#### UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DE MÉDECINE

### NOUVELLES STRATÉGIES POUR LA SURVIE À LONG TERME DE XÉNOGREFFES NEURALES APPLICATION À LA MALADIE DE PARKINSON

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale BIOLOGIE SANTÉ

**Discipline Neurosciences** 

Spécialité Transplantation

Présentée et soutenue publiquement par

## LÉVÈQUE Xavier

Le 24 juin 2010, devant le jury ci-dessous

Président	M VALLETTE François, Docteur, Nantes
Rapporteurs	Mme GAILLARD Afsaneh, Professeur, Poitiers M HANTRAYE Philippe, Professeur, Fontenay-aux-Roses
Examinateur	M ROSSIGNOL Julien, Docteur, Mt-Pleasant, MI, USA
Directeurs de thèse	e M NAVEILHAN Philippe, Docteur, Nantes Mme NEVEU Isabelle, Docteur, Nantes

#### TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	6
AVANT-PROPOS	7
I-LA MALADIE DE PARKINSON	10
1.1-Symptomatologie	10
1.2-Physiopathologie	11
1.2.1-La perte neuronale	
1.2.2-Les corps de Lewy	
1.3-ETIOLOGIE	
1.3.1-Les facteurs environnementaux	
1.3.2-Les facteurs génétiques	
1.4-MECANISME DE LA MORT NEURONALE	1 / 17
1.4.1-1 neorie au siress oxyaaiij	
1.4.2-Effet detelete des centres micrognales	
1.5-IKATEMENTS ACTOELS	
1.5.1 Les traitements pharmacorogiques	21
1.5.3-Recherche thérapeutique	
II-TRANSPLANTATION	
2.1-Les autogreffes	
2.1.1-La glande médullosurrénale	25
2.1.2-Les cellules carotidiennes	
2.2-Les Allogreffes	
2.2.1-Etude chez l'animal	27
2.2.2-Les études cliniques	
2.3-LA XENOGREFFE	32
III-LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL : UN CONTEXTE IMMUNOLO	GIQUE
TRÈS PARTICULIER	
3.1-LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE)	35
3.1.1-Structure de la BHE	36
3.1.2-Fonction de la BHE	<i>3</i> 8
3.2-UN DRAINAGE LYMPHATIQUE PARTICULIER	39
3.3-LE TRAFIC LEUCOCYTAIRE	40
3.4-PRESENCE DE CELLULES IMMUNOCOMPETENTES AU SEIN DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	
3.4.1-Les cellules microgliales	
3.4.2-Les astrocytes	44
IV-LE REJET DES XENOGREFFES INTRACEREBRALES	
4.1- Absence de rejet hyper aigu	46
4.2-LE REJET HUMORAL	
4.2.1-Le rôle des immunoglobulines (Ig)	47
4.2.2-Le rôle du complément	48
4.3-LE REJET CELLULAIRE	49

4.3.1-Le rôle des macrophages perivasculaires	49
4.3.2-Le rôle des cellules microgliales	50
4.3.3-Le rôle des astrocytes	
4.3.4-Le rôle des lymphocytes T	
4.4-LA REPONSE CELLULAIRE I	
4.4.2-Le mécanisme d'activation des cellules T	
V-LES CELLULES SOUCHES	
5.1-Definition	55
5.2-Les cellules souches neurales	56
5.2.1-Les cellules souches neurales chez l'embryon	
5.2.2-Les cellules souches neurales chez l'adulle	
5.2.6 Isotement et protiferation des este in viro	
VI-LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES	
6.1-Generalites	63
6.2-MARQUEUR ET FONCTIONS DES MSCS	
6.3-DIFFERENCIATION DES MSCS	
6.4-IMPACT SUR LES CELLULES IMMUNES	
6.4.2-Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)	
6.4.3-Les cellules NK	68
6.4.4-Les cellules B	68
6.5-MECANISMES IMMUNOSUPPRESSIFS DES MSCS	
6.6 APPLICATIONS CLINIQUES DES MSCS	
6.6.2-Etudes cliniques	
OBJECTIFS	
RESULTATS	
ARTICLE 1	
MINOCYCLINE PROMOTES LONG-TERM SURVIVAL OF NEURONAL	
TRANSPLANT IN THE BRAIN BY INHIBITING LATE MICROGLIAL ACTI	VATION
AND T CELL RECRUITMENT.	
ARTICLE 2	80
TROPHIC AND IMMUNOREGULATORY PROPERTIES OF NEURAL PREC	URSOR
CELLS, DENIEFIT FOR INTRACEDERDAL TRANSDIANTATION	80
CELLS. DENEITI FOR INTRACEREDRAL TRANSFLANTATION	
ARTICLE 3	
ADVANTAGES OF MENSENCHYMAL STEM CELLS FOR THE LONG TER	M
SURVIVAL OF INTRACEREBRAL XENOTRANSPLANT	
DISCUSSION GÉNÉRALE	
BIBLIOGRAPHIE	

## Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AVC : accident vasculaire cérébral

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMR : courant migratoire rostral

CNTF : ciliary neurotrophic factor

CO : monoxyde de carbone

COMT : catéchol-O-méthyl transférase

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CPN : cellule progénitrice neurale

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSN : cellules souches neurales

DA : dopamine ou dopaminergique

MSC : cellule souche mésenchymateuse

CSN : cellule souche neurale

EAE : encéphalomyélite allergique expérimentale

EGF : epidermal growth factor

ES : embryonic stem

F-DOPA : Fluorodopa

(b)FGF : (basic) fibroblast growth factor

GDNF : glial-cell-line-derived neurotrophic factor

GFP : green fluorescent protein

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GPe : Globus pallidus externe

GPi : Globus pallidus interne

HO : heme oxygénase

Ig : immunoglobuline

IGF : insulin growth factor

iPS : induced pluripotent stem

IFNg : Interféron gamma IVG : interruption volontaire de grossesse KO: knock out LCA : Leukocyte common antigen LCR : liquide céphalo-rachidien L-DOPA : lévodopa LPS : lipopolysaccharide MAO: monoamines oxydases MBP : myelin basic protein MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1 MDMA: 3,4-methylenedioxymethamphetamine MP : Maladie de Parkinson MPTP: 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine NEP : neuroépithéliale NFkB : Nuclear factor kappa B NGF : nerve growth factor NK : natural killer NO : nitric oxyde NOS : nitric oxyde synthase NST : noyau sous thalamique NT-3: Neurotrophin 3 OHDA : hydroxydopamine PCR : polymerase chain reaction PG : progéniteur glial PGE2 : prostaglandine E2 RT : reverse transcription SNC : système nerveux central SNpc : Substance noire pars compacta SNpr : Substance noire pars réticulata SVF : sérum de veau fœtal TCR : T cell-receptor

TEP : tomographie par émission de positons

 $TGF\beta$ : Transforming growth Factor  $\beta$ 

TH : tyrosine hydroxylase

TNF : tumor necrosis factor

 $\ensuremath{\mathsf{VEGF}}$  : vascular endothelium growth factor

- ZO : zona occludens
- ZSG : zone sous-granulaire
- ZSV : zone sous-ventriculaire
- ZV : zone ventriculaire

## Liste des figures

- Figure 1 : Attitude caractéristique d'un patient parkinsonien
- Figure 2 : La voie nigro-striée
- Figure 3 : Schéma d'organisation des ganglions de la base
- Figure 4 : Hypothèse impliquant le fer et le stress oxydatif dans la MP
- Figure 5 : Le cercle vicieux de l'activation microgliale et de la mort neuronale
- Figure 6 : Voie de synthèse de la dopamine
- Figure 7 : Stimulation cérébrale profonde des noyaux sous thalamiques
- Figure 8 : Emplacement du mésencéphale ventral
- Figure 9 : Suivi des greffes neuronales par TEP
- Figure 10 : Mise en évidence de la barrière hémato-encéphalique
- Figure 11 : Structure anatomique de la barrière hémato-encéphalique
- Figure 12 : Composition protéique des jonctions sérrées
- Figure 13 : Voie de transport des antigènes au sein du SNC
- Figure 14 : Extravasation des leucocytes au travers de la barrière hémato-encéphalique
- Figure 15 : Structure des immunoglobulines
- Figure 16 : La différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th1 ou Th2
- Figure 17 : Mécanismes d'activation des cellules T
- Figure 18 : Les différents types de cellules souches
- Figure 19 : Différenciation des cellules souches neurales
- Figure 20 : La neurogénèse chez l'embryon
- Figure 21 : La neurogénèse chez l'adulte
- Figure 22 : Etapes de prolifération des cellules souches neurales in vitro
- Figure 23 : Propriétés des MSCs in vitro
- Figure 24 : Inhibition de la prolifération des cellules T par les MSCs
- Figure 25 : Protocole utlisé pour la comparaison de greffes intrastriatale de pNB ou de pCSPN
- Figure 26 : Co-transplantation de pNB et de rMSC dans le striatum de rat adulte Lewis 1A

## **Avant-propos**

Suite à une agression par un pathogène, notre système immunitaire est capable, d'identifier et d'éliminer les agents infectieux. Il en est de même pour une greffe d'organe, de tissus ou de cellules. En 1948, Peter Medawar, prix nobel de médecine, décrivit le principe d'immuno-privilège. Il a ainsi montré que des tissus allogéniques pouvaient survivre dans des particuliers comme les testicules, l'oeil ou le cerveau sans traitement sites immunosuppresseur (Medawar, 1948). C'est ainsi que le SNC a très longtemps été considéré comme une entité indépendante du système immunitaire. La présence de la barrière hématoencéphalique (BHE), la non détection des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans les cellules neurales (Barker et Bllingham, 1997) et l'absence de cellules présentatrices d'antigènes conventionnelles ont conforté, pendant des années, cette vision du SNC. Aussi, de nombreux essais de transplantation cellulaire ont été menés dans le cerveau, notamment pour reconstituer les populations neuronales affectées par les maladies neurodégénératives. Les modèles de la maladie de Parkinson furent particulièrement utilisés. En effet, cette pathologie affecte une population neuronale bien localisée et l'efficacité des traitements peut être facilement suivie avec des tests comportementaux. L'intérêt des stratégies restauratives a été confirmé par des essais de thérapie cellulaire chez l'animal et chez l'homme, mais ceux-ci étant essentiellement basés sur des allogreffes, les réactions immunes de l'hôte ont été très peu étudiées. Pourtant, il est à présent clair que les systèmes nerveux et immunitaires communiquent entre eux et que les leucocytes peuvent traverser la BHE (Hickey., 1991). De plus, une étude récente a révélé une alloimmunisation contre les antigènes du donneur et un début de rejet chez un patient atteint de la chorée de Huntington et auquel des cellules foetales d'origine humaine avaient été greffées (Krystkowiak et al, 2007). Dès lors, il apparaît aujourd'hui impossible de ne plus prendre en compte la réponse immune en cas d'intervention dans le SNC. Un des problèmes majeurs à l'application de traitements conventionnels pour le SNC est la présence de la BHE qui limite la pénétration de nombreuses molécules immunosuppressives. D'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies immunosuppressives adaptées au SNC. Ce fut l'objectif de mon travail de thèse.

Pour étudier l'efficacité de nouveaux traitements immunosuppresseurs, nous avons utilisé un modèle très étudié au laboratoire : la greffe de cellules fœtales mésencéphaliques porcines dans le striatum de rat non lésé ou lésé par la 6-OH-dopamine (modèle de la maladie de Parkinson). En effet, la chronologie et les mécanismes conduisant au rejet de ce type de xénogreffes neurales ont été relativement bien décrits (Michel et al., 2006; Remy et al., 2001). De plus, l'utilisation de cellules fœtales porcines est une alternative très intéressante pour pallier aux problèmes éthiques et logistiques posés par l'utilisation de cellules fœtales d'origine humaine.

Aussi après une brève description de la maladie de Parkinson, nous décrirons les premiers essais de transplantation intracérébrale et les particularités immunologiques du SNC. Puis, nous présenterons quelques caractéristiques des cellules souches neurales et mésenchymateuses dont les propriétés immunosuppressives pourraient être d'un réel intérêt pour les thérapies cellulaires.

## **INTRODUCTION**

## I-La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative fut initialement qui qualifiée de « paralysie agitante » par James Parkinson dans son traité de 1817. La paralysie agitante se définit par des « mouvements de tremblements involontaires, avec une diminution de la force musculaire, parfois au repos et même lorsqu'il est retenu, avec une tendance à faire se pencher le tronc en avant (Figure 1), et à faire passer le pas de la marche à la course » La MP se manifeste par un tremblement de repos, une rigidité et une akinésie, diversement associés. Comme beaucoup d'autres troubles neurologiques, la maladie de Parkinson est chronique, évolutive et pour le moment incurable.

#### **<u>1.1-Symptomatologie</u>**

L'akinésie rend notamment difficile la réalisation des gestes fins tels que l'écriture (micrographie) et se retrouve également au niveau du visage (symptôme d'amimisme), de la marche (marche à petits pas), de la voix (monotone et assourdie), au niveau axial (troubles de la posture) et au niveau des membres. Les tremblements de repos, autres symptômes caractéristiques, sont intermittents, augmentés par la marche, les efforts intellectuels, les émotions et disparaissent pendant le sommeil. Enfin, l'hypertonie ou rigidité extra-pyramidale tend à fixer les membres dans la position qu'on leur impose. Ces différentes manifestations cliniques (Tableau 1) se combinent entre elles selon les patients qui, dans certains cas, peuvent également présenter des troubles cognitifs.



Figure 1: Attitude caractéristique d'un patient parkinsonien. Source: bjeaaan213.wikispaces.com/ parkinson%27s

#### Symptômes moteurs

Tremblements de repos Bradykinésie Rigidité Instabilité posturale Trouble de la marche Micrographie Faciès inexpressif Hypophonie Akathisie (impatience motrice) Dysarthrie (trouble de l'élocution) Dysphagie Incontinence urinaire

#### Symptômes neuro-végétatifs

Constipation Hypotension Troubles de la thermorégulation Hypersialorrhée Dysfonctions sexuelles

#### Symptômes cognitifs Confusion

Bradyphrénie (lenteur des idées) Démence

#### Symptômes psychiatriques

Troubles du sommeil Agitation/anxiété Dépression

Tableau 1 : Symptômes associés à la MP

La MP reste avant tout une maladie motrice, cependant, des atteintes cognitives ainsi que des désordres psychiatriques peuvent apparaître et perturber la vie sociale et la prise en charge du patient. C'est Benjamin Ball, en 1882, qui mit l'accent sur des troubles « non-moteurs » de type psycho-cognitifs en décrivant des troubles de l'humeur sous la forme d'une mélancolie avec des « impulsions suicidaires » et des « hallucinations multiples », mais aussi des troubles cognitifs sévères sous la forme « d'état de démence » et de « demi-stupeur ». Il a décrit par ailleurs leurs décours « intermittents » et fluctuant avec les troubles moteurs.

#### **1.2-Physiopathologie**

#### **<u>1.2.1-La perte neuronale</u>**

La MP se caractérise par la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc) (Hornykiewicz, 1966). Dans un cerveau sain, ces neurones se projettent dans le striatum, une structure formée par les noyaux gris centraux (noyaux caudés et putamen). L'ensemble forme la voie dopaminergique nigro-striée (Fig 2). Il est à considéré que 70 80% des neurones dopaminergiques disparu ont lors de l'apparition des premiers symptômes de la



Figure 2 : la voie nigro-striée. Les neurones DA de la SNpc projettent vers le striatum.

maladie. Ces pertes neuronales provoquent une diminution de la concentration cérébrale en dopamine, entraînant un affaiblissement de la stimulation des récepteurs dopaminergiques du striatum. Il en résulte un dysfonctionnement du circuit des ganglions de la base (Fig. 3), altérant l'efficacité de la boucle dite « squeletto-motrice » responsable des mouvements à effectuer.



Figure 3 : Schéma d'organisation des ganglions de la base.

Le pallidum est constitué de 2 unités fonctionnelles distinctes : le GPe et le GPi. Ainsi deux voies sont décrites : la voie directe (Striatum-GPi) et la voie indirecte (Striatum-GPe-Corps de Luys ou noyau sous thalamique (NST)-GPi). Dans la voie directe, les neurones GABAergiques exprimant le récepteur D1 sont activés par les neurones de la substance noire et vont inhiber le GPi. Dans la voie indirecte, les neurones GABAergiques exprimant le récepteur D2 sont activés par les neurones dopaminergiques et vont inhiber le GPe. Le GPe inhibe à son tour le noyau sous-thalamique qui active le GPi. Le GPi constitue la structure de sortie des ganglions de la base dont les neurones GABAergiques font relais avec le thalamus. Le GPi inhibe donc le thalamus qui joue un rôle excitateur du cortex cérébral moteur. Si le GPi est inhibé, le thalamus est alors libéré et le cortex excité. La voie directe est dès lors considérée comme une voie excitatrice et la voie indirecte comme une voie inhibitrice du mouvement. En condition pathologique, la perte de dopamine va entraîner un déséquilibre des deux voies (hyperactivation D2 et hypoactivation D1). L'hypoactivation D1 va entraîner, par levée de leur fonction inhibitrice, d'une part une inhibition moins forte du GPi donc une inhibition moins forte du thalamus qui sera alors hyperactivé ce qui facilitera la voie thalamo-corticale et la création de mouvement. L'hyperactivation des neurones GABAergiques des récepteurs D2 de la voie indirecte va entrainer quant à elle une hypoactivité du GPe qui induit une désinhibition du NST. L'hyperactivité du NST induit une hyperactivation du GPi et pour conséquence une inhibition de la voie thalamo-corticale. La perte de dopamine entraîne donc un déséquilibre entre les 2 voies qui est à l'origine des symptômes de la maladie, en particulier de l'akinésie.

