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiya, S., Smith, A., et al. (2012). Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 1163–1173.

Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S., and Obata, F. (2005). An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann. Neurol.* 57, 918–921.

Furuse, M., Sasaki, H., and Tsukita, S. (1999). Manner of Interaction of Heterogeneous Claudin Species within and between Tight Junction Strands. *J. Cell Biol.* 147, 891–903.

G

Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438.

Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr, S.T., and Ray, J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11879–11883.

Galili, U. (1993). Evolution and pathophysiology of the human natural anti-alpha-galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer Semin. Immunopathol.* 15, 155–171.

Galili, U., Rachmilewitz, E.A., Peleg, A., and Flechner, I. (1984). A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J. Exp. Med.* 160, 1519–1531.

Galili, U., Anaraki, F., Thall, A., Hill-Black, C., and Radic, M. (1993). One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* 82, 2485–2493.

Galindo, L.T., Filippo, T.R.M., Semedo, P., Ariza, C.B., Moreira, C.M., Camara, N.O.S., and Porcionatto, M.A. (2011). Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury. *Neurol. Res. Int.* 2011, 564089.

Galli, R., Gritti, A., Bonfanti, L., and Vescovi, A.L. (2003). Neural Stem Cells An Overview. *Circ. Res.* 92, 598–608.

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.

Gao, H.-M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J.-S., and Liu, B. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 81, 1285–1297.

Gao, H.-M., Liu, B., Zhang, W., and Hong, J.-S. (2003). Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J.*

Gao, H.-M., Zhang, F., Zhou, H., Kam, W., Wilson, B., and Hong, J.-S. (2011). Neuroinflammation and α -Synuclein Dysfunction Potentiate Each Other, Driving Chronic Progression of Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 807–814.

Gash, D.M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W.A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P.A., Collins, F., et al. (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.

Gasser, T., Müller-Myhsok, B., Wszolek, Z.K., Oehlmann, R., Calne, D.B., Bonifati, V., Bereznoi, B., Fabrizio, E., Vieregge, P., and Horstmann, R.D. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat. Genet.* 18, 262–265.

Geeta, R., Ramnath, R.L., Rao, H.S., and Chandra, V. (2008). One year survival and significant reversal of motor deficits in parkinsonian rats transplanted with hESC derived dopaminergic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 258–264.

Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R., et al. (2007). Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 61, 219–227.

- Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., et al. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325, 433.
- Giannakopoulou, A., Grigoriadis, N., Polyzoidou, E., Touloumi, O., Michaloudi, E., and Papadopoulos, G.C. (2011a). Inflammatory changes induced by transplanted neural precursor cells in a multiple sclerosis model. *Neuroreport* 22, 68–72.
- Giannakopoulou, A., Grigoriadis, N., Polyzoidou, E., Lourbopoulos, A., Michaloudi, E., and Papadopoulos, G.C. (2011b). Time-dependent fate of transplanted neural precursor cells in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Exp. Neurol.* 230, 16–26.
- Gibb, W.R., and Lees, A.J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51, 745–752.
- Gilks, W.P., Abou-Sleiman, P.M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A.J., Shaw, K., Bhatia, K.P., Bonifati, V., Quinn, N.P., et al. (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *The Lancet* 365, 415–416.
- Gill, S.S., Patel, N.K., Hotton, G.R., O'Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., Brooks, D.J., Svendsen, C.N., and Heywood, P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med.* 9, 589–595.
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W.-F., and Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105, 2821–2827.
- Goetz, A.K., Scheffler, B., Chen, H.-X., Wang, S., Suslov, O., Xiang, H., Brüstle, O., Roper, S.N., and Steindler, D.A. (2006). Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11063–11068.
- Goetz, C.G., Olanow, C.W., Koller, W.C., Penn, R.D., Cahill, D., Morantz, R., Stebbins, G., Tanner, C.M., Klawans, H.L., and Shannon, K.M. (1989). Multicenter study of autologous adrenal medullary transplantation to the corpus striatum in patients with advanced Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 320, 337–341.
- Goetz, C.G., Stebbins, G.T., 3rd, Klawans, H.L., Koller, W.C., Grossman, R.G., Bakay, R.A., and Penn, R.D. (1991). United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. *Neurology* 41, 1719–1722.
- Goldman, J.E., Yen, S.H., Chiu, F.C., and Peress, N.S. (1983). Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* 221, 1082–1084.
- Gomi, M., Takagi, Y., Morizane, A., Doi, D., Nishimura, M., Miyamoto, S., and Takahashi, J. (2012). Functional recovery of the murine brain ischemia model using human induced pluripotent stem cell-derived telencephalic progenitors. *Brain Res.* 1459, 52–60.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., and Richardson, R.J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50, 1346–1350.

Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 481–488.

Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S., and Gross, C.G. (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286, 548–552.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.

Granger, D.N., and Kubes, P. (1994). The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 55, 662–675.

Gritti, A., Parati, E.A., Cova, L., Frölichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D., et al. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16, 1091–1100.

Gritti, A., Frölichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E.A., Cova, L., Pagano, S.F., Bjornson, C.R., and Vescovi, A.L. (1999). Epidermal and Fibroblast Growth Factors Behave as Mitogenic Regulators for a Single Multipotent Stem Cell-Like Population from the Subventricular Region of the Adult Mouse Forebrain. *J. Neurosci.* 19, 3287–3297.

H

Hagell, P., Schrag, A., Piccini, P., Jahanshahi, M., Brown, R., Rehncrona, S., Widner, H., Brundin, P., Rothwell, J.C., Odin, P., et al. (1999). Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain J. Neurol.* 122 (Pt 6), 1121–1132.

Hagell, P., Piccini, P., Björklund, A., Brundin, P., Rehncrona, S., Widner, H., Crabb, L., Pavese, N., Oertel, W.H., Quinn, N., et al. (2002). Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 5, 627–628.

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. Zurich Switz.* 8, 459–474.

Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155.

Hargus, G., Cooper, O., Deleidi, M., Levy, A., Lee, K., Marlow, E., Yow, A., Soldner, F., Hockemeyer, D., Hallett, P.J., et al. (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15921–15926.

Harris, V.K., Yan, Q.J., Vyshkina, T., Sahabi, S., Liu, X., and Sadiq, S.A. (2012a). Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 313, 167–177.

Harris, V.K., Faroqui, R., Vyshkina, T., and Sadiq, S.A. (2012b). Characterization of autologous mesenchymal stem cell-derived neural progenitors as a feasible source of stem cells for central nervous system applications in multiple sclerosis. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 536–547.

- 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.
- Harrower, T.P., Tyers, P., Hooks, Y., and Barker, R.A. (2006). Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 197, 56–69.
- Hartsfield, C.L., Alam, J., Cook, J.L., and Choi, A.M. (1997). Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 273, L980–988.
- Hatterer, E., Davoust, N., Didier-Bazes, M., Vauillat, C., Malcus, C., Belin, M.-F., and Nataf, S. (2006). How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* 107, 806–812.
- 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.
- Hawkes, C.H., Shephard, B.C., and Daniel, S.E. (1997). Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62, 436–446.
- Hawkins, R.A., O'Kane, R.L., Simpson, I.A., and Viña, J.R. (2006). Structure of the Blood–Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids. *J. Nutr.* 136, 218S–226S.
- He, Y., Appel, S., and Le, W. (2001). Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res.* 909, 187–193.
- Hedlund, E., Pruszek, J., Lardaro, T., Ludwig, W., Viñuela, A., Kim, K.-S., and Isacson, O. (2008). Embryonic stem cell-derived Pitx3-enhanced green fluorescent protein midbrain dopamine neurons survive enrichment by fluorescence-activated cell sorting and function in an animal model of Parkinson's disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1526–1536.
- Hely, M.A., Morris, J.G., Reid, W.G., O'Sullivan, D.J., Williamson, P.M., Rail, D., Broe, G.A., and Margrie, S. (1994). The Sydney Multicentre Study of Parkinson's disease: a randomised, prospective five year study comparing low dose bromocriptine with low dose levodopa-carbidopa. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 903–910.
- Herrera, A.J., Castaño, A., Venero, J.L., Cano, J., and Machado, A. (2000). The Single Intranigral Injection of LPS as a New Model for Studying the Selective Effects of Inflammatory Reactions on Dopaminergic System. *Neurobiol. Dis.* 7, 429–447.
- Hester, M.E., Song, S., Miranda, C.J., Eagle, A., Schwartz, P.H., and Kaspar, B.K. (2009). Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency. *PloS One* 4, e7044.
- Hickey, W.F. (1999). Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin. Immunol.* 11, 125–137.
- 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., and Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239, 290–292.

Hirschi, K.K., and D'Amore, P.A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* 32, 687–698.

HogenEsch, R.I., Koopmans, J., Copray, J.C., van Roon, W.M., Kema, I., Molenaar, G., Go, K.G., and Staal, M.J. (2000). Fetal porcine ventral mesencephalon graft. Determination of the optimal gestational age for implantation in parkinsonian patients. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 132, 345–350.

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.

Hori, J., Ng, T.F., Shatos, M., Klassen, H., Streilein, J.W., and Young, M.J. (2003). Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. *Stem Cells Dayt. Ohio* 21, 405–416.

Hori, S., Ohtsuki, S., Hosoya, K., Nakashima, E., and Terasaki, T. (2004). A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J. Neurochem.* 89, 503–513.

Hornykiewicz, O. (1966). Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18, 925–964.

Hudson, J.L., Bickford, P., Johansson, M., Hoffer, B.J., and Stromberg, I. (1994). Target and neurotransmitter specificity of fetal central nervous system transplants: importance for functional reinnervation. *J. Neurosci.* 14, 283–290.

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. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 77, 329–336.

Huisman, E., Uylings, H.B.M., and Hoogland, P.V. (2004). A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 19, 687–692.

Hunot, S., Boissière, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1996). Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 72, 355–363.

Ben-Hur, T., Einstein, O., Mizrachi-Kol, R., Ben-Menachem, O., Reinhartz, E., Karussis, D., and Abramsky, O. (2003a). Transplanted multipotential neural precursor cells migrate into the inflamed white matter in response to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 41, 73–80.

Ben-Hur, T., Ben-Menachem, O., Furer, V., Einstein, O., Mizrachi-Kol, R., and Grigoriadis, N. (2003b). Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 623–631.

Ben-Hur, T., Idelson, M., Khaner, H., Pera, M., Reinhartz, E., Itzik, A., and Reubinoff, B.E. (2004). Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 1246–1255.

I

Iacovitti, L., Donaldson, A.E., Marshall, C.E., Suon, S., and Yang, M. (2007). A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: Studies in vitro and in vivo. *Brain Res.* 1127, 19–25.

Imitola, J., Comabella, M., Chandraker, A.K., Dangond, F., Sayegh, M.H., Snyder, E.Y., and Khoury, S.J. (2004). Neural Stem/Progenitor Cells Express Costimulatory Molecules That Are Differentially Regulated by Inflammatory and Apoptotic Stimuli. *Am. J. Pathol.* 164, 1615–1625.

Irrcher, I., Aleyasin, H., Seifert, E.L., Hewitt, S.J., Chhabra, S., Phillips, M., Lutz, A.K., Rousseaux, M.W.C., Bevilacqua, L., Jahani-Asl, A., et al. (2010). Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3734–3746.

Isacson, O., and Deacon, T. (1997). Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *Trends Neurosci.* 20, 477–482.

Isacson, O., and Deacon, T.W. (1996). Specific axon guidance factors persist in the adult brain as demonstrated by pig neuroblasts transplanted to the rat. *Neuroscience* 75, 827–837.

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.

J

Jain, M., Armstrong, R.J.E., Tyers, P., Barker, R.A., and Rosser, A.E. (2003). GABAergic immunoreactivity is predominant in neurons derived from expanded human neural precursor cells in vitro. *Exp. Neurol.* 182, 113–123.

Janeway, C.A., Jr, Ron, J., and Katz, M.E. (1987). The B cell is the initiating antigen-presenting cell in peripheral lymph nodes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 138, 1051–1055.

Janzer, R.C., and Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253–257.

Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M., and Snyder, S.H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 2173–2177.

Jensen, M.B., Yan, H., Krishnaney-Davison, R., Al Sawaf, A., and Zhang, S.-C. (2011). Survival and Differentiation of Transplanted Neural Stem Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells in A Rat Stroke Model. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.*

Jensen, P., Pedersen, E.G., Zimmer, J., Widmer, H.R., and Meyer, M. (2008). Functional effect of FGF2- and FGF8-expanded ventral mesencephalic precursor cells in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1218, 13–20.

Jeong, S.-W., Chu, K., Jung, K.-H., Kim, S.U., Kim, M., and Roh, J.-K. (2003). Human Neural Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in Rats With Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 34, 2258–2263.

Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D., and Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105, 4120–4126.

Jin, R., Yang, G., and Li, G. (2010). Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol. Dis.* 38, 376–385.

Johanson, C.E., Duncan, J.A., Klinge, P.M., Brinker, T., Stopa, E.G., and Silverberg, G.D. (2008). Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* 5, 10.

Johansson, C.B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., and Frisén, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp. Cell Res.* 253, 733–736.

Johansson, S., Price, J., and Modo, M. (2008). Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 2444–2454.

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.

Jung, J., Hackett, N.R., Pergolizzi, R.G., Pierre-Destine, L., Krause, A., and Crystal, R.G. (2007). Ablation of tumor-derived stem cells transplanted to the central nervous system by genetic modification of embryonic stem cells with a suicide gene. *Hum. Gene Ther.* 18, 1182–1192.

K

Kalish, R.S. (1995). Antigen processing: the gateway to the immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32, 640–652.

Kalyani, A., Hobson, K., and Rao, M.S. (1997). Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev. Biol.* 186, 202–223.

Karman, J., Ling, C., Sandor, M., and Fabry, Z. (2004a). Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunol. Lett.* 92, 107–115.

Karman, J., Ling, C., Sandor, M., and Fabry, Z. (2004b). Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 2353–2361.

- Kassis, I., Grigoriadis, N., Gowda-Kurkalli, B., Mizrachi-Kol, R., Ben-Hur, T., Slavin, S., Abramsky, O., and Karussis, D. (2008). Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch. Neurol.* 65, 753–761.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I., and Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31–40.
- Kawasaki, H., Suemori, H., Mizuseki, K., Watanabe, K., Urano, F., Ichinose, H., Haruta, M., Takahashi, M., Yoshikawa, K., Nishikawa, S.-I., et al. (2002). Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1580–1585.
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Saiki, H., Miyamoto, S., and Takahashi, J. (2011). Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease. *J. Park. Dis.* 1, 395–412.
- Kim, H.-S., and Suh, Y.-H. (2009). Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav. Brain Res.* 196, 168–179.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, D.-W., Chung, S., Hwang, M., Ferree, A., Tsai, H.-C., Park, J.-J., Chung, S., Nam, T.S., Kang, U.J., Isacson, O., et al. (2006). Stromal Cell-Derived Inducing Activity, Nurr1, and Signaling Molecules Synergistically Induce Dopaminergic Neurons from Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 557–567.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araújo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., et al. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646–650.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Araújo-Bravo, M.J., and Schöler, H.R. (2009b). Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells. *Nat. Protoc.* 4, 1464–1470.
- Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Araújo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., et al. (2009c). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136, 411–419.
- Kim, J.B., Greber, B., Araújo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R. (2009d). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649–643.
- Kim, J.-H., Auerbach, J.M., Rodríguez-Gómez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.-H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., et al. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50–56.

- Kim, J.-Y., Koh, H.C., Lee, J.-Y., Chang, M.-Y., Kim, Y.-C., Chung, H.-Y., Son, H., Lee, Y.-S., Studer, L., McKay, R., et al. (2003). Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J. Neurochem.* 85, 1443–1454.
- Kim, W.-G., Mohny, R.P., Wilson, B., Jeohn, G.-H., Liu, B., and Hong, J.-S. (2000). Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia. *J. Neurosci.* 20, 6309–6316.
- Kim, Y.-J., Park, H.-J., Lee, G., Bang, O.Y., Ahn, Y.H., Joe, E., Kim, H.O., and Lee, P.H. (2009e). Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *Glia* 57, 13–23.
- Kim, Y.S., Kim, S.S., Cho, J.J., Choi, D.H., Hwang, O., Shin, D.H., Chun, H.S., Beal, M.F., and Joh, T.H. (2005). Matrix Metalloproteinase-3: A Novel Signaling Proteinase from Apoptotic Neuronal Cells That Activates Microglia. *J. Neurosci.* 25, 3701–3711.
- Kim, Y.S., Choi, D.H., Block, M.L., Lorenzl, S., Yang, L., Kim, Y.J., Sugama, S., Cho, B.P., Hwang, O., Browne, S.E., et al. (2007). A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB J.* 21, 179–187.
- Kirik, D., Rosenblad, C., Björklund, A., and Mandel, R.J. (2000). Long-Term rAAV-Mediated Gene Transfer of GDNF in the Rat Parkinson's Model: Intrastriatal But Not Intranigral Transduction Promotes Functional Regeneration in the Lesioned Nigrostriatal System. *J. Neurosci.* 20, 4686–4700.
- Kishore, A., Turnbull, I.M., Snow, B.J., Fuente-Fernandez, R. de la, Schulzer, M., Mak, E., Yardley, S., and Calne, D.B. (1997). Efficacy, stability and predictors of outcome of pallidotomy for Parkinson's disease. Six-month follow-up with additional 1-year observations. *Brain* 120, 729–737.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.
- Klassen, H.J., Imfeld, K.L., Kirov, I.I., Tai, L., Gage, F.H., Young, M.J., and Berman, M.A. (2003). Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine* 22, 101–106.
- 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. Baltim. Md* 1950 161, 692–701.
- Ko, J.-Y., Park, C.-H., Koh, H.-C., Cho, Y.-H., Kyhm, J.-H., Kim, Y.-S., Lee, I., Lee, Y.-S., and Lee, S.-H. (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source for human dopamine neurons. *J. Neurochem.* 103, 1417–1429.
- Ko, J.-Y., Lee, H.-S., Park, C.-H., Koh, H.-C., Lee, Y.-S., and Lee, S.-H. (2009). Conditions for tumor-free and dopamine neuron-enriched grafts after transplanting human ES cell-derived neural precursor cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1761–1770.

- Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K., et al. (2012). Pre-Evaluated Safe Human iPSC-Derived Neural Stem Cells Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Common Marmoset without Tumorigenicity. *PLoS One* 7.
- Koller, W.C., Hutton, J.T., Tolosa, E., and Capilldeo, R. (1999). Immediate-release and controlled-release carbidopa/levodopa in PD: a 5-year randomized multicenter study. Carbidopa/Levodopa Study Group. *Neurology* 53, 1012–1019.
- Kompoliti, K., Chu, Y., Shannon, K.M., and Kordower, J.H. (2007). Neuropathological study 16 years after autologous adrenal medullary transplantation in a Parkinson's disease patient. *Mov. Disord.* 22, 1630–1633.
- Kondoh, T., Pundt, L.L., Blount, J.P., Conrad, J.A., and Low, W.C. (1996). Transplantation of human fetal tissue from spontaneous abortions to a rodent model of Parkinson's disease. *Cell Transplant.* 5, 69–75.
- Kopyov, O.V., Jacques, D., Lieberman, A., Duma, C.M., and Rogers, R.L. (1996). Clinical study of fetal mesencephalic intracerebral transplants for the treatment of Parkinson's disease. *Cell Transplant.* 5, 327–337.
- Kordower, J.H., Cochran, E., Penn, R.D., and Goetz, C.G. (1991). Putative chromaffin cell survival and enhanced host-derived TH-fiber innervation following a functional adrenal medulla autograft for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 29, 405–412.
- 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., and Perl, D.P. (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., Rosenstein, J.M., Collier, T.J., Burke, M.A., Chen, E.Y., Li, J.M., Martel, L., Levey, A.E., Mufson, E.J., Freeman, T.B., et al. (1996). Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J. Comp. Neurol.* 370, 203–230.
- 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., et al. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290, 767–773.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008a). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* 14, 504–506.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Olanow, C.W., and Freeman, T.B. (2008b). Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 23, 2303–2306.
- Kornack, D.R., and Rakic, P. (2001). The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4752–4757.
- Kosaka, K., Oyanagi, S., Matsushita, M., and Hori, A. (1976). Presenile dementia with Alzheimer-, Pick- and Lewy-body changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 36, 221–233.

- Kozubenko, N., Turnovcova, K., Kapcalova, M., Butenko, O., Anderova, M., Rusnakova, V., Kubista, M., Hampl, A., Jendelova, P., and Sykova, E. (2010). Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant.* 19, 471–486.
- Krack, P., Pollak, P., Limousin, P., Hoffmann, D., Xie, J., Benazzouz, A., and Benabid, A.L. (1998). Subthalamic nucleus or internal pallidal stimulation in young onset Parkinson's disease. *Brain* 121, 451–457.
- Krack, P., Batir, A., Van Blercom, N., Chabardes, S., Fraix, V., Ardouin, C., Koudsie, A., Limousin, P.D., Benazzouz, A., LeBas, J.F., et al. (2003). Five-Year Follow-up of Bilateral Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Advanced Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* 349, 1925–1934.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., et al. (2006). Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 24, 386–398.
- Krenger, W., Falzarano, G., Delmonte, J.J., Snyder, K.M., Byon, J.C., and Ferrara, J.L. (1996). Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 88, 1113–1121.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–318.
- Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547–551.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106–108.
- Krystkowiak, P., Gaura, V., Labalette, M., Rialland, A., Remy, P., Peschanski, M., and Bachoud-Lévi, A.-C. (2007). Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease. *PloS One* 2, e166.
- Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D.N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4651–4655.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027–2033.
- Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L.B., O'Brien, T.F., Kusakabe, M., and Steindler, D.A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp. Neurol.* 156, 333–344.