12

Bien que de très grandes variabilités inter-individuelles soient observées, les grands groupes de neurones dopaminergiques ne sont pas tous atteints de la même manière. La SNpc est la région la plus sévérement touchée (80%). En revanche les neurones dopaminergiques de la substance grise périaqueducale semblent relativement préservés du processus dégénératif puisqu'une perte neuronale de 7 à 10 % est constatée. La région médio-ventrale (ou aire tegmentale ventrale, ou A10) et l'aire péri- et rétro-rubrale (A8) présentent une perte intermédiaire de 30 à 45 % (Hirsch et al., 1988 ; Graybiel et al., 1990 ; Damier et al., 1999). Par ailleurs, quelle que soit la région dopaminergiques affectée, il existe un gradient rostrocaudal de la perte neuronale; les territoires postérieurs de chaque région étant plus sévérement atteints que les territoires antérieurs (Bernheimer et al., 1973 ; Damier et al., 1999). Depuis longtemps, on sait que la perte neuronale au sein de la substance noire est hétérogène. En plus du gradient rostro-caudal déjà évoqué, on s'apercoit sur des coupes transversales que la région ventro-latérale est la plus sévèrement atteinte (Fearnley et Lees, 1991; Damier et al., 1999). La perte neuronale dans la partie dorsale, parfois appelée substance noire pars dorsalis est quant à elle plus modérée (Damier et al., 1999). A cette distribution particulière de la perte neuronale au sein du mésencéphale, correspond une distribution particulière du déficit en dopamine au sein des cibles de projection, entre autres le striatum (Haber et Fudge, 1997; François et al., 1999; Joel et Weiner, 2000; Smith et Kieval, 2000). La perte de fibres immunoréactives pour la tyrosine hydroxylase est plus importante au sein du putamen (85%) que dans le noyau caudé (75%) et au sein de ces deux structures, le déficit est plus important dans les parties dorso-latérales que dans les parties ventro-médianes (Kish et al., 1988; Agid et al., 1993). Or la région dorso-latérale du putamen, région la plus sévérement dénervée, correspond au territoire sensori-moteur du striatum (Künsle, 1975). La topographie des lésions dopaminergiques de la substance noire et donc les variations du niveau de dénervation au sein du striatum peuvent contribuer à expliquer le caractère essentiellement moteur de la MP. Des différences inter-individuelles d'intensité ou de distribution de la perte des neurones dopaminergiques pourraient expliquer certaines différences cliniques observées d'un patient à l'autre, en particulier le site de la symptomatologie initiale (Gibb et al., 1991; Lang et Lozano, 1998).

Bien que la perte des neurones dopaminergiques soit massive et relativement sélective dans la MP, certains signes cliniques peuvent persister après la prise des traitements visant à rétablir les taux physiologiques de dopamine. Cette observation suggère que des systèmes non dopaminergiques soient également altérés dans la maladie. Ces lésions, qui ne sont que

partielles et inconstantes, pourraient toutefois rendre compte d'une partie des symptômes non corrigés par le traitement dopaminergique (troubles cognitif par exemple) observés dans la maladie, à l'origine parfois de tableaux cliniques complexes. Ainsi, il a été observé une dégénérescence des neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Hirsch et al., 1988), des neurones adrénergiques de la medulla oblongata (Gai et al., 1993) ainsi que des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert et du noyau pédonculopontin (Whitehouse et al., 1983) qui pourraient contribuer à la détérioration intellectuelle parfois observée dans la MP et aux troubles moteurs axiaux, posturaux et de la marche. Les neurones sérotoninergiques du raphé peuvent également être affectés. Leur dégénérescence pourrait être à la base du syndrome dépressif rencontré chez certains parkinsoniens (Mayeux, 1990).

#### **1.2.2-Les corps de Lewy**

Les examens anatomo-pathologiques montrent que les corps de Lewy sont présents chez les patients parkinsoniens. Il s'agit d'inclusions neuronales éosinophiles, sphériques, de 5 à 25  $\mu$ m de diamètre. Ces corps de Lewy sont présents dans les neurones dopaminergiques de la SNpc (Gibb et al., 1991) ainsi que dans certaines populations catécholaminergiques (Halliday et al., 1990 ; Jellinger, 1991). On ignore leur présence est une conséquence de la souffrance neuronale, ou si ces corps de Lewy participent au processus dégénératif (Agid, 1991; Langston, 1996). Toutefois, ces inclusions contiennent de l' $\alpha$ -synucléine, une protéine dont la mutation est responsable de certaines formes génétiques de la maladie de Parkinson (Polymeropoulos et al., 1997). La présence de neurofilaments et de tubulines dans ces inclusions suggèrent une altération du cytosquelette (Goldman et al., 1983). On notera cependant, que ces inclusions ne sont spécifiques ni de la SNpc ni de la MP. En effet, les corps de Lewy peuvent également être observés dans des désordres neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer ou au cours du vieillissement non pathologique (Fearnley et Lees, 1991).

14

#### **<u>1.3-Etiologie</u>**

La ou les causes exactes de la maladie de Parkinson ne sont pas encore clairement définies, notamment du au fait qu'il est difficile de déterminer quels sont les éléments responsables de la mort neuronale et quels sont ceux qui sont une conséquence de la mort et de la souffrance neuronale. Les observations post-mortem réalisées chez l'Homme et les résultats expérimentaux obtenus chez l'animal ont tout de même conduit à l'élaboration de diverses hypothèses.

#### **<u>1.3.1-Les facteurs environnementaux</u>**

L'influence des facteurs environnementaux dans les processus physiopathologiques de la MP a été suggérée suite à une augmentation de l'incidence de la maladie lors de l'exposition à certains composés chimiques de synthèse. L'un des événements les plus marquants a été la découverte en 1979, de plusieurs cas de syndrome parkinsonien chez de jeunes adultes toxicomanes vivant en Californie, qui s'étaient injectés un substitut de l'héroïne, la mépéridine. Le produit toxique fût identifié : le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6tetrahydropyridine (MPTP). Ce dérivé synthétique de la mépéridine s'est avéré être un neurotoxique très puissant et sélectif des neurones dopaminergiques (Langston et Ballard, 1983, D'Amato et al., 1986).

L'hypothèse d'une composante toxique environnementale comme origine de la MP est désormais largement admise. Des études récentes, ont d'ailleurs montré que l'exposition à certains pesticides ferait augmenter de 70% le risque de développer des maladies neurodégénératives (Ascherio et al., 2006; Frigerio et al., 2006). Parmi ces pesticides à risque, on recense notamment le paraquat, un herbicide qui présente une structure similaire au MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium) (Brooks et al., 1999). La roténone, un puissant insecticide, induit également les symptômes cliniques et pathologiques caractéristiques de la MP avec notamment une perte sélective des neurones dopaminergiques nigro-striés via l'inhibition de l'activité du complexe I des mitochondries (Liu et al., 2003). Il est à noter que l'extasie (ou 3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA), une drogue aux effets euphorisants très populaire chez certains jeunes adultes, a un effet désastreux sur les neurones dopaminergiques. Ainsi, deux primates non humains sont rapidement morts et de nombreux autres singes présentaient une perte de 40% de leurs neurones dopaminergiques suite à

l'administration d'extasie à des doses couramment utilisées par les jeunes (Ricaurte et al., 2002). L'extasie semble donc cibler les neurones dopaminergiques et prédisposer les jeunes consommateurs à développer la MP.

#### 1.3.2-Les facteurs génétiques

Même si la forme sporadique idiopathique semble être la plus répandue, un facteur génétique est impliqué dans 10 à 15% des cas de MP (de Silva et al., 2000; Mouradian, 2002). A ce jour, plusieurs loci ont été identifiés et des mutations ponctuelles des gènes de l' $\alpha$ -synucléine, de la parkine (Kitada et al., 1998) et de l'ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 ont été mises en évidence. Les gènes mis en cause ont été regroupés sous le terme de PARK.

#### <u>1.3.2.1-PARK 1 : L'α-synucléine</u>

La mutation du gène PARK 1 codant pour la protéine membranaire  $\alpha$ -synucléine induit une forme familiale de la MP qui se transmet de façon autosomale dominante et qui se caractérise par la présence de corps de Lewy (Polymeropoulos et al., 1997). Les caractéristiques cliniques sont semblables à celles décrites pour les formes sporadiques de la maladie bien que dans le cas présent, l'apparition des premiers symptômes débute à 46 ans ( $\pm$ 13 ans) et l'espérance de vie est diminuée par rapport à des formes sporadiques de la maladie. L' $\alpha$ -synucléine est une protéine capable de lier les membranes lipidiques. Elle est principalement localisée au niveau des terminaisons présynaptiques et il semblerait qu'en participant à la formation des vésicules présynaptiques, l' $\alpha$ -synucléine permettrait la régulation de la synthèse, du stockage et de la libération de la dopamine. La mutation de la protéine provoquerait un changement de conformation qui rendrait l' $\alpha$ -synucléine incapable de former les vésicules. L'accumulation intracytoplasmique de la dopamine induirait un stress oxydatif responsable de la mort des neurones (Goedert, 2001; Lotharius et Brundin, 2002).

#### **<u>1.3.2.2-PARK 2 : La parkine</u>**

De nombreuses mutations du gène PARK2 codant pour la protéine parkine ont été décrites comme étant liées au développement d'un syndrome parkinsonien débutant dès 28 ans (Kitada et al., 1998). Dans ce cas, la maladie se transmet de façon autosomale récessive et se caractérise par l'absence de corps de Lewy. La parkine est une ubiquitine ligase, enzyme clef du catabolisme des protéines via le système du protéasome (Giasson et Lee, 2001). La mutation du gène conduit à la formation d'une protéine inefficace pour la protéolyse, ce qui entraîne une accumulation protéique anormale (Kitada et al., 2000). D'autres gènes PARK seraient impliqués dans le processus d'ubiquitination / dégradation de protéines. Leur mutation provoquerait une MP (Moore et al., 2003).

#### **<u>1.4-Mécanisme de la mort neuronale</u>**

#### 1.4.1-Théorie du stress oxydatif

Les neurones dopaminergiques de la SNpc sont particulièrement exposés au stress oxydatif car le catabolisme de la dopamine produit des radicaux libres via deux voies de dégradation. L'une est enzymatique et dépendante des monoamines oxydases (MAO), l'autre non-enzymatique est provoquée par une auto-oxydation. Par ailleurs, les neurones dopaminergiques contiennent d'importantes quantités de mitochondries et la chaîne respiratoire localisée dans la membrane interne de ces dernières, est une source importante de radicaux libres. De plus, la SNpc est une des régions du SNC la plus riche en fer (Jellinger et al., 1990), un élément connu pour faciliter la formation de radicaux libres en participant aux réactions auto-oxydatives (Figure 4). Enfin, un grand nombre de neurones DA contient de la neuromélanine. Cette molécule qui possède une forte affinité pour le fer et les autres métaux, génère des radicaux libres.



Figure 4 : Hypothèse impliquant le fer et le stress oxydatif dans la MP. (D'après Zecca et al., 2004)

D'autre part, les astrocytes qui sont les seules cellules à disposer de la glutathion peroxydase, enzyme clef pour la détoxification des radicaux libres, sont peu nombreux dans la SNpc (Damier et al., 1993). Aussi, n'est-il pas étonnant que de nombreux indices de stress oxydatif soient observés dans la SNpc de patients atteints de la MP et les travaux de Jenner indiquent que les cellules nigrales se retrouveraient en conditions de stress oxydatif de façon nettement plus importante chez les patients atteints de la MP comparativement à un individu sain (Jenner, 1998). Différentes hypothèses ont été suggérées mais il est intéressant de noter que le glutathion, co-substrat nécessaire à la détoxification des radicaux libres via la glutathion peroxydase, a été retrouvé en quantité significativement moindre dans la SNpc de patients atteints de la MP comparativement à des individus sains (Sian et al., 1994).

Il existe des théories autres que l'hypothèse du stress oxydatif pour expliquer la mort des neurones dopaminergiques, et notamment celle liée à l'excitotoxicité du glutamate (Sonsalla et al., 1998). Néanmoins, de multiples arguments plaident en faveur d'un rôle important du stress oxydatif dans les mécanismes responsables de la destruction des neurones dopaminergiques dans la MP. A ce sujet, l'analyse de l'implication des cellules microgliales dans le processus physiopathologique de la maladie renforce cette l'hypothèse comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

#### 1.4.2-Effet délétère des cellules microgliales

L'étude de la composition cellulaire de la SN chez un individu sain révèle une quantité importante de cellules microgliales. La présence de ces cellules au sein de la SN pourrait être d'une grande importance puisque Liu et al., ont montré que leur activation consécutive à l'injection de LPS dans la SNpc de souris avait pour conséquence la mort des neurones DA et que ce processus pouvait être prévenu par l'administration de naloxone, un agent pharmacologique analogue structurel de la morphine qui inhibe la libération de facteurs proinflammatoires tel que le TNF $\alpha$  (Liu et al., 2000). Cependant, il reste à définir si l'activation de la microglie est une cause directe ou seulement une conséquence de la perte neuronale. En fait, un cercle vicieux liant la mort des neurones et l'activation microgliale a été proposé (Figure 5). A ce propos, il est intéressant de noter que la proportion de cellules microgliales activées augmente avec l'âge même chez des sujets sains (sans traumatisme ni désordre neurodégénératif préalables) (Mackenzie et Munoz, 1998; Rozovsky et al., 1998; Sheng et al., 1998). Ce phénomène pourrait donc être à l'origine de l'augmentation de l'incidence des maladies neurodégénératives avec l'âge.



Figure 5: Le cercle vicieux de l'activation microgliale et de la mort neuronale. *(D'après Block et Hong, 2005)* 

19

Les cellules microgliales sont connues pour produire et libérer un grand nombre de facteurs toxiques tels que des dérivés réactifs de l'oxygène, des dérivés réactifs de la voie du monoxyde d'azote ainsi que des prostaglandines et des cytokines proinflammatoires (Hunot et al., 1999). Ces dernières pourraient avoir un rôle extrêmement délétère dans la MP. En effet, on retrouve une quantité importante de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans le SNpc des patients parkinsoniens (Mogi et al., 2000) et ces cytokines pourraient entretenir un environnement inflammatoire très néfaste pour les neurones dopaminergiques. Il est également important de souligner que les neurones DA possèdent des récepteurs spécifiques pour ces cytokines et que leur activation, aboutit à la mort des cellules par apoptose (Vila et al., 2001 ; Hartmann et al., 2000).

#### **1.5-Traitements actuels**

#### **1.5.1-Les traitements pharmacologiques**

Les symptômes moteurs de la MP étant essentiellement dus au déficit en dopamine dans le striatum, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont cherché à supplémenter le cerveau en dopamine et la recherche a connu une avancée majeure à la fin des années 60 avec la découverte de la lévodopa (L-DOPA) par l'équipe de Cotzias. Cette équipe a en effet démontré qu'une administration orale de L-DOPA avait des effets spectaculaires, à court et à long terme sur la symptomatologie de la MP (Cotzias, 1969). La dopamine ne pouvant traverser la BHE (barrière hémato-encéphalique), l'administration de L-DOPA permet de supplémenter le cerveau en un précurseur (Figure 6) que les neurones nigro-striés encore actifs transforment en dopamine grâce à la dopa-décarboxylase. Pour éviter une décarboxylation périphérique, la L-DOPA est toujours administrée avec un inhibiteur de la dopa-décarboxylase (carbidopa ou bensérazide) qui n'a pas la possibilité de traverser la BHE. L'administration de L-DOPA permet une réelle amélioration des symptômes moteurs des patients, notamment l'akinésie et l'hypertonie. Toutefois, après cette période nommée « lune de miel », la dopathérapie va présenter des fluctuations d'efficacité. Celles-ci se manifestent par une réapparition temporaire des symptômes, nécessitant une augmentation des doses de lévodopa susceptible de conduire à l'apparition de mouvements anormaux involontaires ou dyskinésies. Ces complications apparaissent dans 60% des cas après 5 ans de traitement et dans 90% des cas après 10 ans. Dans le but de réduire ces complications, les agonistes

dopaminergiques, qui agissent directement sur les récepteurs dopaminergiques, sont désormais introduits de plus en plus précocement dans le traitement des patients (Rascol, 1999; Damier et al., 2000). Cependant, les agonistes dopaminergiques semblent moins efficaces que la L-DOPA, si bien qu'une bithérapie avec cette dernière est souvent nécessaire pour une optimisation du traitement après quelques années. Enfin leur moins bonne tolérance cognitive et psychiatrique fait réserver leur utilisation à des sujets jeunes (moins de 70 ans) (Inzelberg et al., 1996).



Figure 6 : Voie de synthèse de la dopamine

Outre, l'apport de dopamine ou l'administration d'agonistes dopaminergiques, certains traitements pharmacologiques ciblent les enzymes participants à la dégradation de la dopamine. Ainsi, de nombreux inhibiteurs de la MAO-B ou de la catéchol-O-méthyl transférase (COMT), enzymes responsables du catabolisme de la dopamine, ont été commercialisés dès les années 70. Ces traitements, en combinaison avec la L-DOPA, prolongent effectivement la durée d'action de cette dernière (Lees et al., 1977).

#### **1.5.2-Le traitement chirurgical**

C'est en 1987 que Benabid et son équipe ont montré que la stimulation cérébrale profonde à haute fréquence pouvait stopper certains symptômes comme les tremblements essentiels (Benabid et al., 1987). Ce résultat a été présenté comme une très bonne alternative à la thalamotomie. Plus récemment, cette technique a été appliquée au pallidum et au noyau sous thalamique (Figure7). Cette dernière semble la plus efficace pour améliorer les problèmes moteurs des patients atteints de la maladie de Parkinson. La stimulation des noyaux sous thalamiques permet notamment de réduire les fluctuations motrices à l'origine des dyskinésies et un arrêt total de la prise de L-DOPA est souvent envisagé (Limousin et al., 1998). Malheureusement, seuls des patients relativement jeunes atteints de forme idioathiques de la MP peuvent prétendre à ce traitement et le coût de cette intervention demeure très élevé.



Figure 7 : Stimulation cérébrale profonde des noyaux sous thalamiques

#### **1.5.3-Recherche thérapeutique**

#### 1.5.3.1-La neuroprotection

#### . Les traitements antioxydants

Un traitement antioxydant comme stratégie thérapeutique est basé sur le fait que le stress oxydatif serait une des causes de la mort neuronale dans le maladie de Parkinson. L'effet du déprényl (ou selegiline), un inhibiteur de la MAO qui métabolise la dopamine en produisant du peroxyde d'hydrogène, a donc été étudié. Des études chez le singe utilisé comme modèle de la maladie de Parkinson (administration de MPTP) ont montré qu'effectivement, le déprényl avait un effet neuroprotecteur (Tatton et Greenwood, 1991). Un essai clinique effectué sur 800 patients a par la suite démontré que la prise de déprényl pouvait retarder la prise de L-DOPA chez les patients à symptomatologie parkinsonienne débutante (Shoulson, 1998). A ce sujet, il est à noter, qu'en plus de son effet anti-oxydant, le déprényl pourrait agir en augmentant le taux de dopamine intracérébrale par inhibition de la dégradation de la MAO (Olanow et al., 1998).