L

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., et al. (2000). Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407, 90–94.

Laguna Goya, R., Busch, R., Mathur, R., Coles, A.J., and Barker, R.A. (2011). Human fetal neural precursor cells can up-regulate MHC class I and class II expression and elicit CD4 and CD8 T cell proliferation. *Neurobiol. Dis.* 41, 407–414.

Lai, B.C., Marion, S., Teschke, K., and Tsui, J.K. (2002a). Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 8, 297–309.

Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.-W., Cheong, H.-T., Greenstein, J.L., Im, G.-S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., et al. (2002b). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, 1089–1092.

Lang, A.E., and Lozano, A.M. (1998). Parkinson's disease. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339, 1130–1143.

Lang, A.E., Lozano, A.M., Montgomery, E., Duff, J., Tasker, R., and Hutchinson, W. (1997). Posteroventral medial pallidotomy in advanced Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 337, 1036–1042.

Lang, A.E., Gill, S., Patel, N.K., Lozano, A., Nutt, J.G., Penn, R., Brooks, D.J., Hotton, G., Moro, E., Heywood, P., et al. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 59, 459–466.

De Lange, E.C.M. (2004). Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1793–1809.

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., Forno, L.S., Tetrud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann. Neurol.* 46, 598–605.

Lanz, T.V., Opitz, C.A., Ho, P.P., Agrawal, A., Lutz, C., Weller, M., Mellor, A.L., Steinman, L., Wick, W., and Platten, M. (2010). Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Stem Cells Dev.* 19, 657–668.

Lanzavecchia, A. (1997). Understanding the Mechanisms of Sustained Signaling and T Cell Activation. *J. Exp. Med.* 185, 1717–1719.

Larsson, L.C., and Widner, H. (2000). Neural tissue xenografting. *Scand. J. Immunol.* 52, 249–256.

Larsson, L.C., Czech, K.A., Widner, H., and Korsgren, O. (1999). Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. *Transplantation* 68, 1153–1160.

- Larsson, L.C., Frielingsdorf, H., Mirza, B., Hansson, S.J., Anderson, P., Czech, K.A., Strandberg, M., and Widner, H. (2001a). Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp. Neurol.* 172, 100–114.
- Larsson, L.C., Anderson, P., Widner, H., and Korsgren, O. (2001b). 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., Corbascio, M., Pearson, T.C., Larsen, C.P., Ekberg, H., and Widner, H. (2003). Induction of operational tolerance to discordant dopaminergic porcine xenografts. *Transplantation* 75, 1448–1454.
- Laschinger, M., Vajkoczy, P., and Engelhardt, B. (2002). Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. *Eur. J. Immunol.* 32, 3598–3606.
- De Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5, 525–535.
- Lee, A., Kessler, J.D., Read, T.-A., Kaiser, C., Corbeil, D., Huttner, W.B., Johnson, J.E., and Wechsler-Reya, R.J. (2005a). Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat. Neurosci.* 8, 723–729.
- Lee, P.-C., Terasaki, P.I., Takemoto, S.K., Lee, P.-H., Hung, C.-J., Chen, Y.-L., Tsai, A., and Lei, H.-Y. (2002). All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74, 1192–1194.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., and McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 18, 675–679.
- Lee, S.-T., Chu, K., Park, J.-E., Lee, K., Kang, L., Kim, S.U., and Kim, M. (2005b). Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. *Neurosci. Res.* 52, 243–249.
- Lee, S.-T., Chu, K., Jung, K.-H., Kim, S.-J., Kim, D.-H., Kang, K.-M., Hong, N.H., Kim, J.-H., Ban, J.-J., Park, H.-K., et al. (2008). Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain J. Neurol.* 131, 616–629.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233–258.
- Levesque, S., Wilson, B., Gregoria, V., Thorpe, L.B., Dallas, S., Polikov, V.S., Hong, J.-S., and Block, M.L. (2010). Reactive microgliosis: extracellular γ -calpain and microglia-mediated dopaminergic neurotoxicity. *Brain* 133, 808–821.
- Levy, Y.S., Bahat-Stroomza, M., Barzilay, R., Burshtein, A., Bulvik, S., Barhum, Y., Panet, H., Melamed, E., and Offen, D. (2008). Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. *Cytotherapy* 10, 340–352.

- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehnacrona, S., Björklund, A., et al. (2008a). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503.
- Li, L., Baroja, M.L., Majumdar, A., Chadwick, K., Rouleau, A., Gallacher, L., Ferber, I., Lebkowski, J., Martin, T., Madrenas, J., et al. (2004). Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 448–456.
- Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., and Smith, A. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr. Biol. CB* 8, 971–974.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.-L., et al. (2008b). Germline Competent Embryonic Stem Cells Derived from Rat Blastocysts. *Cell* 135, 1299–1310.
- 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.
- Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* 5, 1403–1409.
- Liker, M.A., Petzinger, G.M., Nixon, K., McNeill, T., and Jakowec, M.W. (2003). Human neural stem cell transplantation in the MPTP-lesioned mouse. *Brain Res.* 971, 168–177.
- Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Le Bas, J.F., Broussolle, E., Perret, J.E., and Benabid, A.L. (1995). Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345, 91–95.
- 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, C.-Y., Peng, C.-Y., Huang, T.-T., Wu, M.-L., Lai, Y.-L., Peng, D.H., Chen, P.-F., Chen, H.-F., Yen, B.L., Wu, K.K., et al. (2012). Exacerbation of oxidative stress-induced cell death and differentiation in induced pluripotent stem cells lacking heme oxygenase-1. *Stem Cells Dev.* 21, 1675–1687.
- Lindvall, O., Backlund, E.O., Farde, L., Sedvall, G., Freedman, R., Hoffer, B., Nobin, A., Seiger, A., and Olson, L. (1987). Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann. Neurol.* 22, 457–468.
- Lindvall, O., Rehnacrona, S., Gustavii, B., Brundin, P., Astedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Björklund, A., Leenders, K.L., Rothwell, J.C., et al. (1988). Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease. *Lancet* 2, 1483–1484.

- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., and Marsden, C.D. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247, 574–577.
- Lindvall, O., Widner, H., Rehnström, S., Brundin, P., Odin, P., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., and Rothwell, J.C. (1992). Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol.* 31, 155–165.
- Lindvall, O., Sawle, G., Widner, H., Rothwell, J.C., Björklund, A., Brooks, D., Brundin, P., Frackowiak, R., Marsden, C.D., and Odin, P. (1994). Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 35, 172–180.
- Ling, Z.D., Potter, E.D., Lipton, J.W., and Carvey, P.M. (1998). Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp. Neurol.* 149, 411–423.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174, 561–569.
- Liou, H.H., Tsai, M.C., Chen, C.J., Jeng, J.S., Chang, Y.C., Chen, S.Y., and Chen, R.C. (1997). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48, 1583–1588.
- Lippa, C.F., Fujiwara, H., Mann, D.M.A., Giasson, B., Baba, M., Schmidt, M.L., Nee, L.E., O'Connell, B., Pollen, D.A., St. George-Hyslop, P., et al. (1998). Lewy Bodies Contain Altered α -Synuclein in Brains of Many Familial Alzheimer's Disease Patients with Mutations in Presenilin and Amyloid Precursor Protein Genes. *Am. J. Pathol.* 153, 1365–1370.
- Liu, B., Jiang, J.-W., Wilson, B.C., Du, L., Yang, S.-N., Wang, J.-Y., Wu, G.-C., Cao, X.-D., and Hong, J.-S. (2000a). Systemic Infusion of Naloxone Reduces Degeneration of Rat Substantia Nigral Dopaminergic Neurons Induced by Intranigral Injection of Lipopolysaccharide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 125–132.
- Liu, B., Du, L., and Hong, J.-S. (2000b). Naloxone Protects Rat Dopaminergic Neurons against Inflammatory Damage through Inhibition of Microglia Activation and Superoxide Generation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 607–617.
- Liu, B., Du, L., Kong, L.-Y., Hudson, P., Wilson, B., Chang, R., Abel, H., and Hong, J.-S. (2000c). Reduction by naloxone of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron–glia co-cultures. *Neuroscience* 97, 749–756.
- Liu, J., Götherström, C., Forsberg, M., Samuelsson, E.-B., Wu, J., Calzarossa, C., Hovatta, O., Sundström, E., and Akesson, E. (2013a). Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials in vitro. *Stem Cell Res.* 10, 325–337.
- Liu, P., Chen, S., Li, X., Qin, L., Huang, K., Wang, L., Huang, W., Li, S., Jia, B., Zhong, M., et al. (2013b). Low immunogenicity of neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells derived from less immunogenic somatic cells. *PloS One* 8, e69617.

- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., and Lansbury Jr., P.T. (2002). The UCH-L1 Gene Encodes Two Opposing Enzymatic Activities that Affect α -Synuclein Degradation and Parkinson's Disease Susceptibility. *Cell* 111, 209–218.
- Lockhart, P.J., Lincoln, S., Hulihan, M., Kachergus, J., Wilkes, K., Bisceglia, G., Mash, D.C., and Farrer, M.J. (2004). DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function. *J. Med. Genet.* 41, e22.
- Loddick, S.A., Liu, C., Takao, T., Hashimoto, K., and De Souza, E.B. (1998). Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 306–319.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2074–2077.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145–1148.
- Lotharius, J., and Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 932–942.
- Loughlin, A.J., Woodroffe, M.N., and Cuzner, M.L. (1993). Modulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II and Fc receptor expression on isolated microglia by transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, noradrenaline and glucocorticoids. *Immunology* 79, 125–130.
- Lu, L., Zhao, C., Liu, Y., Sun, X., Duan, C., Ji, M., Zhao, H., Xu, Q., and Yang, H. (2005). Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 15, 46–51.
- Lu, P., Jones, L.L., Snyder, E.Y., and Tuszynski, M.H. (2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 181, 115–129.
- Lu, X., Bing, G., and Hagg, T. (2000). Naloxone prevents microglia-induced degeneration of dopaminergic substantia nigra neurons in adult rats. *Neuroscience* 97, 285–291.
- Lucas, S.-M., Rothwell, N.J., and Gibson, R.M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* 147, S232–S240.
- Lücking, C.B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Denèfle, P., Wood, N.W., et al. (2000). Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N. Engl. J. Med.* 342, 1560–1567.
- Luquin, M.R., Montoro, R.J., Guillén, J., Saldise, L., Insausti, R., Del Río, J., and López-Barneo, J. (1999). Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron* 22, 743–750.