. Les traitements anti-apoptotiques

Les inhibiteurs de caspases et les inhibiteurs de relargage du cytochrome C par les mitochondries sont potentiellement utilisables pour prévenir la mort des neurones dopaminergiques. En effet, des souris KO pour le gène pro-apoptotique p53 (Trimmer et al., 1996) et des souris transgéniques surexprimant le gène anti-apoptotique bcl-2 (Yang et al., 1998) se sont avérés résistantes à une intoxication par le MPTP. Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs de caspases demande beaucoup de précautions, notamment pour ne pas interférer avec le processus apoptotique naturel et ne pas empêcher l'élimination de neurones dopaminergiques non fonctionnels.

#### .Les traitements anti-inflammatoires

Du fait de l'importance de l'activation microgliale au cours de la MP, et de l'inflammation que cela entraîne, des traitements inflammatoires ont naturellement été envisagés. C'est ainsi que la minocycline, inhibiteur de l'activation microgliale, a été testée dans des modèles murins de la maladie de Parkinson. Les souris lésées par du MPTP (Wu et al., 2002) et des rats lésés à la 6-OHDA (He et al., 2001) traités par de la minocyline ont présenté une réduction de l'activation microgliale et une protection des neurones DA aussi bien au niveau de la SN que de leurs terminaisons striatales.

#### . Les facteurs neurotrophiques

Afin d'augmenter la protection des neurones DA contre le processus dégénératif, des stratégies basées sur l'apport de facteurs neurotrophiques ont été envisagées. Ces facteurs sont connus pour prévenir la mort de populations neuronales particulières lors du développement embryonnaire et chez l'adulte en cas de lésion (Beck et al., 1995 ; Yan et al., 1995). La découverte du GDNF dans les années 1990 a soulevé de nombreux espoirs pour prévenir la mort de neurones dopaminergiques. En effet, de nombreuses expérimentations animales ont clairement montré qu'un apport en GDNF protégeait les neurones dopaminergiques de la SN contre la toxicité du MPTP ou de la 6-OHDA (Hoffer et al., 1994 ; Tomac et al., 1995 ; Gash et al., 1996 ; Rosenblad et al., 1999). Un essai chez l'Homme avait montré une amélioration

motrice (Gill et al., 2003) mais une étude plus conséquente n'a pas confirmé ces résultats (Nutt et al., 2003). Un effet neuroprotecteur par le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) a également été montré (Guo et al., 1999) et plus récemment, il a été rapporté l'existence d'un facteur neurotrophique spécifique des neurones dopaminergiques, le MANF (Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor) secrété par les astrocytes (Petrova et al., 2004). Ce dernier, en combinaison avec d'autres facteurs, pourrait permettre une protection significative des neurones dopaminergiques.

#### 1.5.3.2-La thérapie cellulaire

Le renouvellement des neurones dans le SNC chez l'adulte étant très limité, la transplantation de neurones embryonnaires ou de cellules souches est une des stratégies thérapeutiques envisagées pour reconstituer les populations neuronales affectées par les maladies neurodégénératives. Cette stratégie fait l'objet du chapitre suivant.

## **II-Transplantation**

Les troubles moteurs rencontrés par les patients atteints de la maladie de Parkinson étant essentiellement dus au déficit en dopamine dans le striatum, les essais de transplantation intracérébrale ont eu pour principal objectif de greffer dans le striatum, des cellules susceptible d'assurer un apport suffisant en dopamine. Pour ce faire, des stratégies d'auto-, d'allo- et de xénotransplantation ont été employées.

Dans ce chapitre, nous allons développer les différentes stratégies utilisées en transplantation dans le but d'obtenir une récupération fonctionnelle associée à une augmentation de la quantité de dopamine chez l'Homme et dans des modèles animaux de la MP.

#### **2.1-Les autogreffes**

L'autogreffe est une stratégie très attractive du fait de l'absence de problèmes d'ordre éthique et immunologique inhérents aux allo- et xénotransplantations. C'est ainsi que les premières recherches en transplantation pour le traitement la maladie de Parkinson se sont focalisées sur des sources cellulaires dopaminergiques autologues telles que la glande médullosurrénale ou des cellules carotidiennes.

#### 2.1.1-La glande médullosurrénale

Historiquement, les premières cellules à avoir été greffées pour le traitement de la maladie de Parkinson étaient issues de la glande médullo-surrénale. L'idée de transplanter ces cellules chromaffines endocriniennes dans le cerveau, est venue du fait que ces cellules possédaient certaines enzymes nécessaires à la biosynthèse des catécholamines et qu'il semblait possible que les malades parkinsoniens puissent se passer d'une de leur médullo-surrénales sans ressentir de troubles majeurs. La bonne survie et la fonctionnalité des greffons dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson (Freed et al., 1981 ; Morihisa et al., 1987) ont conduit à des essais cliniques chez l'Homme, et ce malgré les incertitudes sur le mode d'action de ce type de greffe. Des améliorations motrices et cognitives significatives ont été rapportées par Madrazo pour deux patients (Madrazo et al., 1987) mais ces résultats sont

actuellement remis en question. En effet, les analyses post-mortem effectuées 16 années après la transplantation, montrent une très faible survie des cellules greffées et une absence complète de cellules positives pour la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme clef de la synthèse dopaminergique (Kompoliti et al., 2007). Les autres études cliniques montrant une faible amélioration transitoire du comportement moteur des patients (Backlund et al., 1985; Lindvall et al., 1987), cette voie a été totalement abandonnée, d'autant plus que la double intervention chirurgicale (abdominale puis neurochirurgicale) provoquait une importante morbidité.

#### 2.1.2-Les cellules du corps carotidien

Les cellules du corps carotidiens ont aussi été présentées comme une source cellulaire possible pour le traitement de la maladie de Parkinson, car certaines d'entre elles sécrètent de la dopamine en réponse à une hypoxie. Des agrégats cellulaires préparés à partir de corps carotidiens ont été greffés dans le striatum de rats ou de primates non humains utilisés comme modèle de la maladie de Parkinson (Espejo et al., 1998 ; Luquin et al., 1999). La récupération partielle des symptômes moteurs a conduit à la mise en place d'un essai clinique sur 13 patients. Une amélioration à 1 an pour la majorité des patients, et à 3 ans pour 3 d'entre eux, a été observée, mais les analyses indiquent une très faible survie des cellules greffées et l'absence d'incorporation du marqueur dopaminergique 18F- Fluorodopa (F-Dopa) (Minguez-Castellanos et al., 2007). Même si un bénéfice a été observé chez certains patients, l'origine des améliorations motrices reste à déterminer et l'absence de signal fluorodopa en TEP n'est guère encourageante.

#### **2.2-Les allogreffes**

Le remplacement des neurones dopaminergiques perdus au cours du processus physiopathologique de la MP est une stratégie qui a été largement explorée notamment via l'utilisation de tissus allogéniques. Les études ont été essentiellement basées sur l'allogreffe de neurones dopaminergiques immatures (ou neuroblastes) issus du mésencéphale ventral foetal.

#### 2.2.1-Etude chez l'animal

.

C'est vers la fin des années 70 qu'ont eu lieu les premières tentatives de greffe de neuroblastes dopaminergiques d'origine fœtale dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson (lésion des neurones dopaminergiques de la SN par injection de 6-OH-DA). Différents essais ont été effectués en variant notamment les sites d'implantation, l'âge des embryons ainsi que les procédures de dissection et de transplantation (Dunnett, 1981a, Dunnett1981b, Wijeyekoon et Barker, 2009). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des cellules fœtales issues du mésencéphale ventral (MV, ébauche embryonnaire de la substance noire) (Figure 8) prélevé au stade où les neuroblastes de la SN amorcent leur différenciation terminale (aux alentours d'E15 chez le rat, G28 chez le porc et G45 chez le singe), et greffées dans le striatum de l'hôte. Cette stratégie permet d'obtenir au sein de cette structure cible, des neurones dopaminergiques capables de rétablir l'apport en dopamine.



Figure 8 : emplacement du mésencéphale ventral

Des essais ont été effectués en greffant les cellules mésencéphaliques au sein même de la substance noire mais l'incapacité des neurones greffés à émettre des axones jusqu'au striatum ne permet pas l'induction d'une récupération fonctionnelle (Dunnett et al., 1983 ; Isacson and Deacon, 1997). En revanche, les greffes de cellules mésencéphaliques dans le striatum de rat lésés par la 6-OH-DA permet des récupérations motrices (Test du rotomètre suite à l'injection d'apomorphine) qui ont été confirmés par différents groupes (Perlow et al., 1979 ; Bjorklund et Stenevi, 1979 ; Dunnett et al., 1981 ; Brundin et Bjorklunld ; 1987 ;Herman and Abrous, 1994.). Des résultats similaires ont été obtenus chez des singes lésés par l'administration de MPTP (Taylor, 1991 ; Elsworth, 2000). Les analyses immunohistochimiques réalisés chez le rat ont confirmé une survie du greffon et la présence de neurones dopaminergiques dans le striatum greffé (Perlow et al., 1979 ; Bjorklund et Stenevi, 1978 ; Brundin et Bjorklund ; 1987 ;Herman and Abrous, 1981 ; Brundin et Bjorklund analyses immunohistochimiques réalisés chez le rat ont confirmé une survie du greffon et la présence de neurones dopaminergiques dans le striatum greffé (Perlow et al., 1979 ; Bjorklund et Stenevi, 1979 ; Dunnett et al., 1981 ; Brundin et Bjorklund ; 1987 ;Herman and Abrous,

1994). Une innervation du transplant par les neurones de l'hôte a également été observée par Doucet et al., (Doucet et al., 1989) tandis qu'une formation de synapses entre les neurones greffés et les neurones du parenchyme striatal a été mise en évidence en 1985 par Freund et al., (Freund et al., 1985). La confirmation de la formation de synapses fonctionnelles et d'une régulation dopaminergique appropriée par les cellules transplantées est venue de l'observation de la disparition des dyskinésies induites par les traitements prolongés à la L-DOPA après la transplantation (Gaudin et al., 1990). Ces observations confirment une bonne intégration des cellules mésencéphaliques fœtales dans le striatum d'un hôte présentant une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN.

Les expériences d'allotransplantation effectuées dans des modèles animaux ont également souligné la possibilité de greffer des neurones fœtaux dans le striatum d'un hôte de la même espèce sans apport de traitement immunosuppresseur. Cet état apparent de tolérance peut être cependant rompu par une réaction de rejet, induite par une greffe dans un tissu périphérique. Duan et son équipe ont ainsi montré qu'une greffe de peau effectuée peu de temps après une allogreffe neurale dans le cerveau de rat provoquait rapidement leur rejet (Duan et al., 1997). Ce rejet serait du à une forte infiltration cellulaire T et macrophagiques au sein du striatum greffé. De nos jours, la possibilité que des allogreffes intracérébrales puissent faire l'objet d'une réaction de rejet dans les mois qui suivent l'opération paraît de plus en plus plausible (Krystkowiak et al., 2007) .

L'ensemble des études réalisées chez l'animal confirment un rôle bénéfique des cellules fœtales dopaminergiques implantées dans le striatum d'un hôte présentant une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN. Toutefois, il convient de préciser que dans la majorité des modèles animaux de la MP, les déficits moteurs sont dus à une destruction massive et sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire consécutive à l'administration systémique ou intracérébrale de substances neurotoxiques alors que la maladie de Parkinson, est essentiellement du à une dégénération progressive et incomplète des neurones dopaminergiques.

#### 2.2.2-Les études cliniques

Les premières transplantations de neurones mésencéphaliques chez l'Homme ont été réalisés à la fin des années 80 (Lindvall et al., 1989). Les patients étaient atteints de la maladie de Parkinson depuis plus de 10 ans et le traitement médical était devenu insuffisant. Des cellules issues du mésencéphale ventral d'embryons humains âgés de 7 à 9 semaines, ont été implantées unilatéralement par stéréotaxie dans le striatum des patients immunosupprimés par administration de cyclosporine A. Une très faible amélioration clinique a été observée chez ces 4 premiers patients mais des prélèvements chez des embryons plus jeunes (6-7 semaines), une intervention plus rapide, l'utilisation d'un aiguille plus fine, et l'implantation dans les parties postérieures et antérieures du putamen ont conduit à des bénéfices cliniques beaucoup plus substantiels chez deux autres patients (Lindvall et al., 1990, 1992). Des améliorations motrices telles qu'une réduction de la bradykinésie et de la rigidité ont été confirmées jusqu'à 10, 17 et 36 mois chez d'autres patients (Lindvall et al., 1994, Peschanski et al., 1994). Une amélioration du contrôle de la posture et des mouvements a également été observée après des greffes uni- ou bilatérales de tissus mésencéphaliques (Freed, 1990, 1992, Freeman et al., 1995). Les analyses par TEP ont mis en évidence une augmentation de la capture de la fluoro-Dopa au niveau du site de greffe chez les patients greffés (Lindvall et al., 1994; Peschanski et al., 1994; Widner et al., 1992; Freeman et al., 1995; Wenning et al., 1997). L'incorporation de fluro-dopa a pu être observé chez un patient jusqu'à 10 ans après la transplantation (Piccini et al., 1999). Les travaux de Rémy et al., ont permis de corréler l'intensité de la capture de fluoro-Dopa avec le niveau de récupération motrice (Remy P. et al., 1995; Figure 9). Il est également à noter que la greffe de neuroblastes mésencéphaliques a permis dans certains cas, de s'affranchir partiellement du traitement à la L-DOPA (Lindvall et al., 1994; Freed et al., 1990, Widner et al., 1992; Piccini et al., 1999).



Figure 9 : Suivi des greffes neuronales Cette série de quatre images résume l'évolution de la fonction dopaminergique striatale chez un patient atteint de maladie de Parkinson. Les images TEP ont été prises avant et 3, 6 ou 12 mois après l'implantation intrastriatale de cellules foetales du mésencéphale ventral. Avant la greffe, on observe une disparition presque complète du signal 18F-Fluorodopa. Dès le 3ème mois et jusqu'à 12 mois après la greffe, on observe du côté transplanté, une augmentation du signal TEP (flèches) qui s'accompagne d'une amélioration clinique significative (Remy P. et al., 1995).

La mort prématurée d'un patient greffé qui présentait une amélioration des perturbations motrices et une progressive augmentation de la capture de fluoro-dopa au niveau du site de greffe, a permis de confirmer la présence de neurones TH<sup>+</sup> dans le striatum, 18 mois après une transplantation de cellules fœtales mésencéphaliques (Kordower et al., 1966). L'analyse post-mortem a également permis de montrer la formation de synapse entre les neurones de l'hôte et les neurones greffés (Kordower et al., 1966). La survie et l'activité dopaminergique des neuroblastes issus du mésencéphale ventral sont donc nettement supérieures aux potentialités des nombreuses autres sources cellulaires. A ce propos, il est à noter que les greffes de neuroblastes mésencéphaliques sont effectuées avec une suspension cellulaire hétérogène contenant des progéniteurs gliaux connus pour produire des facteurs importants pour la survie, la différenciation et la maturation des neurones dopaminergiques. Ces facteurs pourraient donc influencer favorablement la survie et l'intégration des neuroblastes mésencéphaliques après leur greffe dans un cerveau adulte.

Malgré tous ces résultats extrêmement encourageants, la transplantation de cellules mésencéphaliques d'origine humaine est confrontée à différents problèmes.

Tout d'abord, il est à souligner qu'il existe de nombreuses disparités entre les différents centres d'expérimentation clinique concernant l'âge des fœtus, la dissection du tissu foetal (morceaux de MV ou suspension cellulaire), sa conservation et la composition des milieux utilisés pour la dissection et/ou l'injection. Il est toutefois admis qu'une cryoconservation prolongée du tissu foetale entraîne une forte mortalité cellulaire et est néfaste pour la transplantation (Collier et al., 1987; Redmond et al., 1988; Sauer et al., 1992). Par ailleurs, on estime que moins de 20 % des cellules dopaminergiques fraîchement isolées survivraient à la transplantation (Lindvall., 1998). Des études chez le rat ont démontré que la plupart mourraient par apoptose (Zawada et al., 1998) durant la première semaine posttransplantation (Barker et al., 1996). Par ailleurs, si les travaux publié par Freed et al., en 2001, suggéraient que l'âge précoce était un facteur de réussite de la greffe (Freed et al., 2001), Freed et ses collaborateurs ont finalement conclu qu'un des paramètres déterminants était la réponse préopératoire à la L-DOPA. Un autre problème majeur qui a freiné le développement de l'allotransplantation de cellules mésencéphaliques pour le traitement de la maladie de Parkinson a été l'apparition de dyskinésies. En effet, lors d'essais cliniques réalisés en double aveugle, il a été observé des dystonies et des dyskinésies très invalidantes (Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003). Les patients développant ces mouvements involontaires étaient, en général, ceux qui présentaient des améliorations motrices. Pour expliquer ces effets indésirables, il a été proposé que dans un premier temps, la greffe assurerait une production de dopamine suffisamment efficace pour corriger les symptômes moteurs, mais que dans un second temps, l'excès de dopamine entraînerait des mouvements involontaires (Freed et al., 1990; Freed et al., 2001).

Outre l'ajustement des paramètres cités ci-dessus, une des limites au développement des allogreffes intracérébrales est l'utilisation de matériel fœtal d'origine humaine. En effet, le mésencéphale ventral est prélévé sur des embryons issus d'IVG (interruption volontaire de grossesse) après consentement éclairé de la mère et il faut 7 à 8 fœtus pour assurer une greffe bilatérale chez un patient atteint de la maladie de Parkinson (Isacson et al., 2001; Bjorklund et al., 2003; Soderstrom et al., 2006). De ce fait, les neurochirurgiens sont très souvent confrontés aux problèmes de disponibilité en tissu fœtal en plus des problèmes éthiques liés à leur utilisation.