M

Ma, Y., Feigin, A., Dhawan, V., Fukuda, M., Shi, Q., Greene, P., Breeze, R., Fahn, S., Freed, C., and Eidelberg, D. (2002). Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: a PET study. *Ann. Neurol.* 52, 628–634.

Ma, Y., Tang, C., Chaly, T., Greene, P., Breeze, R., Fahn, S., Freed, C., Dhawan, V., and Eidelberg, D. (2010). Dopamine Cell Implantation in Parkinson's Disease: Long-Term Clinical and 18F-FDOPA PET Outcomes. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 51, 7–15.

Maccario, R., Podesta, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., Daudt, L., Ibatucci, A., Piaggio, G., Pozzi, S., et al. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90, 516–525.

Madrazo, I., Drucker-Colín, R., Díaz, V., Martínez-Mata, J., Torres, C., and Becerril, J.J. (1987). Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 316, 831–834.

Man, S., Ubogu, E.E., and Ransohoff, R.M. (2007). Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 17, 243–250.

Marks, W.J., Jr, Ostrem, J.L., Verhagen, L., Starr, P.A., Larson, P.S., Bakay, R.A., Taylor, R., Cahn-Weiner, D.A., Stoessl, A.J., Olanow, C.W., et al. (2008). Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.* 7, 400–408.

Marks, W.J., Jr, Bartus, R.T., Siffert, J., Davis, C.S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., et al. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 9, 1164–1172.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634–7638.

Martin, C., Plat, M., Nerrière-Daguin, V., Coulon, F., Uzbekova, S., Venturi, E., Condé, F., Hermel, J.-M., Hantraye, P., Tesson, L., et al. (2005). Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. *Transgenic Res.* 14, 373–384.

Martinat, C., Bacci, J.-J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W.B., Newman, A.H., Cha, J.H., Gether, U., Wang, H., and Abeliovich, A. (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2874–2879.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., et al. (1998). Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117–127.

- Mato, M., Ookawara, S., Sakamoto, A., Aikawa, E., Ogawa, T., Mitsuhashi, U., Masuzawa, T., Suzuki, H., Honda, M., Yazaki, Y., et al. (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.
- Matsui, T., Akamatsu, W., Nakamura, M., and Okano, H. (2012). Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: Basic concepts and potential application for cell replacement therapy. *Exp. Neurol.*
- Matsumoto, Y., Kawai, K., and Fujiwara, M. (1989). In situ Ia expression on brain cells in the rat: autoimmune encephalomyelitis-resistant strain (BN) and susceptible strain (Lewis) compared. *Immunology* 66, 621–627.
- Matter, K., and Balda, M.S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 225–236.
- 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.
- McBride, J.L., Behrstock, S.P., Chen, E.-Y., Jakel, R.J., Siegel, I., Svendsen, C.N., and Kordower, J.H. (2004). Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J. Comp. Neurol.* 475, 211–219.
- McCormack, A.L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A.B., Thiffault, C., Langston, J.W., Cory-Slechta, D.A., and Di Monte, D.A. (2002). Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat. *Neurobiol. Dis.* 10, 119–127.
- McGeer, P.L., Schwab, C., Parent, A., and Doudet, D. (2003). Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann. Neurol.* 54, 599–604.
- McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66–71.
- McLaren, F.H., Svendsen, C.N., Van der Meide, P., and Joly, E. (2001). Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. *J. Neuroimmunol.* 112, 35–46.
- 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.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29, 58–69.
- Medgyesi, G.A., Miklós, K., Kulics, J., Füst, G., Gergely, J., and Bazin, H. (1981). Classes and subclasses of rat antibodies: reaction with the antigen and interaction of the complex with the complement system. *Immunology* 43, 171–176.

- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619–4621.
- Meissner, K.K., Kirkham, D.L., and Doering, L.C. (2005). Transplants of neurosphere cell suspensions from aged mice are functional in the mouse model of Parkinson's. *Brain Res.* 1057, 105–112.
- Melchior, B., Rémy, S., Nerrière-Daguin, V., Heslan, J.-M., Soulillou, J.-P., and Brachet, P. (2002). Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 68, 284–292.
- Mendez, I., Vinuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J.Q., et al. (2008). Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat. Med.* 14, 507–509.
- Ménoret, S., Iscache, A.-L., Tesson, L., Rémy, S., Usal, C., Osborn, M.J., Cost, G.J., Brüggemann, M., Buelow, R., and Anegón, I. (2010). Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur. J. Immunol.* 40, 2932–2941.
- Michel, D.C., Nerrière-Daguin, V., Josien, R., Brachet, P., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2006). Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. *Exp. Neurol.* 202, 76–84.
- Michel-Monigadon, D., Nerrière-Daguin, V., Lévêque, X., Plat, M., Venturi, E., Brachet, P., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2010). Minocycline promotes long-term survival of neuronal transplant in the brain by inhibiting late microglial activation and T-cell recruitment. *Transplantation* 89, 816–823.
- Michel-Monigadon, D., Bonnamain, V., Nerrière-Daguin, V., Dugast, A.-S., Lévêque, X., Plat, M., Venturi, E., Brachet, P., Anegón, I., Vanhove, B., et al. (2011). Trophic and immunoregulatory properties of neural precursor cells: benefit for intracerebral transplantation. *Exp. Neurol.* 230, 35–47.
- Minguez-Castellanos, A., Escamilla-Sevilla, F., Hotton, G.R., Toledo-Aral, J.J., Ortega-Moreno, A., Mendez-Ferrer, S., Martín-Linares, J.M., Katati, M.J., Mir, P., Villadiego, J., et al. (2007). Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78, 825–831.
- Modo, M., Rezaie, P., Heuschling, P., Patel, S., Male, D.K., and Hodges, H. (2002). Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res.* 958, 70–82.
- Mohamad, O., Drury-Stewart, D., Song, M., Faulkner, B., Chen, D., Yu, S.P., and Wei, L. (2013). Vector-Free and Transgene-Free Human iPS Cells Differentiate into Functional Neurons and Enhance Functional Recovery after Ischemic Stroke in Mice. *PLoS One* 8.
- Molenaar, G.J., Hogenesch, R.I., Sprengers, M.E., and Staal, M.J. (1997). Ontogenesis of embryonic porcine ventral mesencephalon in the perspective of its potential use as a xenograft in Parkinson's disease. *J. Comp. Neurol.* 382, 19–28.

Monson, N.L. (2008). The natural history of B cells. *Curr. Opin. Neurol.* 21 Suppl 1, S3–8.

Moreau, A., Hill, M., Thébault, P., Deschamps, J.Y., Chiffolleau, E., Chauveau, C., Moullier, P., Anegón, I., Alliot-Licht, B., and Cuturi, M.C. (2009). Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3070–3077.

Morizane, A., Takahashi, J., Takagi, Y., Sasai, Y., and Hashimoto, N. (2002). Optimal conditions for in vivo induction of dopaminergic neurons from embryonic stem cells through stromal cell-derived inducing activity. *J. Neurosci. Res.* 69, 934–939.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* 136, 2348–2357.

Muraoka, K., Shingo, T., Yasuhara, T., Kameda, M., Yuan, W., Hayase, H., Matsui, T., Miyoshi, Y., and Date, I. (2006). The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 199, 311–327.

N

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochizuki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106.

Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., and Kurihara, T. (2001). Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J. Neurosci. Res.* 65, 322–331.

Nakatsuji, N., Nakajima, F., and Tokunaga, K. (2008). HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat. Biotechnol.* 26, 739–740.

Nauta, A.J., and Fibbe, W.E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499–3506.

Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34⁺-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 177, 2080–2087.

Neumann, H., Cavalié, A., Jenne, D.E., and Wekerle, H. (1995). Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269, 549–552.

Neumann, H., Schmidt, H., Cavalié, 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)- γ and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α ? *J. Exp. Med.* 185, 305–316.

Nichols, W.C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisán-Ruiz, C., Jain, S., Halter, C.A., Michaels, V.E., Reed, T., Rudolph, A., Shults, C.W., et al. (2005). Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *The Lancet* 365, 410–412.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838–3843.

Niedbala, W., Cai, B., and Liew, F.Y. (2006). Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann. Rheum. Dis.* 65, iii37–iii40.

Nikceovich, K.M., Gordon, K.B., Tan, L., Hurst, S.D., Kroepfl, J.F., Gardinier, M., Barrett, T.A., and Miller, S.D. (1997). IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 158, 614–621.

Nikkhah, G., Bentlage, C., Cunningham, M.G., and Bjorklund, A. (1994). Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J. Neurosci.* 14, 3449–3461.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19–28.

NINDS NET-PD Investigators (2008). A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clin. Neuropharmacol.* 31, 141–150.

Nitta, T., Yagita, H., Sato, K., and Okumura, K. (1992). Expression of Fc γ receptors on astroglial cell lines and their role in the central nervous system. *Neurosurgery* 31, 83–87; discussion 87–88.

Nori, S., Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., et al. (2011). Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16825–16830.

Nutt, J.G., Burchiel, K.J., Comella, C.L., Jankovic, J., Lang, A.E., Laws, E.R., Jr, Lozano, A.M., Penn, R.D., Simpson, R.K., Jr, Stacy, M., et al. (2003). Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60, 69–73.

O

Odeberg, J., Piao, J.-H., Samuelsson, E.-B., Falci, S., and Akesson, E. (2005). Low immunogenicity of in vitro-expanded human neural cells despite high MHC expression. *J. Neuroimmunol.* 161, 1–11.

Oki, K., Tatarishvili, J., Wood, J., Koch, P., Wattananit, S., Mine, Y., Monni, E., Tornero, D., Ahlenius, H., Ladewig, J., et al. (2012). Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 1120–1133.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.

Okun, E., Mattson, M.P., and Arumugam, T.V. (2010). Involvement of Fc receptors in disorders of the central nervous system. *Neuromolecular Med.* 12, 164–178.

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., Koller, W., Goetz, C.G., Stebbins, G.T., Cahill, D.W., Gauger, L.L., Morantz, R., Penn, R.D., Tanner, C.M., and Klawans, H.L. (1990). Autologous transplantation of adrenal medulla in Parkinson's disease. 18-month results. *Arch. Neurol.* 47, 1286–1289.

Olanow, C.W., Goetz, C.G., Kordower, J.H., Stoessl, A.J., Sossi, V., Brin, M.F., Shannon, K.M., Nauert, G.M., Perl, D.P., Godbold, J., et al. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 54, 403–414.

Olanow, C.W., Stern, M.B., and Sethi, K. (2009a). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72, S1–136.

Olanow, C.W., Gracies, J.-M., Goetz, C.G., Stoessl, A.J., Freeman, T., Kordower, J.H., Godbold, J., and Obeso, J.A. (2009b). Clinical pattern and risk factors for dyskinesias following fetal nigral transplantation in Parkinson's disease: a double blind video-based analysis. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 24, 336–343.

Oliveira, S.A., Scott, W.K., Martin, E.R., Nance, M.A., Watts, R.L., Hubble, J.P., Koller, W.C., Pahwa, R., Stern, M.B., Hiner, B.C., et al. (2003). Parkin mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53, 624–629.

Öllinger, R., and Pratschke, J. (2010). Role of heme oxygenase-1 in transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 23, 1071–1081.

Ourednik, J., Ourednik, V., Lynch, W.P., Schachner, M., and Snyder, E.Y. (2002). Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nat. Biotechnol.* 20, 1103–1110.

Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci.* 1988, 63–76.

P

Pae, H.-O., Oh, G.-S., Choi, B.-M., Chae, S.-C., Kim, Y.-M., Chung, K.-R., and Chung, H.-T. (2004). Carbon Monoxide Produced by Heme Oxygenase-1 Suppresses T Cell Proliferation via Inhibition of IL-2 Production. *J. Immunol.* 172, 4744–4751.

Pahwa, R., Wilkinson, S., Smith, D., Lyons, K., Miyawaki, E., and Koller, W.C. (1997). High-frequency stimulation of the globus pallidus for the treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 49, 249–253.

Paisán-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simón, J., van der Brug, M., López de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., et al. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44, 595–600.

Pakzaban, P., and Isacson, O. (1994). Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience* 62, 989–1001.

- Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., and Shen, J. (2004). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in parkin-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 279, 18614–18622.
- Pålhagen, S., Heinonen, E., Hägglund, J., Kaugesaar, T., Mäki-Ikola, O., Palm, R., and Swedish Parkinson Study Group (2006). Selegiline slows the progression of the symptoms of Parkinson disease. *Neurology* 66, 1200–1206.
- Palmer, T.D., Schwartz, P.H., Taupin, P., Kaspar, B., Stein, S.A., and Gage, F.H. (2001). Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411, 42–43.
- 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.
- Parish, C.L., Castelo-Branco, G., Rawal, N., Tonnesen, J., Sorensen, A.T., Salto, C., Kokaia, M., Lindvall, O., and Arenas, E. (2008). Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J. Clin. Invest.* 118, 149–160.
- Park, C.-H., Minn, Y.-K., Lee, J.-Y., Choi, D.H., Chang, M.-Y., Shim, J.-W., Ko, J.-Y., Koh, H.-C., Kang, M.J., Kang, J.S., et al. (2005). In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J. Neurochem.* 92, 1265–1276.
- Park, H.J., Lee, P.H., Bang, O.Y., Lee, G., and Ahn, Y.H. (2008a). Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 107, 141–151.
- Park, H.-J., Shin, J.Y., Lee, B.R., Kim, H.O., and Lee, P.H. (2012). Mesenchymal Stem Cells Augment Neurogenesis in the Subventricular Zone and Enhance Differentiation of Neural Precursor Cells Into Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra of a Parkinsonian Model. *Cell Transplant.* 21, 1629–1640.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008b). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886.
- Park, M.A., Li, J.T., Hagan, J.B., Maddox, D.E., and Abraham, R.S. (2008c). Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet* 372, 489–502.
- Park, S., Lee, K.S., Lee, Y.J., Shin, H.A., Cho, H.Y., Wang, K.C., Kim, Y.S., Lee, H.T., Chung, K.S., Kim, E.Y., et al. (2004). Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neurosci. Lett.* 359, 99–103.
- Patel, N.K., Bunnage, M., Plaha, P., Svendsen, C.N., Heywood, P., and Gill, S.S. (2005). Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann. Neurol.* 57, 298–302.
- Patience, C., Takeuchi, Y., and Weiss, R.A. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3, 282–286.

- Pender, M.P. (2007). Treating autoimmune demyelination by augmenting lymphocyte apoptosis in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* *191*, 26–38.
- Pérez-Rodríguez, R., Roncero, C., Oliván, A.M., González, M.P., and Oset-Gasque, M.J. (2009). Signaling mechanisms of interferon gamma induced apoptosis in chromaffin cells: involvement of nNOS, iNOS, and NFkappaB. *J. Neurochem.* *108*, 1083–1096.
- 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.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12543–12548.
- Perry, V.H. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* *90*, 113–121.
- Perry, V.H., and Gordon, S. (1987). Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J. Exp. Med.* *166*, 1138–1143.
- Peschanski, M., Defer, G., N’Guyen, J.P., Ricolfi, F., Monfort, J.C., Remy, P., Geny, C., Samson, Y., Hantraye, P., and Jeny, R. (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 J. Neurol.* *117 (Pt 3)*, 487–499.
- Petty, M.A., and Lo, E.H. (2002). Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog. Neurobiol.* *68*, 311–323.
- Pfeiffer, R.F. (2003). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson’s disease. *Lancet Neurol.* *2*, 107–116.
- Pfisterer, U., Wood, J., Nihlberg, K., Hallgren, O., Bjerner, L., Westergren-Thorsson, G., Lindvall, O., and Parmar, M. (2011a). Efficient induction of functional neurons from adult human fibroblasts. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 3311–3316.
- Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2011b). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10343–10348.
- Phelps, C.J., Koike, C., Vaught, T.D., Boone, J., Wells, K.D., Chen, S.-H., Ball, S., Specht, S.M., Polejaeva, I.A., Monahan, J.A., et al. (2003). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* *299*, 411–414.
- Piccini, P., Brooks, D.J., Björklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., et al. (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson’s patient. *Nat. Neurosci.* *2*, 1137–1140.
- Piccini, P., Lindvall, O., Björklund, A., Brundin, P., Hagell, P., Ceravolo, R., Oertel, W., Quinn, N., Samuel, M., Rehncrona, S., et al. (2000). Delayed recovery of movement-related

cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann. Neurol.* 48, 689–695.

Piccini, P., Pavese, N., Hagell, P., Reimer, J., Björklund, A., Oertel, W.H., Quinn, N.P., Brooks, D.J., and Lindvall, O. (2005). Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in Parkinson's disease. *Brain* 128, 2977–2986.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.

Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., et al. (2003). Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422, 688–694.

Pluchino, S., Zanotti, L., Rossi, B., Brambilla, E., Ottoboni, L., Salani, G., Martinello, M., Cattalini, A., Bergami, A., Furlan, R., et al. (2005). Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 436, 266–271.

Pluchino, S., Gritti, A., Blezer, E., Amadio, S., Brambilla, E., Borsellino, G., Cossetti, C., Del Carro, U., Comi, G., 't Hart, B., et al. (2009a). Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Ann. Neurol.* 66, 343–354.

Pluchino, S., Zanotti, L., Brambilla, E., Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Alfaro-Cervello, C., Salani, G., Cossetti, C., Borsellino, G., Battistini, L., et al. (2009b). Immune regulatory neural stem/precursor cells protect from central nervous system autoimmunity by restraining dendritic cell function. *PloS One* 4, e5959.

Pober, J.S., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Lapierre, L.A., Fiers, W., and Gimbrone, M.A., Jr (1986). Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 136, 1680–1687.

Politis, M., and Lindvall, O. (2012). Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med.* 10, 1.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.

Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001–1020.

Preynat-Seauve, O., de Rham, C., Tirefort, D., Ferrari-Lacraz, S., Krause, K.-H., and Villard, J. (2009). Neural progenitors derived from human embryonic stem cells are targeted by allogeneic T and natural killer cells. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 3556–3569.

Priyadarshi, A., Khuder, S.A., Schaub, E.A., and Priyadarshi, S.S. (2001). Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: A Metaanalysis. *Environ. Res.* 86, 122–127.

Prusa, A.-R., Marton, E., Rosner, M., Bettelheim, D., Lubec, G., Pollack, A., Bernaschek, G., and Hengstschläger, M. (2004). Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191, 309–314.

Pruszek, J., Sonntag, K.-C., Aung, M.H., Sanchez-Pernaute, R., and Isacson, O. (2007). Markers and Methods for Cell Sorting of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Cell Populations. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2257–2268.

Q

Quintero, E.M., Willis, L., Singleton, R., Harris, N., Huang, P., Bhat, N., and Granholm, A.-C. (2006). Behavioral and morphological effects of minocycline in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1093, 198–207.

R

Rafei, M., Birman, E., Forner, K., and Galipeau, J. (2009). Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1799–1803.

Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, E.W.-F., Soeiro, I., Lombardi, G., and Dazzi, F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83, 71–76.

Ramasamy, R., Tong, C.K., Seow, H.F., Vidyadaran, S., and Dazzi, F. (2008). The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell. Immunol.* 251, 131–136.

Ramsauer, M., Krause, D., and Dermietzel, R. (2002). Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J.*

Ransohoff, R.M., Kivisäkk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569–581.

Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76, 1208–1213.

Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res.* 305, 33–41.

Redmond, D.E., Jr, Bjugstad, K.B., Teng, Y.D., Ourednik, V., Ourednik, J., Wakeman, D.R., Parsons, X.H., Gonzalez, R., Blanchard, B.C., Kim, S.U., et al. (2007). Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12175–12180.

Remy, P., Samson, Y., Hantraye, P., Fontaine, A., Defer, G., Mangin, J.F., Fénelon, G., Gény, C., Ricolfi, F., and Frouin, V. (1995). Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients. *Ann. Neurol.* 38, 580–588.

- Rémy, S., Canova, C., Daguin-Nerrière, V., Martin, C., Melchior, B., Neveu, I., Charreau, B., Souillou, J.P., and Brachet, P. (2001). Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotransplantation* 8, 136–148.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141–150.
- Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L’huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A.I., Ji, W., et al. (2009). Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. *STEM CELLS* 27, 1954–1962.
- Rengarajan, J., Szabo, S.J., and Glimcher, L.H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today* 21, 479–483.
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1134–1140.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and Population Analyses Demonstrate That an EGF-Responsive Mammalian Embryonic CNS Precursor Is a Stem Cell. *Dev. Biol.* 175, 1–13.
- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565–4574.
- Rhee, Y.-H., Ko, J.-Y., Chang, M.-Y., Yi, S.-H., Kim, D., Kim, C.-H., Shim, J.-W., Jo, A.-Y., Kim, B.-W., Lee, H., et al. (2011). Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 121, 2326–2335.
- Rogaeva E, J.J. (2004). ANalysis of the pink1 gene in a large cohort of cases with parkinson disease. *Arch. Neurol.* 61, 1898–1904.
- Rogers, I., and Casper, R.F. (2004). Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18, 893–908.
- Rossignol, J., Boyer, C., Thinard, R., Remy, S., Dugast, A.-S., Dubayle, D., Dey, N.D., Boeffard, F., Delecrin, J., Heymann, D., et al. (2009). Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2547–2558.
- Rossignol, J., Boyer, C., Lévêque, X., Fink, K.D., Thinard, R., Blanchard, F., Dunbar, G.L., and Lescaudron, L. (2011). Mesenchymal stem cell transplantation and DMEM administration in a 3NP rat model of Huntington’s disease: morphological and behavioral outcomes. *Behav. Brain Res.* 217, 369–378.