#### 2.3-La xénogreffe

Pour pallier aux problèmes éthiques et à la disponibilité en tissu fœtal d'origine humaine, il a été proposé de greffer des cellules issues d'espèces différentes. Dans cette optique, le porc apparaît comme une espèce tout à fait appropriée du fait de leur facilité d'élevage, du nombre élevé d'embryons et de la possibilité de générer des porcs transgéniques ou knock-out (Cozzi et White., 1995). De plus, la taille du cerveau de porc étant proche de la taille du cerveau humain, les neurones de porc émettent des neurites de longueur comparable à celles observées en cas d'allotransplantation (Armstrong et al., 2002 ; Deacon et al., 1994 ; Isacson et al., 1995). De plus, la planification du prélèvement et de l'acte chirurgical ouvre la possibilité de traiter le donneur et le receveur, si besoin avant la transplantation, pour prévenir le rejet ou induire la tolérance (Cascalho and Platt, 2001). La xénotransplantation a également de réels atouts d'un point de vue psychosocial,. En effet, une étude suédoise (1999) a révélé que 60% de la population générale et 66% des personnes en attente d'une greffe de rein, se disait prête à accepter une xénotransplantation si les risques étaient équivalents à ceux d'une allotransplantation. Ce pourcentage descend à 16% lorsque les risques sont plus importants.

#### **2.3.1-Risques sanitaires**

Dans la mesure où les animaux sont maintenus dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), il est possible d'éviter la transmission de la plupart des agents infectieux comme le cytomégalovirus (Gollackner et al., 2003). Cependant, un risque majeur concerne les virus endogènes intégrés dans le génome porcin : les PERV (Porcin Endogenous Retrovirus). En effet, des études in vitro ont montré que des PERV présentes dans certaines lignées cellulaires porcines pouvaient contaminer des cellules humaines (Patience et al., 1997; Weiss, 1999). Des analyses réalisées chez des patients ayant été en contact avec des tissus porcins n'ont toutefois révélé aucun signe d'infection même plusieurs années plus tard (Paradis et al., 1999). La possibilité de transmission semble donc assez faible mais pour écarter les risques, des porcs dépourvus de PERV ou présentant des PERV inactifs peuvent être sélectionnés.

#### 2.3.2-Expérimentation animale

Différents groupes ont entrepris d'étudier la survie, la différenciation et les capacités restauratrices de neuroblastes mésencéphaliques porcins prélevés sur des fœtus âgés de 3 à 4 semaines et greffés dans le striatum d'animaux immunosupprimés présentant des lésions de la voie nigro-striée. En 1989, Huffaker et al., ont montré que des neuroblastes issus du mésencéphale ventral d'embryons de porc âgés de 21 jours pouvait survivre jusqu'à 15-20 semaines dans le striatum de rats lésés par la 6-OH-DA et traités par la cyclosporine A (Huffaker et al., 1989). Les analyses immunohistochimiques ont révélé la présence de neurones TH<sup>+</sup> dans le striatum greffé et les analyses comportementales ont permis de corréler le nombre de cellules TH<sup>+</sup> à la récupération motrice. Ces résultats ont été confirmé ultérieurement par d'autres groupes (Galpern et al., 1996 ; Larsson et Widner., 2000). Au-delà de cette survie à long terme, les xénogreffes de cellules neurales dans des modèles animaux de la MP montrent que ces cellules porcines ont une capacité de croissance axonale sur de longues distances (Deacon et al., 1994; Thompson et al., 2005). Isacson et ses collaborateurs ont également montré que dans le cerveau adulte, cette croissance axonale était orientée vers les cibles cérébrales naturelles (Isacson et al., 1995). En effet, les cellules astrogliales issues d'embryons porcins et transplantées avec les cellules neuronales migrent vers la substance blanche, alors que les axones des cellules neuronales innervent préférentiellement la substance grise. De façon plus générale, des neurones isolés à partir de diverses aires cérébrales de fœtus porcins, transplantés dans des régions lésées homotypiques ou ectopiques adulte, peuvent émettre des axones qui recolonisent les régions du cerveau de rat normalement afférentées par les neurones détruits pour reconstituer partiellement la cytoarchitecture (Isacson and Deacon, 1996). Il semble donc que les neurones fœtaux porcins puissent utiliser les voies de guidage axonal d'un hôte xénogénique même dans un cerveau l'adulte.

33

#### 2.3.3-Essais cliniques

Malgré le faible nombre d'expérimentations chez l'animal, des essais cliniques ont été effectués chez des patients atteints de la maladie de Parkinson.

Un essai clinique a été réalisé en greffant unilatéralement des cellules issues du mésencéphale ventral d'embryons de porc dans le striatum de 12 patients Parkinsoniens. Les résultas ont fait l'objet de trois publications (Deacon et al., 1997; Fink et al., 2000; Schumacher et al., 2000). La moitié des patients a été immunosupprimée par un traitement à la cyclosporine A et le second groupe a été traité par injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I porcin. Les greffes ont été bien tolérés et selon les auteurs, une amélioration de 30% du score clinique a été observée pour 3 des patients un an après l'opération. Toutefois, aucune augmentation significative du signal Fluoro-DOPA n'a été mise en évidence par TEP au niveau du site d'implantation. Une analyse post mortem d'un des patients décédé 7 mois après la greffe d'une embolie pulmonaire, a révélé la présence de neurones dopaminergiques porcines mais en très faible nombre (638 cellules TH<sup>+</sup> sur les 12 millions transplantées). Les analyses immunohistologiques ont également révélé la présence de cellules microgliales activées et de lymphocytes T au sein du greffon, suggérant un environnement inflammatoire et une réponse immune de l'hôte défavorable à la survie de la greffe. Enfin, il est à noter qu'aucune contamination par des rétrovirus endogènes (PERV) n'a été détectée dans la préparation cellulaire ou in situ après la greffe.

Des études plus précises sur la préparation du greffon, la quantité de cellules à transplanter, les sites d'implantation restent à réaliser pour augmenter l'efficacité de cette stratégie restauratrice mais les résultats très prometteurs observés dans certains modèles animaux et chez l'Homme, doivent encourager le développement des greffes intracérébrales, notamment la transplantation de cellules fœtales d'origine porcine. En effet, de par son isolement du reste de l'organisme, le SNC est un site immunologiquement particulier qui pourrait s'avérer être le site idéal pour obtenir une longue survie de cellules xénogéniques chez l'Homme.

# III-Le système nerveux central : un contexte immunologique très particulier

Le système nerveux central (SNC) a longtemps été considéré comme un organe immunologiquement privilégié (Medawar 1948 ; Billingham et Boswell 1953) à l'instar de l'œil, du placenta ou des testicules. Cette observation est venue du fait que les greffes de tissus ou de tumeurs allogéniques, voire xénogéniques, persistaient beaucoup plus longtemps dans le parenchyme cérébral que dans des tissus périphériques. Ce statut très particulier a notamment été attribué à la présence de la barrière hémato-encéphalique et à un drainage lymphatique très particulier.

#### 3.1-La barrière hémato-encéphalique (BHE)

L'existence d'une barrière isolant le parenchyme nerveux de la circulation sanguine a été mise en évidence par Goldmann au tout début du XXème siècle. Il s'est aperçu que du bleu trypan injecté en intraveineuse diffusait dans la quasi-totalité des capillaires de l'organisme à l'exception du SNC. En revanche, une injection du colorant dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) marquait le cerveau mais ne diffusait pas dans les organes périphériques. Ces observations l'ont conduit à suggérer l'existence d'une barrière perméable entre le LCR et le cerveau mais pas entre le sang et le SNC (Figure 10).


Figure 10: Mise en évidence de la barrière hémato-encéphalique. A-Première expérience de Goldmann. Injection intraveineuse de bleu trypan et analyse au niveau du cerveau et du LCR. B-Deuxième expérience de Goldmann. Injection de bleu trypan dans le LCR et analyse du cerveau et du sang périphérique. C-Synthèse des deux expériences.

## 3.1.1-Structure de la BHE

L'imperméabilité de cette barrière est essentiellement due à la présence de jonctions serrées qui unissent les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux sanguins. La BHE est également formée de la lame basale de l'endothélium, des péricytes et de nombreux pseudopodes astrocytaires qui entourent les vaisseaux sanguins cérébraux (Figure 11).



Figure 11 : Structure anatomique de la BHE

Les astrocytes forment des extensions vers les cellules endothéliales appelées « pieds terminaux ». De nombreuses études ont suggéré une implication des astrocytes dans la formation de la BHE. Ainsi, selon les travaux de Janzer et Raff, l'injection d'astrocytes purifiés dans la chambre oculaire de rat adulte entraînerait la formation d'une barrière imperméable autour des vaisseaux (Janzer et Raff., 1987).

Les péricytes, d'origine hématopoïétique (Thomas, 1999), sont séparés des cellules endothéliales et des astrocytes par la membrane basale. Ils forment des extensions qui pénètrent à l'intérieur de cette membrane et recouvrent entre 20 à 30 % de la surface vasculaire (Frank et al., 1987). Les péricytes sont impliqués dans le maintien de l'intégrité de la BHE (Ramsauer et al., 2002), dans la régulation de la perméabilité ainsi que dans la croissance et la différenciation des cellules endothéliales (Hirschi et D'Amore, 1996).

Les cellules endothéliales forment une monocouche continue autour de la lumière des capillaires sanguins. Elles possèdent très peu de vésicules d'endocytose, limitant ainsi le flux transcellulaire. Elles sont également liées par des jonctions serrées étanches permettant une diminution importante du flux paracellulaire, et transformant l'endothélium vasculaire cérébral en une interface unique entre le sang et le parenchyme nerveux (Rubin et Staddon, 1999; Saunders et al., 1999). Les cellules endothéliales sont également pourvues de nombreuses mitochondries témoignant d'une activité métabolique importante (Oldendorf et al., 1977).

Les jonctions serrées, appelées également jonctions étanches ou *zonulae occludens*, sont les éléments les plus apicaux des liaisons entre les cellules endothéliales. Elles sont composées de trois protéines transmembranaires principales : l'occludine, la claudine et la molécule d'adhésion JAM appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il existe d'autres protéines cytoplasmiques qui confèrent un support structurel aux jonctions serrées. Il s'agit des protéines de la *zona occludens* (ZO1, ZO2 et ZO3) (Furuse et al., 1999) (Figure 12).



Figure 12 : Composition protéique des jonctions serrées. (D'après Hawkins et al., 2006)

## **<u>3.1.2-Fonction de la BHE</u>**

Le rôle principal de la BHE est de limiter le passage de molécules et de cellules circulantes. Le passage d'une molécule au travers de la BHE est directement liée à son coefficient de solubilité lipidique, de sa forme et de son poids moléculaire (Saunders et al., 1999). Le passage des molécules par la BHE peut s'effectuer par diffusion passive ou active, transport actif ou par endocytose. Le glucose, principale source d'énergie de notre cerveau nécessite l'intervention de transporteurs spécifiques GLUT-1 et GLUT-3 retrouvés respectivement au niveau des cellules endothéliales et des neurones (Vannucci et al., 1997). Les composés hydrosolubles et les ions nécessitent un transport actif qui se traduit par une quantité élevée de mitochondries dans les cellules endothéliales de la barrière (5 à 6 fois plus nombreuses que dans un capillaire normal ; Oldendorf et al., 1977).

La BHE permet l'accumulation dans le liquide interstitiel et dans le LCR de molécules immunosuppressives produites par les cellules nerveuses dont le TGF- $\beta$  (Transforming growth Factor  $\beta$ ; Taylor et Streilein 1996 ; Cserr et al., 1992). De même, elle empêche le passage de molécules immunes (constituants du complément, cytokines, etc..) du sang

périphérique vers le SNC. Enfin, elle régule la migration trans-endothéliale de pathogènes et des cellules du sang circulant (Hickey et al., 1991). Aussi est-il très rare d'observer une migration des cellules immunitaires vers le SNC dans des conditions physiologiques normales.

## 3.2-Un drainage lymphatique particulier

En périphérie, une immense partie des substances libérées dans l'espace intercellulaire est drainée vers les ganglions lymphatiques par la lymphe. Dans le SNC, le liquide interstitiel est drainé le long des espaces périvasculaires vers le LCR, produit par les plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule et des ventricules latéraux à partir du sang artériel, et réabsorbé au niveau des sinus veineux arachnoïdiens (Johanson et al., 2008). Une partie du LCR (environ 30%) s'accumule dans les ganglions lymphatiques cervicaux profonds, ce qui explique qu'une administration d'antigènes (Ag) solubles au sein du SNC entraîne une réponse humorale comparable à celle observée lors d'une administration périphérique (Cserr et al, 1992).



Figure 13: Voie de transport des antigènes au sein du SNC. Les cellules dendritiques présentes au niveau du plexus choroïde peuvent présenter les antigènes (Ag) intracérébraux afin de les transporter jusqu'aux ganglions cervicaux profonds. (1) Les Ag au sein du LCR sont drainés le long des ventricules et de l'espace sous arachnoïdien. Ils peuvent ensuite entrer dans les sinus veineux pour rejoindre la rate ou être drainés jusqu'aux ganglions profonds. (2) Les Ag présents dans le liquide interstitiel peuvent également pénétrer dans le LCR dans l'espace péri-vasculaire. (3) Chez le rat, les espaces sous-arachnoïdien et vasculaire sont directement connectés avec les ganglions lymphatiques

nasaux et cervicaux profonds.

## **<u>3.3-Le trafic leucocytaire</u>**

Dans un cerveau sain, les cellules endothéliales de la BHE n'expriment que très faiblement les molécules d'adhésion indispensables au passage des leucocytes dans le parenchyme cérébral. En revanche, les lymphocytes T (LT) issus de la circulation sanguine peuvent tout à fait pénétrer dans le parenchyme cérébral lors de processus inflammatoires. Ce processus dit d'extravasation fait intervenir différentes étapes (pour revue : Engelhardt, 2006) qui mettent en jeu des molécules d'adhésion et des facteurs d'activation (Butcher, 1991 ; Springer, 1994) :

- Capture et roulement des lymphocytes médiés par des sélectines/mucines et des intégrines/membres de la famille des immunoglobulines
- 4 Activation (étape caractérisée par l'activation des intégrines)
- **4** Adhésion (liaison entre les intégrines et leurs ligands endothéliaux)
- Diapédèse (transmigration du leucocyte au travers de la barrière endothéliale (Ley et al., 2007 ; Figure 16)

L'entrée des LT dans le SNC nécessite leur activation mais la nature de l'antigène et le phénotype de la cellule T ne semble pas être déterminant pour l'accès au parenchyme. Une stimulation antigénique récente semble suffisante (Fritz et al., 2000) et une activation polyclonale non spécifique par la concavaline A leur permet de pénétrer efficacement dans le parenchyme cérébral quelle que soit leur spécificité antigénique (Hickey, 1991). Les cellules T passant la BHE pourraient être assimilées à des chercheuses d'antigène et à ce jour, le concept de LT ayant un adressage spécifique pour le SNC n'a jamais été démontré. En effet, aucun récepteur d'hébergement, ni de molécules d'adressage n'a été identifié pour un ciblage spécifique des leucocytes vers les cellules endothéliales du SNC. Il semblerait au contraire, que les LT pénètrent de façon aléatoire dans le parenchyme (Hickey, 1999).



Figure 14 : Extravasation des leucocytes au travers de la barrière hémato-encéphalique

Les leucocytes circulants dans les capillaires roulent sur l'endothélium, entraînés par le courant circulatoire. Cette progression se poursuit jusqu'à leur passage au niveau des tissus inflammatoires qui se caractérisent par la surexpression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales voisines. Le contact initial entre le leucocyte et les cellules endothéliales activées est médié par l'interaction entre les sélectines et leurs ligands glycoprotéiques. La P-sélectine et la E-sélectine apparaissent respectivement dans les minutes et les heures qui suivent une exposition aux cytokines (Granger et Kubes, 1994). Il a été montré que la L-sélectine était exprimée à la surface membranaire des leucocytes dans des régions riches en microvillosités, alors que les intégrines, molécules responsables de l'étape suivante du passage, sont localisées entre les microvillosités (von Andrian et al., 1995). Cette disposition permet aux molécules de sélectines d'établir le premier contact avec les cellules endothéliales. Peu après ce contact initial, les microvillosités se rétractent, permettant le rapprochement entre les intégrines et leurs récepteurs présents sur les cellules endothéliales pour assurer l'étape suivante à savoir, le passage transendothélial.

L'adhésion et l'activation. Pour stopper le roulement, l'interaction transitoire de faible affinité médiée par les sélectines doit être remplacée par une adhésion de haute affinité entre le leucocyte et la surface endothéliale. Cette liaison forte est induite par les chimiokines qui, du fait de leur affinité pour l'héparane sulfate et les glycosaminoglycanes (GAG) tapissant le versant endoluminal des cellules endothéliale, permettent l'interaction entre les intégrines du leucocyte et les molécules d'adhésion de l'endothélium. Les leucocytes disposent d'une famille d'intégrines unique qui comprend le LFA-1

(Leukocytes Function associated Antigen-1 ou CD11a) et Mac-1 (CD11b). Ces molécules se lient à ICAM-1 et -2 (Intercellular Adhesion Molecule-1 et-2) ainsi qu'à VCAM-1(Vascular Cell Adhesion Molecule-1) présentes à la surface des cellules endothéliales.

La diapédèse. La diapédèse correspond au point de non retour. Le passage du leucocyte à travers l'endothélium se réalise grâce à la dégradation locale de la membrane basale. Par des modifications morphologiques via le remodelage de son cytosquelette, le leucocyte s'étend et émet des pseudopodes à travers l'endothélium pour finalement atteindre le parenchyme. Cependant, contrairement aux organes périphériques où le phénomène ne dure que quelques minutes, ce passage à travers la BHE peut prendre plusieurs heures en raison de la présence des jonctions serrées (Vajkoczy et al., 2001; Laschinger et al., 2002).

La migration intracérébrale. Une fois parvenu dans l'espace sous-endothélial, le leucocyte poursuit sa migration à travers le tissu. Guidé par le gradient interstitiel de chimiokines, il migre jusqu'au site de l'inflammation. Il semblerait que les chimiokines présentent une certaines spécificité d'action en fonction du type cellulaire. Ainsi, le MCP-1 permettrait la migration des monocytes alors que l'extravasation des cellules T serait médiée par le SDF-1 (Baggiolini, 1998, 2001).