Rothwell, N., Allan, S., and Toulmond, S. (1997). The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J. Clin. Invest.* 100, 2648–2652.

Roussa, E., and Kriegstein, K. (2004). GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres. *Neurosci. Lett.* 361, 52–55.

Roy, N.S., Cleren, C., Singh, S.K., Yang, L., Beal, M.F., and Goldman, S.A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat. Med.* 12, 1259–1268.

Rubin, L.L., and Staddon, J.M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 11–28.

Russell, J.H., White, C.L., Loh, D.Y., and Meleedy-Rey, P. (1991). Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2151–2155.

Ryter, S.W., Alam, J., and Choi, A.M.K. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol. Rev.* 86, 583–650.

Ryu, J.K., Kim, J., Cho, S.J., Hatori, K., Nagai, A., Choi, H.B., Lee, M.C., McLarnon, J.G., and Kim, S.U. (2004). Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* 16, 68–77.

S

Sad, S., Kägi, D., and Mosmann, T.R. (1996). Perforin and Fas killing by CD8⁺ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. *J. Exp. Med.* 184, 1543–1547.

Samuel, M., Caputo, E., Brooks, D.J., Schrag, A., Scaravilli, T., Branston, N.M., Rothwell, J.C., Marsden, C.D., Thomas, D.G., Lees, A.J., et al. (1998). A study of medial pallidotomy for Parkinson's disease: clinical outcome, MRI location and complications. *Brain* 121, 59–75.

Sánchez-Danés, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jiménez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerro, M., Patel, B., Giral, A., et al. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol. Med.* 4, 380–395.

Sanchez-Pernaute, R., Lee, H., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Yoshizaki, T., Sonntag, K.C., Studer, L., and Isacson, O. (2008). Parthenogenetic dopamine neurons from primate embryonic stem cells restore function in experimental Parkinson's disease. *Brain* 131, 2127–2139.

Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., et al. (2000). Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro. *Exp. Neurol.* 164, 247–256.

Sandrin, M.S., Vaughan, H.A., Dabkowski, P.L., and McKenzie, I.F. (1993). Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11391–11395.

Saoudi, A., Kuhn, J., Huygen, K., de Kozak, Y., Velu, T., Goldman, M., Druet, P., and Bellon, B. (1993). TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* *23*, 3096–3103.

Sato, K., Balla, J., Otterbein, L., Smith, R.N., Brouard, S., Lin, Y., Csizmadia, E., Sevigny, J., Robson, S.C., Vercellotti, G., et al. (2001). Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase-1 Suppresses the Rejection of Mouse-to-Rat Cardiac Transplants. *J. Immunol.* *166*, 4185–4194.

Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* *109*, 228–234.

Sauer, H., Frodl, E.M., Kupsch, A., ten Bruggencate, G., and Oertel, W.H. (1992). Cryopreservation, survival and function of intrastriatal fetal mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* *90*, 54–62.

Saunders, N.R., Habgood, M.D., and Dziegielewska, K.M. (1999). Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *26*, 11–19.

Schapira, A.H.V. (2002). Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* *9 Suppl 3*, 7–14.

Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003). Selective Ablation of Human Embryonic Stem Cells Expressing a "Suicide" Gene. *STEM CELLS* *21*, 257–265.

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., et al. (2000). Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology* *54*, 1042–1050.

Schwarz, E.J., Alexander, G.M., Prockop, D.J., and Azizi, S.A. (1999). Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum. Gene Ther.* *10*, 2539–2549.

Schwarz, S.C., Wittlinger, J., Schober, R., Storch, A., and Schwarz, J. (2006). Transplantation of human neural precursor cells in the 6-OHDA lesioned rats: effect of immunosuppression with cyclosporine A. *Parkinsonism Relat. Disord.* *12*, 302–308.

Scott, R., Gregory, R., Hines, N., Carroll, C., Hyman, N., Papanastasiou, V., Leather, C., Rowe, J., Silburn, P., and Aziz, T. (1998). Neuropsychological, neurological and functional outcome following pallidotomy for Parkinson's disease. A consecutive series of eight simultaneous bilateral and twelve unilateral procedures. *Brain* *121*, 659–675.

Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* *26*, 125–131.

- Sedgwick, J.D., Ford, A.L., Foulcher, E., and Airriess, R. (1998). Central Nervous System Microglial Cell Activation and Proliferation Follows Direct Interaction with Tissue-Infiltrating T Cell Blasts. *J. Immunol.* 160, 5320–5330.
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., et al. (2008). Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Regulatory T Cells. *STEM CELLS* 26, 212–222.
- Shahbazi, M., Kwang, T.W.X., Purwanti, Y.I., Fan, W., and Wang, S. (2013). Inhibitory effects of neural stem cells derived from human embryonic stem cells on differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J. Neurol. Sci.* 330, 85–93.
- Shim, J.-W., Park, C.-H., Bae, Y.-C., Bae, J.-Y., Chung, S., Chang, M.-Y., Koh, H.-C., Lee, H.-S., Hwang, S.-J., Lee, K.-H., et al. (2007). Generation of Functional Dopamine Neurons from Neural Precursor Cells Isolated from the Subventricular Zone and White Matter of the Adult Rat Brain Using Nurr1 Overexpression. *STEM CELLS* 25, 1252–1262.
- Shimada, H., Yoshimura, N., Tsuji, A., and Kunisada, T. (2009). Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells: modulation of differentiation by FGF-20. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 447–454.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305.
- Shrikant, P., Weber, E., Jilling, T., and Benveniste, E.N. (1995). Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 1489–1501.
- Sidhu, A., Wersinger, C., Moussa, C.E.-H., and Vernier, P. (2004). The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1035, 250–270.
- Singh, N., Pillay, V., and Choonara, Y.E. (2007). Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 81, 29–44.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688–690.
- Soares, M.P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S.T., Colvin, R.B., Choi, A.M., Poss, K.D., et al. (1998). Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat. Med.* 4, 1073–1077.
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G.P., Hebenstreit, G., and Youdim, M.B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J. Neural Transm.* 74, 199–205.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964–977.

Song, R., Kubo, M., Morse, D., Zhou, Z., Zhang, X., Dauber, J.H., Fabisiak, J., Alber, S.M., Watkins, S.C., Zuckerbraun, B.S., et al. (2003). Carbon Monoxide Induces Cytoprotection in Rat Orthotopic Lung Transplantation via Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects. *Am. J. Pathol.* 163, 231–242.

Song, R., Mahidhara, R.S., Zhou, Z., Hoffman, R.A., Seol, D.-W., Flavell, R.A., Billiar, T.R., Otterbein, L.E., and Choi, A.M.K. (2004). Carbon Monoxide Inhibits T Lymphocyte Proliferation via Caspase-Dependent Pathway. *J. Immunol.* 172, 1220–1226.

Sonntag, K.-C., Pruszak, J., Yoshizaki, T., van Arensbergen, J., Sanchez-Pernaute, R., and Isacson, O. (2007). Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 411–418.

Soos, J.M., Morrow, J., Ashley, T.A., Szente, B.E., Bikoff, E.K., and Zamvil, S.S. (1998). Astrocytes Express Elements of the Class II Endocytic Pathway and Process Central Nervous System Autoantigen for Presentation to Encephalitogenic T Cells. *J. Immunol.* 161, 5959–5966.

Sortwell, C.E., Pitzer, M.R., and Collier, T.J. (2000). Time Course of Apoptotic Cell Death within Mesencephalic Cell Suspension Grafts: Implications for Improving Grafted Dopamine Neuron Survival. *Exp. Neurol.* 165, 268–277.

Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327–1333.

Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., and Moretta, L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113, 6576–6583.

Spencer, D.D., Robbins, R.J., Naftolin, F., Marek, K.L., Vollmer, T., Leranth, C., Roth, R.H., Price, L.H., Gjedde, A., and Bunney, B.S. (1992). Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 327, 1541–1548.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6469–6473.

Spina, M.B., and Cohen, G. (1989). Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1398–1400.

- Sriram, K., Matheson, J.M., Benkovic, S.A., Miller, D.B., Luster, M.I., and O'Callaghan, J.P. (2002). Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *FASEB J.*
- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
- Starkstein, S.E., Bolduc, P.L., Mayberg, H.S., Preziosi, T.J., and Robinson, R.G. (1990). Cognitive impairments and depression in Parkinson's disease: a follow up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 53, 597–602.
- Streit, W.J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133–139.
- Studer, L., Tabar, V., and McKay, R.D. (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci.* 1, 290–295.
- Suemori, H., Tada, T., Torii, R., Hosoi, Y., Kobayashi, K., Imahie, H., Kondo, Y., Iritani, A., and Nakatsuji, N. (2001). Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev. Dyn.* 222, 273–279.
- 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.
- Sun M, L.J. (2006). Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial parkinson disease: The genepd study. *Arch. Neurol.* 63, 826–832.
- Suvannavejh, G.C., Dal Canto, M.C., Matis, L.A., and Miller, S.D. (2000). Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* 105, 223–231.
- Svendsen, C.N., Caldwell, M.A., Shen, J., ter Borg, M.G., Rosser, A.E., Tyers, P., Karmiöl, S., and Dunnett, S.B. (1997a). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 148, 135–146.
- Svendsen, C.N., Caldwell, M.A., Shen, J., ter Borg, M.G., Rosser, A.E., Tyers, P., Karmiöl, S., and Dunnett, S.B. (1997b). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 148, 135–146.
- Swistowski, A., Peng, J., Liu, Q., Mali, P., Rao, M.S., Cheng, L., and Zeng, X. (2010). Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells Under Defined Conditions. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 1893–1904.

T

Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., et al. (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* *115*, 102–109.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.

Tan, L., Gordon, K.B., Mueller, J.P., Matis, L.A., and Miller, S.D. (1998). Presentation of Proteolipid Protein Epitopes and B7-1-Dependent Activation of Encephalitogenic T Cells by IFN- γ -Activated SJL/J Astrocytes. *J. Immunol.* *160*, 4271–4279.