L'Homme et l'animal possèdent naturellement des cellules T capables de reconnaître des antigènes cérébraux (pour revue, Bhat et Steinman, 2009). On peut toutefois noter que des LT activés ayant infiltrés dans un SNC sain sont généralement incapables de provoquer une réaction immune. Un environnement défavorable à la survie et à l'activité des LT pourrait expliquer cette forte homéostasie. Ainsi, le manque, voire l'absence, des molécules du CMH et des signaux de costimulation dans le cerveau sain rendent impossible la restimulation intracérébrale des LT qui vont rapidement mourir via un mécanisme apoptotique (Bauer et al., 1998). Il a été suggéré que le récepteur Fas/Apo1 (CD95), présent sur les LT, reconnaitrait le ligand Fas Ligand (CD95L) présent à la surface de nombreuses cellules du tissu nerveux (Bechmann et al., 1999; Lee et al., 2000) et que cette interaction serait à l'origine de la mort des LT par apoptose (Flugel et al., 2000; Suvannavejh et al., 2000). D'autre part, l'expression constitutive de la cytokine anti-inflammatoire TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) dans le LCR, favoriserait un environnement immunosuppresseur en empêchant notamment la prolifération des LT (Taylor et Streilein, 1996).

Concernant les lymphocytes B, les travaux de Knopf et al., indiquent cependant que lors de processus pathologiques, ou en condition inflammatoire, les lymphocytes B peuvent pénétrer dans le SNC, subir une expansion clonale, se différencier en plasmocytes et sécréter des anticorps (Knopf et al., 1998).

## 3.4-Présence de cellules immunocompétentes au sein du système nerveux central

#### 3.4.1-Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont de petites cellules, peu nombreuses, d'origine mésodermique, ayant migré dans le SNC au cours du développement fœtal (del Rio-Hortega et al., 1932). Elles sont les principales cellules effectrices de l'immunité innée dans le SNC. Elles représentent environ 10% de la totalité des cellules nerveuses (Perry, 1998). Les cellules microgliales sont considérées comme étant les macrophages résidents du SNC. Néanmoins, dans un cerveau sain adulte, la microglie présente une structure ramifiée qui correspondrait à un état quiescent. A l'état de repos la microglie est décrite comme sécrétant des cytokines immunosuppressives comme le Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (Kiefer et al., 1995). En règle générale, de nombreux marqueurs leucocytaires, et même ceux restreints aux macrophages, ne sont exprimés que très faiblement sur la microglie au repos, reflétant le microenvironnement du SNC (Perry et Gordon, 1987; Streit, 2002) comme par exemple les molécules du CMH, du Leukocyte Common Antigen (LCA ou CD45), du CD11b, du CD14 (co-récepteur pour la détection du lipopolysaccharide bactérien (LPS)) ou des marqueurs CD4. Lors de processus inflammatoires, les cellules microgliales sont capables de se différencier en cellules phagocytaires amiboïdes. L'expression des molécules du CMH II augmente sensiblement, suggérant une participation à la présentation antigénique (Sedgwick et al., 1998; Ulvestad et al., 1994; Williams et al., 1994). Les cellules microgliales expriment les molécules de costimulation nécessaire à l'activation des LT (Aloisi, 2001) comme le CD40, CD80 ou encore CD86. Elles apparaissent également comme la principale source de cytokines dans le SNC (Hanisch, 2002). Ces dernières favoriseraient le développement des réactions inflammatoires en induisant une surexpression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, favorisant ainsi l'adhésion des monocytes et leucocytes circulants à la BHE (Pober et al., 1986; Brett et al., 1989), également par la sécrétion des chimiokines telles que MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) qui facilitent l'infiltration des leucocytes et des monocytes circulants dans le SNC (Calvo et al., 1996).

Outre ces fonctions pro-inflammatoires, la microglie a la capacité de synthétiser des facteurs neurotrophiques tels que le NGF, le BDNF, NT-3 et NT-4 leur conférant un probable

potentiel neuroprotecteur (Nakajima et al., 2001).

## 3.4.2-Les astrocytes

Ce sont les cellules les plus représentées dans le SNC. Elles occupent près d'un tiers du volume du cortex cérébral. Elles possèdent des prolongements multiples qui se terminent par des expansions sur les membranes basales des capillaires, les pieds périvasculaires, qui jouent un rôle déterminant sur l'étanchéité de la BHE. D'autres prolongements se terminent par opposition étroite sur les régions non synaptiques des neurones. Du fait de leur caractéristique anatomique, les astrocytes sont considérés comme intermédiaire dans les échanges métaboliques entre les neurones et le sang. Ils sont également le support architectural des neurones jouant un rôle dans la réparation des lésions, la protection neuronale et l'homéostasie cérébrale. Par exemple, les astrocytes assurent la détoxification du milieu en garantissant la recapture et la métabolisation du glutamate par la glutamine synthétase.

Les astrocytes sont capables de répondre aux variations de l'environnement (lésions, traumatismes, inflammation) par un phénomène d'activation ou astrogliose, caractérisé par une hypertrophie cellulaire et une forte augmentation de l'expression d'un filament intermédiaire spécifique des astrocytes, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Amaducci et al., 1981; Aquino et al., 1988) et de la vimentine (Schiffer et al., 1986; Petito et al., 1990) exprimée en règle générale par les cellules en cours de prolifération. En cas de lésion et/ou d'inflammation, les astrocytes peuvent produire des molécules proinflammatoires qui stimulent l'activation microgliale. Selon les travaux de Nikcevich et al., 1997, les astrocytes activés pourraient exprimer les molécules du CMH II ainsi que la molécule de co-stimulation B7 leur permettant de présenter les antigènes et d'assurer une activation cellulaire T (Nikcevich et al., 1997). Cette propriété reste cependant très controversée et un rôle des astrocytes comme cellules présentatrices d'antigènes efficaces est un événement extrêmement rare s'il existe vraiment (Cross et Ku, 2000).

D'autre part, les astrocytes activés présentent des propriétés régulatrices de l'inflammation en libérant des cytokines anti-inflammatoires comme le TGFb. Elles sont également capable de neuroprotection par la production de BDNF et de NGF (Neveu et al., 1992) qui assurent et contrôlent les processus inflammatoires dans le SNC.

Nous venons de voir que le SNC représentait un site particulier au niveau immunologique de part notamment son isolement physique du reste de l'organisme. Cependant, l'existence d'un drainage lymphatique certes particulier mais adapté, et la présence de cellules microgliales à fortes propriétés inflammatoires soulignent que le SNC est capables de répondre à des agressions extérieures comme la pénétration de pathogènes ou la transplantation cellulaire. Nous savons qu'une greffe intracérébrale et notamment une xénogreffe conduit inexorablement à un rejet. Dans le chapitre suivant, nous présenterons les caractéristiques du rejet dont la compréhension est essentielle pour la mise en place d'une thérapie de xénotransplantation.

# IV-LE REJET DES XENOGREFFES INTRACEREBRALES

Malgré des études montrant que les xénogreffes neuronales dans le SNC sont capables de survivre sur une période prolongée sans l'emploi d'immunosuppresseur (Bjorklund et al., 1982; Daniloff et al., 1985), la plupart des études récentes, y compris les nôtre, indiquent que les xénogreffes neuronales provoquent, dans une grande majorité des cas, une réaction immune menant à la destruction du transplant (Finsen et al., 1991; Duan et al., 1995; Wood et al., 1996; Larsson et al., 2000; Larsson et al., 2001;Remy et al., 2001).

## 4.1- Absence de rejet hyper aigu

La xénotransplantation se définie comme la greffe de cellules entre espèces différentes. Lors d'une xénogreffe, apparaît un rejet violent et rapide, appelé rejet hyper aigu qui fait intervenir des anticorps déjà présents chez le receveur, plus communément appelés xénoanticorps naturels (XAN). Dans le cas de l'Homme et des primates non-humains, c'est essentiellement la présence de XAN dirigés contre le Gal  $\alpha$ (1-3) Gal, un épitope sucré exprimé par la plupart des autres espèces animales (Galili et al., 1988), qui entraîne une activation de la cascade du complément et un rejet hyper aigu.

Pourtant, les xénogreffes neuronales intracérébrales ne paraissent pas provoquer de rejet hyper aigu (Mason et al., 1986; Wood et al., 1996; Larsson et al., 1999). Ceci serait lié au fait que les cellules placées dans le parenchyme cérébral seraient largement isolées de facteurs humoraux de l'immunité du fait de l'étanchéité de la BHE.

## **4.2-Le rejet humoral**

Le rejet humoral constitue la réponse immune médiée par des effecteurs humoraux. Il s'agit, plus particulièrement, des anticorps (ou immunoglobulines, Ig) et des facteurs du complément. Ainsi, suite à la transplantation de cellules ou d'organes en périphérie, les anticorps présents chez le receveur peuvent se fixer sur les antigènes du greffon. Puis, le complexe antigène-anticorps active le système du complément.

## 4.2.1-Le rôle des immunoglobulines (Ig)

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont produits, soit comme une protéine intégrale de la membrane des lymphocytes B, où ils interviennent comme récepteurs pour l'antigène, soit sous une forme secrétée soluble. Les Ig ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène (Ag). Cette spécificité liée à la présence de site de liaison à l'Ag extrêmement variée. (Figure 15).





Les Ig ont toutes une structure de base de quatre chaînes polypeptidiques. Elles sont composées de deux chaînes légères identiques et deux chaînes lourdes identiques stabilisées et liées par des ponts disulfures qui assurent la flexibilité de la molécule. Les régions constantes sont caractérisées par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre. Une Ig possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux « bras ». L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère constitue le site de reconnaissance de l'antigène.

Dès les premiers jours après la transplantation, les Ig secrétées peuvent librement pénétrer le parenchyme cérébral en raison de la rupture de la BHE du fait du geste chirurgical. Des études ont montré que la BHE peut rester ouverte jusqu'à une à deux semaines après l'opération (Brundin et al., 1989). Pourtant, l'absence de rejet dans les premières semaines suivant l'implantation cellulaire suggère que les anticorps n'exercent pas de rôle déterminant dans le processus de rejet. Cependant, leur présence ne doit pas être négligée puisque Harrower a montré que le tissu neural mésencéphalique issu des embryons de porcs de 28 jours exprime l'épitope  $\alpha$ -Gal (Sumitran et al., 1999b; Harrower et al., 2002). Ce dernier serait exprimé par les neuroblastes, les cellules souches, les cellules endothéliales ainsi que la microglie. Il est toutefois à noter que la déplétion en anticorps anti-Gal élimine toute cytotoxicité d'un sérum humain contre les cellules endothéliales aortiques porcines mais n'altère pas la cytotoxicité contre les cellules embryonnaires porcines issues du MV. Cette observation suggère l'existence d'autres antigènes naturels capables d'activer la cascade du complément et une implication des Ig dans le réponse immune a été confortée via l'utilisation de souris déficientes en Ig, qui présentent un retard de rejet (Larsson et al., 1999). Les Ig pourraient donc participer au rejet des xénogreffes de neurones selon un mécanisme qui reste à préciser.

#### 4.2.2-Le rôle du complément

Le système du complément est un composant clé de la réponse immune innée puisqu'il joue un rôle central dans la défense de l'organisme contre des pathogènes notamment grâce à son action sur l'activation cellulaire et la phagocytose des cellules invasives (Frank et Fries, 1991). D'une part, le système du complément est impliqué dans l'activité cytotoxique et cytolytique via la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) également appelé C5b-9, sur les membranes des cellules cibles. D'autre part, il serait également impliqué dans la réparation et le remodelage des tissus nerveux. L'une des hypothèses avancée serait que les débris cellulaires ou les cellules apoptotiques possédant une molécule du système du complément (C1q, C3) à leur surface, seraient reconnus et éliminés par les cellules microgliales activées ou les macrophages exprimant des récepteurs du complément tels que CR3 (Gasque et al., 2000).

48

Il a été montré qu'*in vitro*, les facteurs du complément humain étaient capables de provoquer une lyse de tissu neural porcin suite à leur liaison à des anticorps préformés (Sumitran et al., 1999b). Toutefois, ces facteurs n'occuperaient pas de rôle primordial dans le rejet d'une xénogreffe neuronale, puisque les neurones transplantés ne survivent pas plus longtemps dans un cerveau de souris déficientes en complément. De la même façon, l'injection de venin de cobra, connu pour dépléter 95% des facteurs du complément, n'améliore pas la survie de xénogreffes neuronales porcines chez le rat (Barker et al., 2000). Il n'est cependant pas exclu que les facteurs du complément enclenchent des réponses cellulaires en agissant, par exemple comme chimioattractants et activateurs des cellules microgliales. Par ailleurs, le complément pouvant avoir un effet sur le mécanisme de présentation antigénique aux cellules T (Arvieux et al., 1988), il pourrait contribuer à déclencher une infiltration leucocytaire (Pratt et al., 1996) sur le site d'implantation.

## **4.3-Le rejet cellulaire**

Le rejet cellulaire fait intervenir des effecteurs tels que les phagocytes, les cellules T et les cellules NK. Il est le plus souvent associé une réponse immune adaptive nécessitant l'intervention de cellules spécialisées qui vont permettre de répondre spécifiquement et de garder la mémoire de l'antigène.

## 4.3.1-Le rôle des macrophages perivasculaires

Les macrophages périvasculaires (MPV) n'appartiennent pas au parenchyme nerveux mais sont très largement associés au réseau vasculaire du SNC car ils sont retrouvés au niveau de la membrane basale qui entoure les vaisseaux. Ils peuvent dès lors rapidement avoir accès au striatum transplanté suite à la rupture de la BHE occasionnée lors du geste chirurgical. Les MPV sont des phagocytes professionnels qui partagent la même origine que les cellules microgliales (Hickey et Kimura, 1988). Il semblerait en effet, que les monocytes migrant jusqu'au niveau du cerveau pendant l'embryogénèse, se différencient par la suite en cellules microgliales ou en macrophages périvasculaires en fonction des signaux adressés par leur microenvironnement (Jordan et Thomas, 1988). Ainsi, les origines communes avec les cellules microgliales, qui suite à leur activation adoptent des caractéristiques similaires aux MPV, rendent la distinction difficile lorsque les deux types cellulaires sont présents dans les greffons. C'est la raison pour laquelle dans la suite de ce manuscrit nous parlerons des cellules microgliales/macrophages pour qualifier la population cellulaire issue de la lignée myéloïde qui apparaît dans les xénogreffes.

## 4.3.2-Le rôle des cellules microgliales

Dans les quelques jours qui suivent la transplantation, les cellules microgliales vont secréter différentes cytokines et chimiokines susceptibles de jouer un rôle déterminant dans la réponse immune et la réaction inflammatoire. L'un de ces facteurs est le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) (Melchior et al., 2002), une chimiokine qui favorise l'infiltration des leucocytes circulants dans le SNC (Calvo et al., 1996). Néanmoins, malgré cette synthèse précoce de chimiokines, les leucocytes ne sont pas détéctés dans le parenchyme cérébral de rat dans les premières semaines qui suivent la transplantation de neurones embryonnaires porcins (Barker et al., 2000; Remy et al., 2001; Melchior et al., 2002).

Quelques semaines après l'opération, le processus de rejet s'amorce et la disparition du greffon se produit très rapidement. La greffe est alors infiltrée par des cellules microgliales activées/macrophages qui expriment fortement les marqueurs Ox42 et ED1. Cette infiltration s'accompagne d'une forte accumulation des ARNm spécifiant diverses cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$  et l'INF $\gamma$ , ainsi que les chimiokines MCP-1, MIP-1 (Melchior et al., 2002). Les cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans l'initiation et la coordination de la réponse inflammatoire via l'IL-6 (Laurenzi et al., 2001), dans l'induction des molécules de CMH, dans la prolifération des cellules T (Hanisch et al., 1996), dans la mort neuronale via l'IL-1 (Rothwell, 1997; Loddick et al., 1998) et le TNF $\alpha$ qui favorisent la libération de glutamate par les astrocytes (Bezzi et al., 2001). Le TNF $\alpha$  peut également induire l'augmentation de la perméabilité et du pool des molécules d'adhésion sur la surface endothéliale pour permettre une adhésion renforcée des monocytes et des lymphocytes circulants à la surface du capillaire (Pober et al., 1986; Brett et al., 1989) et favoriser leur infiltration dans le SNC. Dans ces conditions, l'activation microgliale est entretenue, sinon stimulée par les cellules T qui produisent de l'INF $\gamma$ .

## **4.3.3-Le rôle des astrocytes**

La transplantation intracérébrale se caractérise également par une astrogliose observable dès les premiers jours qui suivent l'opération ainsi qu'au moment du rejet (Michel et al., 2006). Cette activation cellulaire peut se traduire par la libération de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF $\alpha$  qui vont fortement influencer les astrocytes et les cellules microgliales pour l'entretien de la réponse inflammatoire (Aschner, 1998). Par ailleurs, l'astrogliose induit également la libération de facteurs tels que le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) et le GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor) qui favorisent l'activation et la prolifération des cellules microgliales.

## 4.3.4-Le rôle des lymphocytes T

Malgré une intervention limitée de la réponse humorale, les xénogreffes n'en restent pas moins rejetées après transplantation intracérébrale, suggérant l'implication d'un autre type cellulaire. S'ajoutant aux études *in vitro* selon lesquelles les cellules neurales porcines sont capables d'induire une réponse proliférative des cellules T humaines (Brevig et al., 1997), plusieurs observations suggèrent un rôle essentiel des cellules T lors dans le rejet des xénogreffes intracérébrales. D'une part, le rejet des xénotransplants peut être prévenu par le traitement des animaux receveurs avec des anticorps dirigés contre les cellules T, tels que l'anti-fragment  $\alpha\beta$  du récepteur des cellules T (anti-TCR $\alpha\beta$ ) et l'anti-CD2 (Okura et al., 1997), ou encore l'anti-récepteur à l'IL-2 (Honey et al., 1990). D'autre part, la survie des xénogreffes neuronales peut être augmentée par le traitement des animaux receveurs par des drogues immunosuppressives capables de limiter la réponse T, telle que la cyclosporine A (Brundin et al., 1989). Enfin, histologiquement, un infiltrat massif de cellules T est observé au niveau du site d'implantation des cellules fœtales neuronales porcines chez le rat quelques semaines après leur implantation (Duan et al., 1995; Larsson et al., 2001b; Remy et al., 2001; Michel et al., 2006; Michel et al., 2010).