Tat, P.A., Sumer, H., Upton, K., and Verma, P.J. (2010). The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells. *Cell Transplant.* *19*, 525–536.

Thiruchelvam, M., Richfield, E.K., Baggs, R.B., Tank, A.W., and Cory-Slechta, D.A. (2000). The Nigrostriatal Dopaminergic System as a Preferential Target of Repeated Exposures to Combined Paraquat and Maneb: Implications for Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* *20*, 9207–9214.

Thobois, S., Delamarre-Damier, F., and Derkinderen, P. (2005). Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *107*, 269–281.

Thomas, M.G., Stone, L., Evill, L., Ong, S., Ziman, M., and Hool, L. (2011). Bone marrow stromal cells as replacement cells for Parkinson's disease: generation of an anatomical but not functional neuronal phenotype. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *157*, 56–63.

Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D., and Björklund, A. (2005). Identification of Dopaminergic Neurons of Nigral and Ventral Tegmental Area Subtypes in Grafts of Fetal Ventral Mesencephalon Based on Cell Morphology, Protein Expression, and Efferent Projections. *J. Neurosci.* *25*, 6467–6477.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.

Timmer, M., Grosskreutz, J., Schlesinger, F., Krampfl, K., Wesemann, M., Just, L., Bufler, J., and Grothe, C. (2006). Dopaminergic properties and function after grafting of attached neural precursor cultures. *Neurobiol. Dis.* *21*, 587–606.

Togashi, H., Sasaki, M., Frohman, E., Taira, E., Ratan, R.R., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (1997). Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 2676–2680.

Toledo-Aral, J.J., Méndez-Ferrer, S., Pardal, R., and López-Barneo, J. (2002). Dopaminergic cells of the carotid body: physiological significance and possible therapeutic applications in Parkinson's disease. *Brain Res. Bull.* 57, 847–853.

Toledo-Aral, J.J., Méndez-Ferrer, S., Pardal, R., Echevarría, M., and López-Barneo, J. (2003). Trophic Restoration of the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway in Long-Term Carotid Body-Grafted Parkinsonian Rats. *J. Neurosci.* 23, 141–148.

Tomás-Camardiel, M., Rite, I., Herrera, A.J., de Pablos, R.M., Cano, J., Machado, A., and Venero, J.L. (2004). Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol. Dis.* 16, 190–201.

Toulouse, A., and Sullivan, A.M. (2008). Progress in Parkinson's disease-where do we stand? *Prog. Neurobiol.* 85, 376–392.

Trigona, W.L., Porter, C.M., Horvath-Arcidiacono, J.A., Majumdar, A.S., and Bloom, E.T. (2007). Could heme-oxygenase-1 have a role in modulating the recipient immune response to embryonic stem cells? *Antioxidants Redox Signal.* 9, 751–756.

Tropel, P., Platet, N., Platel, J.-C., Noël, D., Albrieux, M., Benabid, A.-L., and Berger, F. (2006). Functional Neuronal Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 24, 2868–2876.

Tsai, M.-S., Lee, J.-L., Chang, Y.-J., and Hwang, S.-M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.* 19, 1450–1456.

Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389–397.

Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N., Kitamura, K., Kumagai, G., Nishino, M., Tomisato, S., et al. (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12704–12709.

U

Ubiali, F., Nava, S., Nessi, V., Frigerio, S., Parati, E., Bernasconi, P., Mantegazza, R., and Baggi, F. (2007). Allorecognition of human neural stem cells by peripheral blood lymphocytes despite low expression of MHC molecules: role of TGF-beta in modulating proliferation. *Int. Immunol.* 19, 1063–1074.

Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736.

Ulvestad, E., Williams, K., Bjerkvig, R., Tiekotter, K., Antel, J., and Matre, R. (1994a). Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* 56, 732–740.

Ulvestad, E., Williams, K., B?, L., Trapp, B., Antel, J., and M?rk, S. (1994b). HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology* 82, 535–541.

Ulvestad, E., Williams, K., Matre, R., Nyland, H., Olivier, A., and Antel, J. (1994c). Fc receptors for IgG on cultured human microglia mediate cytotoxicity and phagocytosis of antibody-coated targets. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 27–36.

V

Vajkoczy, P., Laschinger, M., and Engelhardt, B. (2001). β 4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J. Clin. Invest.* 108, 557–565.

Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M.K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304, 1158–1160.

Vannucci, S.J., Maher, F., and Simpson, I.A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2–21.

Vedeler, C., Ulvestad, E., Grundt, I., Conti, G., Nyland, H., Matre, R., and Pleasure, D. (1994a). Fc receptor for IgG (FcR) on rat microglia. *J. Neuroimmunol.* 49, 19–24.

Vedeler, C., Ulvestad, E., Nyland, H., Matre, R., and Aarli, J.A. (1994b). Receptors for gammaglobulin in the central and peripheral nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 9–10.

Venkataramana, N.K., Kumar, S.K.V., Balaraju, S., Radhakrishnan, R.C., Bansal, A., Dixit, A., Rao, D.K., Das, M., Jan, M., Gupta, P.K., et al. (2010). Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 155, 62–70.

Venkataramana, N.K., Pal, R., Rao, S.A.V., Naik, A.L., Jan, M., Nair, R., Sanjeev, C.C., Kamble, R.B., Murthy, D.P., and Chaitanya, K. (2012). Bilateral transplantation of allogenic adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the subventricular zone of Parkinson's disease: a pilot clinical study. *Stem Cells Int.* 2012, 931902.

Vescovi, A.L., Parati, E.A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frölichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A., et al. (1999). Isolation and Cloning of Multipotential Stem Cells from the Embryonic Human CNS and Establishment of Transplantable Human Neural Stem Cell Lines by Epigenetic Stimulation. *Exp. Neurol.* 156, 71–83.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041.

Volkman, J., Sturm, V., Weiss, P., Kappler, J., Voges, J., Koulousakis, A., Lehrke, R., Hefter, H., and Freund, H.J. (1998). Bilateral high-frequency stimulation of the internal globus pallidus in advanced Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, 953–961.

W

- Wang, L., Shi, J., van Ginkel, F.W., Lan, L., Niemeyer, G., Martin, D.R., Snyder, E.Y., and Cox, N.R. (2009). Neural stem/progenitor cells modulate immune responses by suppressing T lymphocytes with nitric oxide and prostaglandin E2. *Exp. Neurol.* 216, 177–183.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 842–857.
- Wenning, G.K., Odin, P., Morrish, P., Rehncrona, S., Widner, H., Brundin, P., Rothwell, J.C., Brown, R., Gustavii, B., Hagell, P., et al. (1997). Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 42, 95–107.
- Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5856–5861.
- Widner, H., Jönsson, B.A., Hallstadius, L., Wingårdh, K., Strand, S.E., and Johansson, B.B. (1987). Scintigraphic method to quantify the passage from brain parenchyma to the deep cervical lymph nodes in rats. *Eur. J. Nucl. Med.* 13, 456–461.
- Widner, H., Tetud, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Björklund, A., Lindvall, O., and Langston, J.W. (1992). Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N. Engl. J. Med.* 327, 1556–1563.
- Williams, B.P., Park, J.K., Alberta, J.A., Muhlebach, S.G., Hwang, G.Y., Roberts, T.M., and Stiles, C.D. (1997). A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells. *Neuron* 18, 553–562.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684–687.
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., and Lucius, R. (2003). Activation of microglia by human neuromelanin is NF- κ B-dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J.*
- Wilson, C.A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C.E., Rose, T.M., and Burd, P. (1998). Type C Retrovirus Released from Porcine Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells Infects Human Cells. *J. Virol.* 72, 3082–3087.
- Wong, G.H., Bartlett, P.F., Clark-Lewis, I., Battye, F., and Schrader, J.W. (1984). Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 310, 688–691.
- 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.

Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., and Black, I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364–370.

Woodroffe, M.N., Hayes, G.M., and Cuzner, M.L. (1989). Fc receptor density, MHC antigen expression and superoxide production are increased in interferon-gamma-treated microglia isolated from adult rat brain. *Immunology* 68, 421–426.

Worthington, J.E., Martin, S., Dyer, P.A., and Johnson, R.W. (2001). An association between posttransplant antibody production and renal transplant rejection. *Transplant. Proc.* 33, 475–476.

Wosik, K., Cayrol, R., Dodelet-Devillers, A., Berthelet, F., Bernard, M., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Reudelhuber, T.L., and Prat, A. (2007). Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood–Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* 27, 9032–9042.

Wu, D.C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.-K., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2002). Blockade of Microglial Activation Is Neuroprotective in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model of Parkinson Disease. *J. Neurosci.* 22, 1763–1771.

Wu, D.-C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6145–6150.

X

Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 971–974.

Y

Yamashita, K., McDaid, J., Öllinger, R., Tsui, T.-Y., Berberat, P.O., Usheva, A., Csizmadia, E., Smith, R.N., Soares, M.P., and Bach, F.H. (2004). Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J.*

Yan, J., Studer, L., and McKay, R.D. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J. Neurochem.* 76, 307–311.

Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E.D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R.A., Thomson, J.A., and Zhang, S.-C. (2005). Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* Dayt. Ohio 23, 781–790.

Yang, D., Zhang, Z.-J., Oldenburg, M., Ayala, M., and Zhang, S.-C. (2008). Human Embryonic Stem Cell-Derived Dopaminergic Neurons Reverse Functional Deficit in Parkinsonian Rats. *STEM CELLS* 26, 55–63.

Yang, S.-H., Park, M.-J., Yoon, I.-H., Kim, S.-Y., Hong, S.-H., Shin, J.-Y., Nam, H.-Y., Kim, Y.-H., Kim, B., and Park, C.-G. (2009). Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp. Mol. Med.* 41, 315–324.

Yasuhara, T., Matsukawa, N., Hara, K., Yu, G., Xu, L., Maki, M., Kim, S.U., and Borlongan, C.V. (2006). Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12497–12511.

Ye, Z., Wang, Y., Xie, H.-Y., and Zheng, S.-S. (2008). Immunosuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. HBPDI* 7, 608–614.

Yin, L., Fu, S.-L., Shi, G.-Y., Li, Y., Jin, J.-Q., Ma, Z.-W., and Lu, P.-H. (2008). Expression and regulation of major histocompatibility complex on neural stem cells and their lineages. *Stem Cells Dev.* 17, 53–65.

Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* 21, 183–186.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.

Yuan, T., Liao, W., Feng, N.-H., Lou, Y.-L., Niu, X., Zhang, A.-J., Wang, Y., and Deng, Z.-F. (2013). Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 73.

Z

Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106, 1755–1761.

Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173.

Zecca, L., Shima, T., Stroppolo, A., Goj, C., Battiston, G.A., Gerbasi, R., Sarna, T., and Swartz, H.M. (1996). Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain. *Neuroscience* 73, 407–415.

Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z.-B., Fotter, E., Wang, Y., Harvey, B., Miura, T., Backman, C., et al. (2004). Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 925–940.

- Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brüstle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1129–1133.
- Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., and Zhao, R.C.H. (2004). Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* *13*, 263–271.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.-S., et al. (2005). Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* *19*, 533–542.
- Zhang, W., Phillips, K., Wielgus, A.R., Liu, J., Albertini, A., Zucca, F.A., Faust, R., Qian, S.Y., Miller, D.S., Chignell, C.F., et al. (2011). Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* *19*, 63–72.
- Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* *474*, 212–215.
- Zheng, X.-S., Yang, X.-F., Liu, W.-G., Pan, D.-S., Hu, W.-W., and Li, G. (2007). Transplantation of neural stem cells into the traumatized brain induces lymphocyte infiltration. *Brain Inj.* *BI 21*, 275–278.
- Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 2667–2674.
- Zhou, W., Lee, Y.M., Guy, V.C., and Freed, C.R. (2009). Embryonic stem cells with GFP knocked into the dopamine transporter yield purified dopamine neurons in vitro and from knock-in mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 2952–2961.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., et al. (2004). Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* *44*, 601–607.
- Zinöcker, S., and Vaage, J.T. (2012). Rat Mesenchymal Stromal Cells Inhibit T Cell Proliferation but Not Cytokine Production Through Inducible Nitric Oxide Synthase. *Front. Immunol.* *3*.
- Zinöcker, S., and Vaage, J.T. (2012). Rat mesenchymal stromal cells inhibit T cell proliferation but not cytokine production through inducible nitric oxide synthase. *Front. Immunol.* *3*, 62.
- Ziv, Y., Avidan, H., Pluchino, S., Martino, G., and Schwartz, M. (2006). Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 13174–13179.

ANNEXES

ANNEXES

PUBLICATIONS

- V. Bonnamain*, **E. Mathieux***, R. Thinard, P. Thébault, V. Nerrière-Daguin, X. Lévêque, I. Anegon, B. Vanhove, I. Neveu, P. Naveilhan. Expression of Heme Oxygenase-1 in Neural Stem/Progenitor Cells as a Potential Mechanism to Evade Host Immune Response. *Stem Cells*, (10):2342-53. 2012. *The authors contributed equally to this work.
- **E. Mathieux**, V. Nerrière-Daguin, X. Lévêque, D. Michel-Monigadon, V. Bonnamain, S. Ménoret, I. Anegon, P. Naveilhan and I. Neveu. IgG response to intracerebral xenotransplantation: specificity and role in the rejection of porcine neurons. *American journal of transplantation, en révision*.
- X. Lévêque*, **E. Mathieux***, V. Nerrière-Daguin, R. Thinard, T. Haudebourg, B. Vanhove, L. Lescaudron, I. Neveu, and P. Naveilhan. Advantages of mesenchymal stem cells for the long term survival of intracerebral xenotransplant. *Stem Cells, soumis*. *The authors contributed equally to this work.
- **E. Mathieux**, V. Bonnamain, P. Naveilhan and I. Neveu. Immune response to intracerebral transplantation: particular properties of stem cells. Title of the book: Stem cells and Neurological diseases.
Author: L. Lescaudron, J. Rossignol and GL. Dunbar, Editors. Special Editor: Raju Primlani.
Publisher: SCIENCE PUBLISHERS, an imprint of Edenbridge Ltd., Enfield, NH, USA.
Expected publication date: 1st semester 2014

COMMUNICATIONS ORALES

- **E. Mathieux.** Les anticorps contre-attaquent. Semaine du cerveau, Nantes, France. Mars 2011.
- **E. Mathieux**, X. Lévêque, V. Nerrière-Daguin, R. Thinard, L. Lescaudron, I. Neveu and P. Naveilhan. Mesenchymal stem cells: immunosuppressive strategy for the long term survival of intracerebral xenotransplant. Club des ganglions de la base, Marseille, France. Mai 2011.
- P. Naveilhan, X. Lévêque, **E. Mathieux**, R. Thinard, L. Lescaudron, B. Vanhove, I. Neveu. Mesenchymal stem cells prolong the survival of xenogenic neurons in the brain, CTS/IXA joint meeting, Miami, USA. Octobre 2011.
- **E. Mathieux.** La transplantation intracérébrale: tout un programme!, Semaine du cerveau, Nantes, France. Mars 2012.
- **E. Mathieux**, X. Lévêque, V. Nerrière-Daguin, S. Menoret, I. Anegon, I. Neveu, P. Naveilhan. The host humoral response induced by the transplantation of porcine neuroblasts in the rat brain, Club français de neuroimmunologie, Paris, France. Octobre 2012.
- **E. Mathieux**, X. Lévêque, V. Nerrière-Daguin, S. Menoret, I. Anegon, I. Neveu, P. Naveilhan. Study of the humoral response after transplantation of porcine neuroblasts in the rat brain, Congrès de la société française de transplantation, Nantes, France. Décembre 2012.
- **E. Mathieux.** La greffe de neurones pour réparer le cerveau? Semaine du cerveau, Nantes, France. Mars 2013.

POSTERS

- X. Lévêque, **E. Mathieux**, V. Nerrière-Daguin, R. Thinard, L. Lescaudron, I. Neveu, P. Naveilhan. Mesenchymal stem cells promote long term survival of intracerebral transplant, European Conference on Mesenchymal Stem Cells, Toulouse, France. Novembre 2011.
- X. Lévêque, **E. Mathieux**, V. Nerrière-Daguin, R. Thinard, L. Lescaudron, I. Neveu, P. Naveilhan. Long term survival of intracerebral neural xenograft: Advantages of co-transplantation with mesenchymal stem cells, SFN 2011, Washington DC, USA. Novembre 2011.
- **E. Mathieux**, X. Lévêque, V. Nerrière-Daguin, R. Thinard, L. Lescaudron, I. Neveu and P. Naveilhan. Mesenchymal stem cells: immunosuppressive strategy for the long term survival of intracerebral xenotransplant, Colloque de la société des neurosciences, Marseille, France. Mai 2011.
- **E. Mathieux**, V. Bonnamain, R. Thinard, V. Nerrière-Daguin, I. Neveu and P. Naveilhan. Immunosuppressive strategies of neural stem/progenitor cells, Colloque national des cellules souches de l'IFR26, Nantes, France. Juin 2011.
- **E. Mathieux**, X. Lévêque, V. Nerrière-Daguin, I. Neveu, P. Naveilhan. The host humoral response induced by the transplantation of porcine neuroblasts in the rat brain, Club français de neuroimmunologie, Paris, France. Octobre 2011.
- **E. Mathieux**, X. Lévêque, V. Nerrière-Daguin, S. Menoret, I. Anegon, I. Neveu, P. Naveilhan. Study of the humoral response after transplantation of porcine neuroblasts in the rat brain. Forum of European Neuroscience, Barcelone, Espagne. Juillet 2012.
- **E. Mathieux**, X. Lévêque, V. Nerrière-Daguin, S. Menoret, I. Anegon, I. Neveu, P. Naveilhan. The host humoral response induced by the transplantation of porcine neuroblasts in the rat brain, Club français de neuroimmunologie, Paris, France. Octobre 2012.

Propriétés immunosuppressives des cellules souches et étude de la réponse humorale en xénotransplantation intracérébrale

La xénotransplantation intracérébrale est une des stratégies thérapeutiques envisagées pour le traitement de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. Toutefois, cette approche est fortement limitée par la réponse immunitaire de l'hôte qui conduit au rejet systématique de la greffe.

La première partie de ma thèse avait pour objectif d'analyser les propriétés immunosuppressives des cellules souches multipotentes et leur potentielle utilité pour la transplantation intracérébrale. Nous avons ainsi montré que la co-transplantation de cellules souches mésenchymateuses avec des neuroblastes porcins dans le striatum de rat induit l'inhibition de facteurs inflammatoires et prolonge la survie du xénotransplant jusqu'à 120 jours. Les cellules souches/progénitrices neurales (CSPN) inhibent également la prolifération des lymphocytes T, et leurs effets apparaissent dépendants de l'hème oxygénase 1. Une dernière série de travaux montre que des CSPN dérivées d'iPSC humaines sont aussi capables d'inhiber la prolifération des cellules mononucléaires humaines.

La seconde partie de ma thèse a consisté à déterminer si la réponse humorale de l'hôte était impliquée dans le rejet de neurones porcins après leur implantation dans le striatum de rat. Des niveaux élevés d'IgG dirigées contre les neurones porcins ont été détectés dans les greffes en cours de rejet. Ces anticorps ont été retrouvés dans la circulation sanguine mais, essentiellement après le rejet de la greffe. Par ailleurs, la longue survie des neurones porcins dans le cerveau de rats déficients pour les immunoglobulines suggère qu'il est important de prendre en compte la réponse humorale si l'on veut maîtriser le rejet de xénogreffe intracérébrale.

Mots-clés : Xénotransplantation, maladie de Parkinson, rejet, cellules souches mésenchymateuses, cellules souches neurales, lymphocyte T, réponse humorale

Immunosuppressive properties of stem cells and study of the humoral response in intracerebral xenotransplantation

The intracerebral xenotransplantation of neural cells is a promising therapeutic strategy for neurodegenerative disorders such as the Parkinson's disease. However, this approach is strongly limited by a strong immune response that leads to the rejection of neural xenograft. The first part of my thesis aims at deciphering the immunosuppressive properties of multipotent stem cells and their potential utility for intracerebral transplantation.

We show that the co-transplantation of rat mesenchymal stem cells with porcine neuroblasts into the rat striatum inhibits the levels of inflammatory factors, and prolongs the survival of xenotransplants up to 120 days. Neural stem/progenitor cells also have the ability to inhibit T lymphocyte proliferation, but their effects are mainly mediated by the heme oxygenase 1. Interestingly, we recently found that neural stem cells derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) are also able to inhibit the proliferation of human mononuclear cells.

The second part of my thesis aims at determining whether the host humoral response is implicated in the rejection of porcine neurons following their implantation into the rat striatum. High levels of elicited IgG directed against porcine neurons are present in the rejecting graft. These IgG are also found in the sera of host animals but predominantly, after graft rejection. The long-survival of porcine neurons in the brain of immunoglobulin-deficient rats indicates that the humoral and not only the cellular immune response should be controlled in case of intracerebral transplantation.

Keywords: Xenotransplantation, Parkinson's disease, rejection, mesenchymal stem cells, neural stem cells, T lymphocytes, humoral response

MATHIEUX Elodie
INSERM UMR 1064
30, Bvd Jean Monnet
44093 Nantes, cedex 01