## 4.4-La réponse cellulaire T

## 4.4.1-Les différents types de cellules T

#### 4.4.1.1-Les cellules T CD4<sup>+</sup>

Les LT CD4<sup>+</sup> reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les molécules de CMH de classe II exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces cellules CD4<sup>+</sup> ont une fonction auxiliaire dans la réponse immune, d'où leur nom de « lymphocyte T helper (Th) ». Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont les premières à reconnaître l'agent étranger et grâce à la production et sécrétion de cytokines elles stimulent les cellules T CD8<sup>+</sup> et leur propriété cytotoxique, mais aussi les cellules B pour la production d'anticorps (ou immunoglobulines, Ig). Par leur capacité à recruter et activer de nombreuses cellules effectrices, les cellules CD4<sup>+</sup> auraient, par conséquent, un rôle primordial lors du rejet de greffe. Ces observations sont confortées par une survie prolongé d'un xénotransplant cérébral après inactivation fonctionnelle ou déplétion des cellules CD4+ (Okura et al., 1997; Wood et al., 1996).

Selon l'activation, les cellules T CD4<sup>+</sup> se divisent en deux sous populations distinctes appelées Th1 et Th2, chacune caractérisée par un profil particulier de production cytokinique (Mosmann et al., 1986) (Figure 16). Activées lors de la reconnaissance antigénique, les cellules Th « naïves ou précurseurs » prolifèrent, secrètent de l'IL-12, expriment le récepteur IL-12R $\beta$ 1 (sous unité  $\beta$ 1 du récepteur à l'Il-12) et deviennent ainsi des cellules Th0. La polarisation de la cellule Th0 en Th1 ou Th2 est déterminée par des cytokines spécifiques. Alors que les cellules Th2 sont davantage associées à une réponse de type humorale via l'activation de la synthèse d'anticorps, les cellules Th1 favorisent la réponse cellulaire. L'analyse quantitative des cytokines secrétées lors du rejet de neurones embryonnaires porcins après leur implantation intrastriatal chez le rat, semble révélée une contribution majeure des cellules Th1 (Melchior et al., 2002).



Figure 16 : La différenciation des cellules T CD4+ en Th1 ou Th2.

## 4.4.1.2-Les cellules T CD8<sup>+</sup>

Les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissent les peptides présentés par les molécules du CMH de classe I. Bien que ces cellules soient également capables de produire de grandes quantités de cytokines, elles induisent, en général, la lyse directe des cellules cibles, d'où leur nom de « lymphocytes T cytotoxiques (Tc) ».

La fonction cytotoxique des LTc est principalement caractérisée par la synthèse, calcium-dépendante, de perforine et de granzymes (A et B) qui induisent la mort de la cellules cible par apoptose (Shresta et al., 1998). Les LTc peuvent également induire le mécanisme d'apoptose via l'intéraction Fas/Fas Ligand (Sad et Mosmann, 1996).

Toutefois, l'expression des molécules de CMH I dans le cerveau sain, étant quasi inexistante, il y a donc peu de cibles des Tc dans le cerveau à l'état normal. Les neurones sont particulièrement réfractaires à l'induction de l'expression des CMH I via la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF $\gamma$ . Ils ne peuvent donc pas être détruits par les Tc, ce qui les rend sensibles aux infections virales persistantes (Joly et al., 1991). Cette absence d'induction ne concerne cependant que les neurones fonctionnels et électriquement actifs. En effet, le blocage de cette activité par la tétrodotoxine restaure la possibilité d'induction de l'expression de CMH I via l'INF $\gamma$  sur les neurones (Neumann et al., 1997). Quant aux autres types cellulaires présents dans le SNC (oligodendrocytes, astrocytes et cellules microgliales), l'expression de CMH I n'a été

observée que suite à des expositions importantes de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'INF $\gamma$  (Vass et Lassmann, 1990).

Il est à noter que la déplétion des animaux receveurs en cellules CD8<sup>+</sup> n'induit pas de survie prolongée d'une xénogreffe intracérébrale (Wood et al., 1996), indiquant un rôle mineur de cette population cellulaire dans le rejet de telles greffes.

## 4.4.2-Le mécanisme d'activation des cellules T

L'activation des cellules T nécessite la présentation d'un antigène couplé à une molécule du CMH. Une réponse immunitaire spécifique de l'antigène est initiée par une interaction entre le TCR (récepteur du lymphocyte T) et le complexe CHM-peptide de la cellule présentatrice d'antigène (CPA). Cette interaction seule ne fournit qu'un signal faible qui conduit à l'activation d'une partie de la fonction effectrice du LT comme par exemple la production de cytokines. Cependant ce signal bloque la prolifération clonale du LT et peut même induire son apoptose (Russell et al., 1991 ; Russell et al., 1992). Pour une activation complète du LT, un deuxième signal est nécessaire, le signal de costimulation. Celui-ci est fourni par la CPA en association avec le signal du TCR (Mueller et al., 1989). Par exemple, le CD80 (B7-1) ou le CD86 (B7-2), des molécules membranaires de la CPA, fournissent le signal de costimulation en activant le récepteur CD28 du lymphocyte T (Figure 17). Suite à cette activation, les LT se transforment en cellules effectrices ou en cellules mémoires.



Figure 17: Mécanismes d'activation des cellules T. Pour une activation complète, les cellules T reconnaissent un complexe CMH-peptide sur les CPA grâce à leur TCR. Ce premier signal doit impérativement être accompagné d'un signal de costimulation. Ce dernier est délivré, entre autres, par l'interaction entre la molécule B7 de la CPA et le CD28 présent sur le lymphocyte T.

## **V-LES CELLULES SOUCHES**

## 5.1-Définition

Les cellules souches se caractérisent par leur caractère indifférencié et leur capacité d'auto-renouvellement (Hall et Watt, 1989). On distingue différentes catégories de cellules souches selon leur potentiel de différenciation (Figure 18) :

- Les cellules souches totipotentes qui sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme. Par prolifération et différenciation, elles peuvent conduire au développement d'un individu entier. Elles correspondent au zygote et aux cellules de l'embryon jusqu'au stade 8 cellules de la morula (Bongso et Richards, 2004).
- 2) Les cellules souches pluripotentes ont également vocation à former tous les tissus de l'organisme dérivés des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) mais contrairement aux cellules totipotentes, elles sont incapables de générer un individu complet car elles ne peuvent pas donner naissance aux annexes embryonnaires comme le placenta ou encore l'amnios. Ces cellules pluripotentes correspondent aux cellules embryonnaires (cellules ES). Elles sont dérivées de la masse interne du blastocyste.
- Les cellules souches multipotentes résident dans les tissus différenciés. Elles peuvent générer les différents types cellulaires du tissu originel.
- Les cellules souches unipotentes, dépourvues d'auto-renouvellement. Elles ont un potentiel très restreint, ne pouvant se différencier qu'en un type cellulaire bien précis.



Figure 18 : les différents types de cellules souches

Il est également important de noter qu'aux cellules souches embryonnaires et adultes s'ajoute à présent, un troisième type de cellules souches dites induites (iPS). Elles correspondent à des cellules somatiques que l'on a reprogrammées pour qu'elles acquièrent les propriétés de prolifération et de pluripotence des cellules ES.

## **5.2-Les cellules souches neurales**

Dans le SNC, les cellules souches multipotentes correspondent aux cellules souches neurales (CSN). Elles sont définies sur la base de deux propriétés fonctionnelles : une capacité d'auto-renouvellement et la possibilité de générer les différents types cellulaires du SNC à savoir les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Cette différenciation se fait par l'intermédiaire de précurseurs neuronaux ou gliaux (Seaberg et van der Kooy, 2003) qui correspondent à des cellules prolifératives dont la capacité d'auto-renouvellement et le potentiel de différenciation sont restreints (McKay, 1997) (Figure 19). Les CSN sont présentes dans le cerveau embryonnaire (Kalyani et al., 1997) ainsi que dans certaines structures du cerveau adulte dans lesquelles la neurogénèse reste active (Palmer et al., 1997; Eriksson et al., 1998; Johansson et al., 1999).



Figure 19 : Différenciation des cellules souches neurales (CSN). Les CSN sont des cellules multipotentes dotées d'une capacité d'auto-renouvellement. Elles se différencient en précurseurs neuronaux (PN) ou gliaux (PG) capables de générer les principaux types cellulaires du SNC, à savoir les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. (Adapté de Gage, 2000).

## 5.2.1-Les cellules souches neurales chez l'embryon

Lors du développement embryonnaire normal, le tube neural est constitué par une population cellulaire homogène appelée les cellules souches neuroépithéliales (Kalyani et al., 1997). Ces cellules prolifèrent, formant la première population identifiable de CSN. Elles se concentrent dans une zone de prolifération appelée la zone ventriculaire formée par une simple couche d'épithélium pseudostratifié. La prolifération des cellules s'accompagne d'un phénomène d'apoptose qui maintient constant le pool de CSN (Li et al., 2002; Sommer et Rao, 2002). Ainsi, le nombre de CSN est défini par un équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire.

Les cellules neuroépithéliales communiquent entre elles via des jonctions Gap (Nadarajah et al., 1998) et au cours de l'embryogénèse, elles se différencient en progéniteurs neuronaux et gliaux pour générer les neurones et les cellules gliales du SNC (Morrison et al., 1997; Gage, 2000) (Figure 20).



Figure 20: La neurogénèse chez l'embryon. Les cellules neuroépithéliales (CNE) sont localisées dans une zone appelée zone ventriculaire (VZ) où elles se divisent permettant la genèse de la glie radiaire et des neuroblastes. Les CNE émettent de longs prolongements en direction du ventricule et de la surface externe du tube neural, permettant ainsi la migration des neuroblastes. Lors de leur migration, les neuroblastes se mettent à exprimer des marqueurs de différenciation. A la fin de la migration neuronale, la glie radiaire se rétracte pour se transformer en astrocytes et les CNE de la zone ventriculaire génèrent des glioblastes qui migrent vers la zone sous ventriculaire pour se différencier en astrocytes ou en oligodendrocytes (Adapté de Clarke, 2003)

#### 5.2.2-Les cellules souches neurales chez l'adulte

La neurogénèse dans le SNC des mammifères adultes a longtemps été considérée comme improbable suivant le dogme de Ramon y Cajal en 1913, mais en 1965, les travaux de Altman et Das chez le rat ont clairement identifié un renouvellement cellulaire au sein du SNC (Altman et Das, 1965). Des études basées sur l'incorporation de bromodeoxyuridine ou

l'infection par des rétrovirus ont confirmé une neurogénèse active dans des régions bien particulières du SNC (Corotto et al., 1993; Seki et Arai, 1993). Deux principales zones neurogéniques, ou niches germinatives, ont été décrites (Figure 21) :

- la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (ZSV) (Lois et Alvarez-Buylla, 1993, 1994)

la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (ZSG) (Bayer et al., 1982;
Kuhn et al., 1996; Gould et al., 1998)



Figure 21 : Neurogénèse chez l'adulte. Avant les années 1990, aucune zone de neurogénèse n'avait clairement été identifiée dans le SNC adulte. Les travaux menés au début des années 90, ont mis en évidence deux zones de neurogénèse chez l'adulte : la ZSV et la ZSG. Les CSN issues de la ZSV migrent via le courant migratoire rostral jusqu'au bulbe olfactif où elles se différencient (Lois et Alvarez-Buylla, 1994 ; Kornack et Rakic, 2001 ; Carlen et al., 2002). Les CSNde la ZSG migrent dans la couche granulaire du gyrus denté où elles se différencient (Cameron et McKay, 2001). (Adapté de Gould, 2007)

## 5.2.3-Isolement et prolifération des CSN in vitro

En 1992, les travaux de Reynolds ont montré qu'il était tout à fait possible d'isoler des CSN à partir de cerveaux embryonnaires ou adultes de souris (Reynolds et al., 1992). Ces cellules en présence d'EGF ou de bFGF prolifèrent *in vitro* sous forme d'un amas cellulaire appelé neurosphères.

Les neurosphères sont des structures sphériques, exprimant la nestine, un filament intermédiaire présent dans les CSN et les CNE (Lendahl et al., 1990). Seul 20% des cellules constituant les neurophères possèdent les caractéristiques de CSN capables de division asymétrique. Les autres sont déjà engagées dans une des voies de différenciation gliale ou neurale. Une neurosphère est donc constituée de CSN et de précurseurs gliaux et neuronaux (Galli et al., 2003) (Figure 22).



Figure 22 : Les CSN *in vitro*. En présence d'EGF ou de bFGF, les CSN prolifèrent en suspension sous forme de neurosphères. Ces neurosphères sont composées de CSN, de précurseurs neuronaux et et de précurseurs gliaux. (Adapté de Reynolds et Weiss, 1996).

Les capacités d'auto-renouvellement et la multipotence des CSN ont constitué un réel espoir pour le traitement des maladies neurodégénératives. De plus, leur faible immunogénicité permettait d'éviter les problèmes de rejet notamment lors de xénogreffes.

## 5.2.4-Les CSN en transplantation

## 5.2.4.1-Autotransplantation

La découverte au cours du XX<sup>ème</sup> siècle de l'existence d'une neurogenèse adulte chez les mammifères a ouvert de nouvelles possibilités pour la thérapie cellulaire de remplacement. Des CSN dérivées du tissu cérébral adulte de rongeurs et transplantés de façon autologue dans le SNC de ces animaux ont révélé une intégration fonctionnelle dans le parenchyme cérébral, confirmant leur utilisation thérapeutique potentielle (Taupin et Gage, 2002, Muraoka et al., 2006). Ces observations offrent l'opportunité de réaliser des transplantations sans immunosuppression, en prélevant des CSN dans des régions non lésées du SNC et en les amplifiant in vitro. Actuellement, seul un patient atteint de la maladie de Parkinson a pu bénéficier d'une telle greffe (Levesque et al., 2009). Les CSN ont été isolées à partir du cortex pré-frontal et de la région sous-corticale à l'occasion de la pose d'un dispositif d'électrostimulation. Les cellules ont été amplifiées in vitro pendant 6 mois en présence de bFGF et d'EGF, puis cultivées 14 jours en présence d'acide rétinoïque (all-trans), d'AMPc, de FGF8 et de GDNF afin d'obtenir un maximum de neurones post mitotiques exprimant la tyrosine hydroxylase et la dopa decarboxylase. Les cellules ont été greffées unilatéralement dans le striatum du patient en l'absence de tout traitement immunosuppresseur. Une augmentation de la capture de Fluro-dopa a été observée à 3 et 12 mois du côté greffé. Une amélioration motrice a été observée jusqu'à 36 mois post-greffe, mais à partir de la 4<sup>ème</sup> année, une détérioration du comportement moteur du patient a été observé (Levesque et al., 2009). Des analyses complémentaires devraient permettre de déterminer si la détérioration est du à la perte du greffon

#### 5.2.4.2 Allotransplantation

Les CSN sont considérées comme moins immunogènes que les cellules différenciées car elles n'expriment pas le CMH II dans des conditions physiologiques normales (Klassen et al., 2001 ; Hori et al., 2003). Il est toutefois à noter que lors de processus inflammatoires, la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , peut induire l'expression de molécules immunogènes à la surface des CSN (Johansson et al., 2008 ; Yin et al., 2008, (Imitola et al., 2004) susceptibles de favoriser une réaction inflammatoire et une réponse immune de l'hôte. La meilleure survie de CSN autologue comparativement à des CSN

allogenique suggère qu'il peut être nécessaire de contrôler la réponse immune de l'hôte même en cas de greffe de CSN (Muraoka et al., 2006). Concernant la source des CSN, il semblerait que les CSN d'origine fœtale aient une meilleure capacité proliférative et de différenciation neuronale comparativement à des CSN adultes qui selon les travaux de Dziewczapolski, s'intègre en nombre limité dans le tissu cérébral de leur hôte et présente une faible survie (Dziewczapolski et al., 2003). Pourtant, l'allotransplantation de CSN permettrait de s'affranchir des considérations éthiques liées à l'utilisation de tissus embryonnaires. Les résultats de Levesque et al., suggèrent que des améliorations techniques sont possibles pour améliorer la survie et la différenciation des CSN adultes (Levesque et al., 2009).

## 5.2.4.3-La xénotransplantation

Afin de s'affranchir des problèmes éthiques liés à l'utilisation de matériel fœtal d'origine humaine, l'utilisation de CSN animales pourrait être une bonne alternative. Des CSN porcines, greffées chez un rat lésé à la 6-OHDA et immunosupprimé à la cyclosporine A, ont montré leur capacité à se différencier en neurones dopaminergiques (Armstrong et al., 2002). Elles sont en outre capables de stimuler la croissance axonale des neurones de l'hôte. Ces propriétés, corrélées à une faible immunogénicité, en font de très bonnes candidates pour une thérapie cellulaire régénérative.

## VI-Les cellules souches mésenchymateuses

## 6.1-Généralités

Dans les années 70, Friedenstein a été le premier à identifier des cellules adhérentes de type fibroblastique dans des cultures de moelle osseuse adulte. Il les appellera CFU-Fs pour « Colony-forming unit-fibroblasts » (*Friedenstein et al., 1974*). En 1988, apparaîtra la notion de cellules souches stromales capables d'auto-renouvellement et de différenciation (Owen, 1988) et en 1991, Caplan posera l'appellation de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) (Caplan, 1991), correspondant aux cellules non hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse. Les MSCs sont en fait très rares dans la moelle osseuse. En effet, la moelle osseuse renferme une population hétérogène de progéniteurs à différentes étapes d'engagement dans la lignée mésodermique et seulement une infime partie sont des cellules souches capables de multipotence et d'auto-renouvellement. En revanche, ces cellules sont présentes dans de nombreux autres tissus chez le fœtus ou l'adulte (Tableau 2).

Moelle osseuse	Jones EA 2002 ; Ferrari G 1998	
Trabécule osseux	Tuli R 2003	
Périoste	Cuevas P 2004	
Cartilage	Alsalameh S 2004	
Synovie	De Bari C 2001	
Liquide synovial	Jones EA 2004	
Muscles	Young HE 2001	
Tissu adipocytaire	De Bari C 2003	
Tendons	Salingcarnboriboon R 2003	
Sang Kuznetsov SA 2001		
Vaisseaux sanguins Abedin M 2004 ; Doherty MJ 1998		
Vaisseaux sanguins du cordon ombilical Romanov YA 2003		
tissus foetaux	Hernigou P 2002 ; Hu Y 2003	
Peau	Young HE 2001	
Rate et Thymus	Ferrari G, 1998	

Tableau 2 : Liste des tissus incluant des MSCs.

Actuellement, l'isolement des MSCs est maîtrisé pour différentes espèces comme l'Homme (Pittenger et al., 1999), la souris (Baddoo et al., 2003), le rat (Santa Maria et al., 2004), le babouin (Devine et al., 2001), le mouton (Airey et al., 2004), le chien (Silva et al., 2005), le porc (Moscoso et al., 2005) et la vache (Bosnakowski et al., 2005).

## **6.2-Marqueur et fonctions des MSCs**

Les cellules souches mésenchymateuses, appelées également cellules souches stromales multipotentes, sont des cellules adhérentes capables de proliférer *in vitro* pour former des colonies. Elles sont multipotentes, pouvant être dérivées en cellules osseuses, cartilagineuses ou graisseuses (Horwith et al., 2005).

En culture, les MSCs présentent une forte hétérogénéité d'expression des marqueurs en fonction de l'espèce, de la source tissulaire ou des conditions de culture, mais il existe un consensus sur l'absence de CD11b (marqueur des cellules immunes) et de CD45 (marqueur des cellules hématopoïétiques). Le marqueur des cellules souches hématopoïétiques, CD34, est très rarement retrouvé, de même que les marqueurs endothéliaux (CD31 ; Javazon et al., 2004). Stro-1 est un marqueur de MSCs les plus connus (historiquement un des premiers marqueurs trouvés chez l'Homme ; Gronthos et al., 2003). Les populations cellulaires négatives pour Stro-1 ne sont pas capables de former de colonies (Simmons et al., 1991).

Elles expriment également des molécules d'adhérence [CD106 (VCAM1), CD29a (intégrine  $\beta$ 1)]. Sca-1 (Antigène 1 de cellules souches, chez la souris), CD105 (endogline), CD90 (Thy-1), CD44 (récepteur hyaluronate), CD73 ou NT5 (Barry et al (2001)), CD13 (aminopeptidase), CD166 ou ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) ainsi que les antigènes du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I exprimés à leur surface (Tse et al., 2003, Chamberlain et al., 2007). En revanche, les antigènes du CMH de classe II n'ont jamais été détectés. Les MSCs expriment également de nombreux récepteurs responsables de leur adhésion à la matrice extracellulaire (Verfaillie, 1998). Ces récepteurs incluent la famille des intégrines (liaison à la fibronectine, à la laminine ou au collagène). Des récepteurs pour les molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM), et vasculaires (VCAM) ont été détectés ainsi que pour la selectine 2 (Conget et al., 1999 : Pittenger et al., 1999). Ces données suggèrent un rôle des MSCs dans la formation et la fonction du microenvironnement stromal de la moelle osseuse qui contient des signaux d'induction et de régulation non seulement pour les MSCs mais aussi pour le développement des autres cellules stromales et des progéniteurs hématopoïétiques (Majundar et al., 1998). L'hypothèse d'une participation dynamique des MSCs dans le microenvironnement de la moelle, est confortée par la mise en évidence de la production par les MSCs d'une grande variété de molécules matricielles comme la fibronectine et le collagène de type I (Azizi et al., 1998 ; Zhao et al., 2002). Cette propriété permet de faire des MSCs des agents stabilisateurs de la matrice extracellulaire.

## 6.3-Différenciation des MSCs

Les premiers travaux réalisés par l'équipe de Caplan (Haynesworth et al., 1992) ont permis de mettre en évidence le potentiel ostéogénique des MSCs. Plus récemment, il a été démontré que ces cellules avaient la capacité de se différencier également en chondrocytes et en adipocytes. Il est toutefois important de noter que la grande majorité des MSCs ne sont capables de se différencier qu'en ostéocytes suite à un traitement *in vitro* par de la dexaméthasone, de l'acide ascorbique et du B-glycérophosphate (Jaiswal et al., 1997). Outre leur potentiel de différenciation mésodermique, les MSCs seraient capables, selon certains auteurs, de se transdifférencier dans les lignées ecto- et endodermiques (Figure 23).

Durant de nombreuses années, le potentiel de transdifférenciation des MSCs en cellules neurales a été très étudié dans l'espoir de mettre en place une thérapie cellulaire pour le traitement des patients atteints de maladies neurodégénératives. Les expériences réalisées avec des lignées de MSCs murines « clonales », montraient qu'en 2 à 3 semaines, 20 à 60% de ces cellules pouvaient présenter les caractéristiques d'ostéoblastes, de chondroblastes, d'hépatocytes, de cardiomyocytes, de cellules endothéliales, ou de neurones (Schwartz et al., 2002 ; Kogler et al., 2004 ; Lee et al., 2004,; Yoon et al., 2005). L'exposition à des inducteurs particuliers aurait même permis d'induire des phénotypes sérotoninergiques, GABAergiques ou dopaminergiques, et d'acquérir certaines propriétés électrophysiologiques comparables à celle des neurones (Kondo et al., 2005 ; Dezawa et al., 2004). Ces derniers résultats sont extrêmement controversés, notamment du fait qu'avant toute induction, les MSCs pouvaient neuronales (Deng et al., 2006), et avoir des propriétés électrophysiologiques (Wislet Gendebien, 2006).



Figure 23 : Propriétés des MSCs *in vitro*. (D'après Uccelli et al., 2008). *In vitro*, les MSCs sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation en cellules de la lignée mésodermique. Certaines expériences suggèrent une capacité de transdifférenciation en cellules des lignées endodermiques et ectodermiques mais ces observations sont actuellement extrêmement controversées, notamment pour leur application *in vivo*.

## **<u>6.4-Impact sur les cellules immunes</u>**

## **<u>6.4.1-Les lymphocytes T</u>**

Les lymphocytes T furent les premières cellules pour lesquelles un effet inhibiteur des MSCs fut mis en évidence. Ainsi, en 2002, les groupes de Di Nicola et Bartholomew., montrèrent que dans une réaction lymphocytaire mixte (MLR), les MSCs inhibaient fortement la prolifération des cellules T (Di Nicola et al., 2002 ; Bartholomew et al., 2002). Les MSCs ne semblent pas affecter l'activation des cellules T puisqu'en présence de MSC, les cellules T expriment des marqueurs précoces d'activation tels que CD25 et CD69. Selon les travaux de Glennie et al., tous les lymphocytes T (mémoires, naïfs, CD4 et CD8) seraient sensibles à l'action des MSCs (Glennie et al., 2005) et l'arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire serait corrélé à une sur-régulation de p27kip1 et à une inhibition de la cycline D2. (Glennie et al., 2005) (Figure 24). Cette anergie n'est pas réversible par l'ajout d'IL2 sauf à de fortes concentrations (Bartholomew et al., 2002 ; Di Nicola et al., 2002).



Figure 24 : Inhibition de la prolifération des cellules T par les MSCs. En présence de MSCs, on note une augmentation de p27 et une diminution de la cycline D2 corrélées à un arrêt de la prolifération en phase G1 et une anergie des cellules T.

## 6.4.2-Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

En 2005, Maccario et al., ont montré que les MSCs pouvaient inhiber la réponse T indirectement en réduisant sensiblement la maturation des cellules dendritiques (DC) (Maccario et al., 2005). Une inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) et une diminution de l'expression du HLA-DR ont notamment été observées dans les cellules dendritiques cultivées en présence de MSCs (Beyth et al., 2005 ; Aggarwal et al., 2005). Il en résulte une diminution de la sécrétion des cytokines proinflammatoires (IFN $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ ) et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) par les DC. Il est à noter que le TNF- $\alpha$  a la propriété d'inhiber la maturation, la migration et la stimulation de lymphocytes T alloréactifs.

## 6.4.3-Les cellules NK

Les MSCs sont capables de réduire la libération d'IFN-γ par des cellules NK stimulées par de l'IL2 (Aggarwal et al., 2005). En revanche, seule une forte proportion de MSCs semble pouvoir inhiber l'activité cytotoxique des cellules NK et des cellules T CD8+ (ratios 1 :1 en MLR) (Maccario et al., 2005)

## 6.4.4-Les cellules B

La prolifération des cellules B est également inhibée par les MSCs (Glennie et al., 2005 ; Corcione et al., 2006). Les MSCs n'induisent pas l'apoptose des cellules B mais bloquent leur cycle cellulaire en phase G0/G1, phénomène ne nécessitant pas de contact direct entre les deux types cellulaires. Outre leur effet anti-prolifératif, les MSCs inhibent également la différenciation des cellules B en plasmocytes et une diminution de l'expression des récepteurs de chémokines (CSCR4, CXCR5 et CCR7) a été observée. Cette inhibition a pour conséquence une baisse de la production d'immunoglobulines en présence de MSCs (Corcione et al., 2006).

## 6.5-Mécanismes immunosuppressifs des MSCs

En condition normale, les MSCs n'expriment pas le CMH II et faiblement le CMH I. Elles sont également dépourvues de certaines molécules de co-stimulation telles que CD86, CD40 et CD40-L, échappant ainsi à la reconnaissance par les cellules T alloréactives (Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999). L'absence de ces molécules contribue certainement à la longue survie de greffes xénogéniques de MSC chez l'animal et chez l'Homme (Bartholomew et al., 2002 ; Devine et al., 2001 ; Rossignol et al., 2009) mais de nombreuses études suggèrent une activité immunosuppressive via la production de facteurs solubles par les MSCs. Ainsi, IDO (indoléamine 2,3 dioxygénase) sécrétée par les MSCs suite à la libération d'IFNy par les cellules cibles (Krampera et al., 2006; Ryan et al., 2007) est responsable de la déplétion du tryptophane, acide aminé essentiel à la prolifération et à l'activité lymphocytaire. Des expériences de MLR ont confirmé un puissant effet antiprolifératif de IDO sur des cellules T (Meisel et al., 2004), les lymphocytes B (Krampera et al., 2006) ou les cellules NK en association avec la prostaglandine E2 (PGE2) (Spaggiari et al., 2008). Les MSC stimulées par l'IFNy ou le TNFa produisent également iNOS (induction nitric-oxide synthase), une enzyme qui inhibe l'activation T par production d'acide nitrique (Ren et al., 2008). D'autres molécules immunosuppressives comme le TGF<sup>β1</sup> (Transforming Growth Factor-\beta1), le HGF (Hepatocyte Growth Factor), l'IL-10, HO-1 (Heme Oxygenase-1), l'IL-6 et HLA-G (une molécule HLA de classe I non classique) sont également produites par les MSCs. Ces molécules contribuent très certainement à l'effet immunosuppresseur des MSCs et à ce propos, il est intéressant de noter que la production de HLA-G soluble par les MSCs inhibe non seulement la prolifération et la cytotoxicité des cellules T et des cellules NK, mais favorise également la génération de cellules T régulatrices (Aggarwal et Pittenger, 2005). La sécrétion de molécules pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  par les cellules cibles a donc un rôle déterminant pour la mise en place d'un effet immunosuppresseur par les MSCs en stimulant la production de nombreuses molécules immunosuppressives comme PGE2 (Aggarwal et Pittenger, 2005). A ce propos, il est intéressant de noter que des souris KO pour le récepteur à l'IFNy n'ont pas d'activité immunosuppressive (Ren et al., 2008). Les mécanismes d'action de la PGE2 sur les cellules immunitaires ne sont pas bien définis à ce jour. Il a toutefois été rapporté que la PGE2 était

capable d'augmenter le niveau d'AMPc dans les cellules T entraînant une baisse significative de la production par ces dernières d'IL2 et de son récepteur (Anastassiou et al., 1992).

Parfois, un contact cellulaire entre les MSCs et les cellules T activées est nécessaire, comme par exemple pour induire la production d'IL-10 qui elle-même stimule la production et la libération de HLA-G soluble par les MSCs. Une inhibition par contact cellulaire faisant intervenir PD1 (programmed death 1) a également été mise en évidence par Augello et al., en 2005 (Augello et al., 2005).

## **6.6-Applications cliniques des MSCs**

## **6.6.1-Etudes précliniques**

De nombreuses études précliniques ont été ou sont actuellement réalisées chez l'animal. Le fort potentiel immunosuppresseur des MSCs et leur multipotence ont, en effet, suscité un très grand intérêt conduisant à nombreux essais de thérapie cellulaire (Tableau 3).

Maladie	Espèce	Organe cible	Effets des MSCs	Administration	Référence
Infarctus du myocarde	Souris	Cœur	Génération de nouveau monocytes et structures vasculaires	Locale	Orlic et al., 2001
Rejet greffe peau	Singe	Peau	Inhibition des cellules T	Systémique	Bartholomew et al., 2002
AVC	Rat	SNC	Production facteurs neurotrophiques et induction neurogénèse	Systémique	Li et al., 2002
Mélanome	Souris	Peau	Inhibition de cellules T spécifiques de la tumeur	Locale	Djouad et al., 2003
Insuffisance rénale	Rat	Rein	Inhibition production cytokines proinflammatoires et induction de facteurs trophiques et anti-apoptotiques	Systémique	Togel et al., 2005
EAE	Souris	SNC	Inhibition des cellules T spécifiques de la myéline et induction d'une tolérance périphérique	Systémique	Zappia et al., 2005
Diabète	Souris	Pancréas et glomérules rénaux	Inhibition de l'infiltration macrophagique	Systémique	Lee et al., 2006
EAE	Souris	SNC	Inhibition de la production des anticorps spécifiques de la myéline, diminution perte axonale	Systémique	Gerdoni et al., 2007
Arthrite rhumatoïde	Souris	Articulation	Inhibition cellules Tet de la production de cytokines proinflammatoires ; induction cellules T régulatrices	Systémique	Augello et al., 2007
Dégénérescence rétinienne	Souris	Yeux	Libération molécules trophiques et anti- apoptotiques	Locale	Inoue et al., 2007
Cancer poumons	Souris	Poumons	Inhibition de la production de cytokines proinflammatoires et production IL-10	Locale	Gupta et al., 2007
Infarctus du myocarde	Rat	Cœur	Effets anti-apoptotique et mitogène	Locale	Mirotsou et al., 2007
Insuffisance hépatique	Rat	Foie	Inhibition infiltration leukocytaire	Milieu de culture	Parekkadan et al., 2007
Diabète	Souris	Pancréas	Inhibition des cellules T spécifiques des cellules β	Systémique	Urban et al., 2008

Tableau 3: Différents exemples de thérapie cellulaire effectués chez l'animal. Les MSCs sont au cœur de nombreuses recherches pour le traitement de pathologies variées.
Introduction

#### **6.6.2-Etudes cliniques**

Les premières utilisations de MSCs dans des protocoles cliniques ont concerné la mise en place d'un traitement chez un enfant atteint d'une ostéogénèse imparfaite (Horwitz et al., 1999). Il a également été montré qu'une administration systémique de MSCs allogéniques permettait d'accélérer la reformation de la moelle osseuse chez des patients cancéreux ayant subit une très forte dose de chimiothérapie (Koc et al., 2000). Le potentiel immunosuppresseur des MSCs a été confirmé chez l'homme en 2004, en montrant que l'administration de MSCs à un patient atteint d'un GVHD (graft versus host disease), suite à une greffe de moelle, permettait une inhibition de la réactivité cellulaire T du donneur contre les tissus sains de l'hôte (Le Blanc et al., 2004). Les MSCs ont donc un réel potentiel thérapeutique en clinique si les bonnes précautions sont prises (Prockop et Olson, 2007).

# OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

#### **OBJECTIFS**

La transplantation cellulaire offre l'espoir de remplacer les cellules affectées par les troubles neurodégénératifs. Les premières expérimentations menées dans des modèles de maladie de Parkinson ont clairement démontré l'efficacité d'allogreffes de cellules fœtales mésencéphaliques (Perlow et al., 1979; Bjorklund et al., 1979) pour restaurer certaines fonctions motrices mais les essais cliniques menés chez des patients parkinsoniens (Lindvall et al., 1990) ont souligné la nécessité d'optimiser la technique de transplantation. En effet, si certains patients présentaient une nette amélioration de leur symptômes, d'autres ne voyaient aucune amélioration ou étaient victimes de dyskinésies très invalidantes. Aussi, durant les 10 dernières années, différentes équipes ont recherché à limiter ces effets secondaires et à augmenter l'efficacité des greffes. Haque et al, ont ainsi montré qu'une dissection plus fine du mésencéphale ventral permettait de limiter une contamination de la suspension cellulaire par des neurones 5-HT susceptible d'être responsable des dyskinésies (Haque et al., 1997). D'autres se sont attachés à rechercher quel était le ou les sites les plus appropriés pour greffer les neuroblastes mésencéphaliques (Taylor et al., 1995) et un essai de standardisation est actuellement en cours en utilisant un injecteur (Halifax injector) qui permet de contrôler de façon très précise le nombre de cellules injectées et les sites d'implantation (Mendez et al., 2000). Enfin, des cliniciens pensent qu'une meilleure efficacité pourrait être obtenue en sélectionnant des patients plus jeunes présentant une perte dopaminergique restreinte au striatum dorsal (Holden, 2009). Ces recherches pour optimiser la transplantation intrécébrale sont encore en cours, mais déjà un groupe de chercheur pense à réinitier un essai clinique basé sur l'allotransplantation de cellules mésencéphaliques fœtales (Holden, 2009). A ce jour, les neuroblastes fœtaux allogéniques sont certes les cellules les plus efficaces pour obtenir une récupération fonctionnelle mais les problèmes éthiques et la difficulté pour obtenir du tissu fœtal nécessite la recherche d'autres sources cellulaires. Un grand nombre de laboratoire travaille sur la différenciation des cellules ES ou des iPS mais le chemin semble encore long pour obtenir un nombre suffisant de neurones dopaminergiques fonctionnels in vivo. Aussi avons-nous choisi de développer une troisième stratégie de thérapie cellulaire : la xénotransplantation de neuroblastes mésencéphaliques porcins. Cette stratégie bénéficie des mêmes avantages que présente l'allotransplantation de neuroblastes mésencéphaliques d'origine humaine mais elle permet d'avoir accès à une source cellulaire abondante et manipulable. Il reste cependant à résoudre un problème majeur : le rejet des cellules greffées lié à la présence de xénoantigènes dans le parenchyme cérébral de l'hôte.

En effet, l'administration systémique d'immunosuppresseur comme la cyclosporine A permet de prolonger de plusieurs semaines la survie de xénogreffe intracérébrale (Freeman et al., 1988 ; Huffaker et al., 1989 ; Wennberg., 2001) mais la barrière hémato-méningée limite leur efficacité et les fortes doses administrées ont des effets secondaires sérieux. Mon travail de thèse avait pour objectif de tester des stratégies d'immunosuppression plus adaptées aux greffes intracérébrales.

Une première étude a consisté à étudier l'efficacité de la minocycline, un antibiotique connu pour ses propriétés anti-inflammatoires et sa facilité à passer la barrière hématoencéphalique. Lors d'une seconde étude, les neuroblastes porcins ont été remplacés par des cellules souches neurales porcines afin de déterminer dans quelle mesure la greffe de cellules réputées pour leur faible immunogénicité suffisait à assurer une longue survie des cellules greffées dans le cerveau d'un hôte xénogéniques. La troisième étude avait, quant à elle, pour objectif d'étudier l'intérêt d'une immunosuppression locale, en greffant avec les neuroblastes porcins, des cellules à fort potentiel immunosuppresseur : les cellules souches mésenchymateuses.

Résultats

## RESULTATS

## Article 1

## Minocycline promotes long-term survival of neuronal transplant in the brain by inhibiting late microglial activation and T cell recruitment.

-Accepté-

Delphine Michel-Monigadon<sup>1.2.3</sup>, Véronique Nerrière-Daguin<sup>1.2.3</sup>, <u>Xavier Lévèque<sup>1.2.3</sup></u>, Martine Plat<sup>4</sup>, Eric Venturi<sup>5</sup>, Philippe Brachet<sup>1.2.3</sup>, Philippe Naveilhan<sup>1.2.3</sup>\* and Isabelle Neveu<sup>1.2.3</sup>\*.

\* Equal contribution

#### **Affiliation**

- 1, INSERM, UMR 643, Nantes, F44000 France
- 2, CHU de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes,

F44000 France

- 3., Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.
- 4, INRA, UMR85 INRA-CNRS-Université de TOURS-Haras Nationaux, P.R.C.,

Nouzilly, F37380 France

5, INRA, UEPAO, Nouzilly, F37380 France

**Keywords**: Cell Rejection; Immune Response; Microglial cells; Neurons; rat ; Restorative strategies; Xenotransplantation

#### **Corresponding author:**

Naveilhan P., INSERM UMR 643, 30 Bd Jean Monnet, 44 093 Nantes cedex 01, France. <u>Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr</u>

Phone : +33 (0) 2 40 08 74 14 Fax : +33 (0) 2 40 08 74 11

## Introduction

La présence de la barrière hémato-encéphalique est à la fois un atout et un inconvénient pour la survie des xénogreffes intracérébrales. En effet, la présence de cette barrière limite l'accès du parenchyme cérébral aux cellules immunitaires comme les cellules T et B. En contre-partie, elle limite aussi l'accès à de nombreux immunosuppresseurs comme la cyclosporine A (pour revue, Thuerauf et Fromm, 2006). C'est pourquoi nous avons centré nos recherches sur des molécules qui passent aisément la BHE et dont l'utilisation à long terme présente très peu d'effets secondaires. Parmi celles-ci, la minocycline a retenu notre attention. En effet, cet antibiotique de 495 kDA utilisé depuis des années comme traitement de l'acné juvénile était connu pour ses effets anti-inflammatoires et sa facilité à passer la BHE (pour revue, Elewa et al., 2006). En 2001, Tikka et al., ont montré que ce dérivé de la famille des tétracyclines pouvait être utilisé pour inhiber l'activation et la prolifération des cellules microgliales (Tikka et Koistinaho, 2001). Nous avons donc testé cette molécule partant de l'hypothèse que l'activation microgliale observée durant les premiers jours qui suivent la greffe de cellules neurales xénogéniques (Remy et al., 2001; Michel et al., 2006), pouvait être déterminant pour le recrutement et l'infiltration du greffon par les cellules T, 4 à 6 semaines plus tard. L'étude a été menée chez le rat adulte non lésé. Les animaux ont été traités quotidiennement par la minocycline et greffés avec des cellules mésencéphaliques isolées à partir de fœtus de porc. La survie du greffon dans le striatum des rats a été suivie jusqu'à 63 jours post-greffe.

BASIC AND EXPERIMENTAL RESEARCH

#### Minocycline Promotes Long-Term Survival of Neuronal Transplant in the Brain by Inhibiting Late Microglial Activation and T-Cell Recruitment

Delphine Michel-Monigadon,<sup>1,2,3</sup> Véronique Nerrière-Daguin,<sup>1,2,3</sup> Xavier Lévèque,<sup>1,2,3</sup> Martine Plat,<sup>4</sup> Eric Venturi,<sup>5</sup> Philippe Brachet,<sup>1,2,3</sup> Philippe Naveilhan,<sup>1,2,3,6</sup> and Isabelle Neveu<sup>1,2,3</sup>

Background. Cell therapy in the brain is limited by the requirement of high doses of immunosuppressors that have harmful side effects, and often, it cannot prevent the ultimate rejection of the transplanted cells. Alternative treatments that replace or enable a reduction in the doses of usual immunosuppressors have to be found. In this regard, minocycline shows potential as therapeutic agent. This drug crosses the blood-brain barrier, has good safety records, and exhibits strong antiinflammatory effects.

Methods. To study the impact of minocycline on the survival of intracerebral transplant, 400,000 porcine fetal neurons were transplanted into the striatum of rats treated daily with minocycline until sacrifice. Graft survival and immunologic reaction were evaluated by immunohistochemistry.

Results. In the control groups, all the grafts were rejected at day 63, whereas healthy grafts exhibiting tyrosine hydroxylase\* neurons were observed in 40% of the treated rats. The low immunoreactivity for ED1 and R73 in treated rats when compared with the control groups suggests that minocycline promotes long-term survival of neuronal xenografi by inhibiting microglial activation and T-cell recruitment.

Conclusions. Our present data provide the first evidence of an effect of minocycline on the host immune response after neuronal transplantation into the brain. This observation raises new perspectives concerning the use of minocycline and provides basis for the development of safe and efficient immunosuppressive protocols for intracerebral transplantation.

Keywords: Cell rejection, Immune response, Microglial cells, Neurons, Rat, Restorative strategies, Xenotransplantation.

(Transplantation 2010;89: 816-823)

Transplantation of human fetal neurons is an attractive restorative approach for the treatment of focal central nervous system (CNS) disorders such as Parkinson's disease. In 1990, Lindvall et al. observed restoration of dopamine synthesis and functional improvements after the transplantation

P.N. and I.N. contributed equally to this manuscript, The authors declare no conflict of interest.

#### 816 | www.transplantjournal.com

of mesencephalic allogeneic neurons into the putamen of patients affected by Parkinson's disease (1, 2). Such an observation is encouraging, but the limited availability of human fetuses and the ethical problems concerning their use necessitate an alternative source of donor cells. In this regard, fetal neurons isolated from animals, such as pigs, offer several advantages, including their availability in large quantities and their ability to extend long neurites like human neurons. Studies performed on immunosuppressed animals have confirmed the restorative potential of porcine fetal neurons. For example, porcine ventral mesencephalic neural cells derived from 21- or 28-day-old embryos and transplanted into the striatum of immunosuppressed rats in a model of Parkinson's disease differentiate, exhibit dopaminergic phenotype, and promote behavioral improvements (3-6)

One of the major problems concerning the use of xenogeneic neurons, but also of allogeneic neurons (7), is the requirement of immunosuppressive treatment to prevent cell rejection. Such treatment is necessary even though the brain displays a special immune status largely ascribed to the blood-

Received 4 November 2009. Revision requested 4 November 2009. Accepted 5 November 2009. Copyright @ 2010 by Lippincott Williams & Wilkins ISSN 0041-1337/10/8907-816 DOI: 10.1097/TP.0b013e3181cbe041

#### Transplantation • Volume 89, Number 7, April 15, 2010

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins, Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

This work was supported by the "Association Française contre les Myopa-thies" (AFM), the "Fédération des Groupements de Parkinsoniens," and a fellowship from INSERM/Région Pays de Lotre (D.C.M.).

INSERM, UMR 643, Nantes, France.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> CHU de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplan-tation, ITERT, Nantes, France.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>4</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR85 INRA-CNRS-Université de TOURS-Haras Nationaux, P.R.C., Nouzilly, France.

Institut National de la Recherche Agronomique, UEPAO, Nouztlly, France.
 Address correspondence to: Philippe Naveilhan, Ph.D., INSERM UMR 643, 30 Bd Jean Monnet, 44 093 Nantes cedex 01, France.

E-mail: Philippe, Navetihan@univ-nantes.fr D.M.-M. participated in research design, writing of the manuscript, perfor-

mance of the research, and data analysis V.N.-D. participated in perfor-mance of the research and data analysis: X.L. participated in performance of the research and data analysis: M.P. participated in performance of the research: E.V. participated in performance of the research: P.B. partici-pated in research design and data analysis; P.N. participated in research design, writing of the manuscript, data analysis; and I.N. participated in research design, writing of the manuscript, and data analysis.

© 2010 Lippincott Williams & Wilkins

brain barrier, a scarce expression of major histocompatibility antigens and particular antiinflammatory properties. In the absence of immunosuppressive treatment, rejection occurs several weeks after the implantation of xenogeneic neurons, and a large body of evidence points toward an involvement of both humoral factors (8, 9) and cell-mediated mechanisms, with a prominent role for T lymphocytes (10-15). Indeed, T cells strongly infiltrate the graft at the time of rejection and immunosuppressive treatments that inhibit the critical functions of T lymphocytes, prolong graft survival. These immunosuppressive treatments include the use of cyclosporine A (3, 16, 17) and the use of antibodies directed against the T-cell receptor, the interleukin (IL)-2 receptor, the CD4 coreceptor, or the costimulatory molecules (13, 14, 18-20). The rejection process is also accompanied by a massive infiltration of the graft by activated microglial cells or macrophages. Surprisingly, little is known about their impact on the rejection process. However, activated microglial cells or macrophages may contribute to graft rejection because they secrete molecules such as tumor necrosis factor- $\alpha$  that facilitate monocyte and lymphocyte recruitment through the blood-brain barrier (21-23) or IL-12 that stimulates T-cell proliferation (24). Thus, in an attempt to decipher the role of activated microglial cells in the rejection of xenogeneic neurons, we searched for antiinflammatory drugs that inhibit microglial activation. For this purpose, minocycline seemed as an interesting drug. This tetracycline antibiotic, which crosses the blood-brain barrier (25), has been recently described as a potent inhibitor of microglial activation in vitro and in vivo (26-30). In this article, we show that treatment with minocycline extends the survival of fetal porcine neurons transplanted into the rat striatum. Analyses of the host immune response indicate that the sustained survival correlates with a low recruitment of activated microglial cells and T lymphocytes.

#### MATERIALS AND METHODS

#### **Cell Preparation**

Porcine fetuses were obtained from domestic Large White pigs 28 days after artificial insemination. Animals were obtained from the Institut National de la Recherche Agronomique (Nouzilly, Prance) and sacrificed in the institute's accredited slaughterhouse. Fetuses were collected in hank's balanced salt solution (GibcoBRL, Cergy-Pontoise, Prance) after hysterectomy. Ventral mesencephalons were collected and conserved in a hibernation medium at 4°C for 3 days. Just before transplantation, porcine neuroblasts (pNBs) were prepared as described previously (15), and the cell suspension was adjusted to a concentration of approximately  $2 \times 10^5$  cells/ $\mu$ L.

#### Surgical Procedure

The animals were manipulated in compliance with the ethical rules and guidelines of our National Research Institute. The animals were operated and maintained in our institute's accredited slaughterhouse (Authorization E.44011). The transplantation was performed as described previously (31). Male LEW.1A rats purchased from Janvier CERJ (Rouen, France) were anesthetized by intramuscular injection of 2% Rompun and 50 mg/mL ketamine (1.6 mL/kg) (PanPharma, Fougères, France). Animals were placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL). A small cross section of bone overlapping the appropriate coordinates was removed, and intrastriatal injections were performed unilaterally at the following coordinates relative to the bregma: anterior, +0.7 mm; lateral, -2.8 mm; ventral, -5.4 mm (site 1) and -5.8 mm (site 2); and incisor bar, -3.3 mm. Each site received 1  $\mu$ L of cell suspension (transplanted rats) or vehicle (sham-operated rats) delivered with a Hamilton syringe mounted on an automated microinjector (Phymed, Paris, France). Four minutes after injection, the syringe was gently withdrawn, the pieces of cranial bones were replaced on the skull, and the skin incisions were sewed.

#### **Minocycline Treatment**

Minocycline (Zacnan, Merck) was dissolved in water and administered orally. Two days before and after cell grafting, the animals received a dose of 50 mg/kg of minocycline twice daily and then once a day for the next 8 days. Subsequently, the treatment was reduced to 25 mg/kg and administrated once a day until the date of sacrifice (27). No abnormal clinical signs were observed during the study.

#### Immunohistochemistry

All methods and antibodies used were as described by Michel et al. (31). At days 3, 8, 28, 42, and 63 postsurgery (hereafter referred to as D3, D8, D28, D42, and D63, respectively), the rats were anesthetized with intraperitoneal injection of 2% Rompun and 50 mg/mL ketamine (3.2 mL/kg) before transcardiac perfusion with 200 mL 0.9% NaCl (prewash), followed by 200 mL of cold 4% paraformaldehyde. The brains were then removed from the skull and cryoprotected in 15% sucrose for 24 hr followed by immersion in 30% sucrose. Brains were then frozen in cold isopentane and stored at  $-80^{\circ}$ C. The sections of 20  $\mu$ m were performed using a cryostat (Leica, Nanterre, France), and the slides were stored at  $-80^{\circ}$ C.

After neutralization of endogenous peroxidase with 0.3% H2O2 in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for 10 min, the slides were incubated for 45 min in 10% normal goat serum (Sigma) and 4% bovine serum albumin (Sigma) diluted in PBS before an incubation with primary antibodies overnight at 4°C. Porcine neurons were stained with a monoclonal antibody (mAb) that specifically recognized the 70-kDa porcine neurofilament protein (NF70, clone DP5; diluted 1:500; Université Paris 7, France).A rabbit antityrosine hydroxylase (TH) antibody (1:250; Pel Freeze, Rogers, AR) was used to characterize dopaminergic neurons. Immune cells were identified using mAbs obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). To detect macrophages or activated microglial, we used ED1 and Ox42, an antibody raised against the complement receptor type 3 (CD11b). T lymphocytes were stained using a mAb directed against the T-cell receptor- $\alpha\beta$  chain (R73). After washing, slides were incubated for 1 hr at room temperature with biotinylated antimouse or anti-rabbit Abs (1:500 in PBS-4% bovine serum albumin). The sections were then washed three times and exposed to avidin-biotinylated-peroxidase complex for 1 hr and revealed with the vector intense purple substrate (VIP, Vector ABC kit). After several washes in distilled water, the slides were dehydrated and mounted using Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France). The brain sections were observed using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss, Le Pecq, France).

Copyright C Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

#### 818 | www.transplantjournal.com

#### Transplantation • Volume 89, Number 7, April 15, 2010

#### TABLE 1. Graft survival in control and minocycline-treated rats

	D8		D28		D42		D63	
	Control	Minocycline	Control	Minocycline	Control	Minocycline	Control	Minocycline
N	4	5	4	5	15	14	10	10
NF70+/R7.3-	1	3	2	4	0	8	0	3
NF70+/R7.3+/	3	2	2	1	1	0	0	1
NF70+/R7.3+	0	0	0	0	4	1	0	0
NF70-/R7.3+	0	0	0	0	5	4	0	0
Scar	0	0	0	0	5	1	10	6

Rejection of the graft was determined by analyzing T-cell infiltration (R73<sup>+</sup>) and disappearance of the porcine neurons (NF70<sup>-</sup>) at days 8, 28, 42, and 63 posttransplantation. Each rat was classified as NF70<sup>-</sup>/R73<sup>-</sup>, NF70<sup>+</sup>/R73<sup>+/-</sup>, NF70<sup>+</sup>/R73<sup>+</sup>, NF70<sup>-</sup>/R73<sup>+</sup>, or scar. R73<sup>+/-</sup> corresponds to a brain with 1 to 10 T cells per section.

NF70, 70-kDa porcine neurofilament protein: N, number of rats.

#### **Histologic Analyses**

#### Graft Volume

Graft volume was determined using the method of Cavalieri (32). A point counting grid was placed over the video monitor on which the whole graft was displayed by using a low-power objective (4×). The area around each point was calibrated using a stage micrometer. By knowing the distance between sections and multiplying that by the area per point, each point served as a volume probe. The total volume of the graft (Vgraft) was then determined by counting the number of points overlying the graft in semiserial sections through the graft using the formula Vref=(T) (Ap) ( $\Sigma p$ ), where T is the distance between sections, Ap is the area associated with each point, and  $\Sigma p$  is the number of points.

#### Analyze of TH Staining

The impact of minocycline on the differentiation of pNBs into dopaminergic neurons was evaluated by counting the TH<sup>+</sup> cells inside the graft. The evaluation was performed by counting the TH<sup>+</sup> cells in three sections. The sections were separated by 160  $\mu$ m, and the middle one was chosen at the center of the graft. The results were brought back to the corresponding volume and averaged (N) before an estimation of the total number of cells in the transplant using the formula: (N) (Vgraft).

#### Semiquantitative Histologic Scale for ED1 and R73 Immunostaining

Infiltration of the graft by immune cells was evaluated blindly using a semiquantitative scale described and modified from Armstrong et al. (33). This scale, by taking in account the density but also the distribution of the immune cells and the status of the graft, provides accurate information on the progress of graft infiltration. The histologic score used to evaluate ED1 and R73 immunostaining was as follows: 0, no immunopositive cells; 1, occasional positive cells in all the sections; 2, several immunopositive cells at the periphery of the graft and little perivascular distribution; 3, numerous cells within and around the graft, and perivascular distribution; 4, intense immunostaining inside the graft and in a large part of the grafted striatum; and 5, scar with occasional immunopositive cells.

#### Histologic Classification of the Graft

The graft status was assessed using NF70 and R73 staining (Table 1). These parameters were used, because their variation corresponds to critical changes in the graft status (31). Indeed, all the grafts were healthy (no sign of degeneration) with no (-) or low (+/-) amount of R73 cells, exhibiting a similar appearance in term of NF70 immunostaining (NF70<sup>+</sup>) until the sudden and strong invasion of the graft by T cells (NF70<sup>+</sup>/R73<sup>+</sup>). The next step is the rapid disappearance of the NF70 staining (NF70<sup>-1</sup>), which corresponds to neuronal degeneration. Finally, the T cells disappeared, and the graft turned into a scar.

#### Statistical Analysis

The graft survival, expressed as a percentage of NF70 positive graft in a given group of rats, was analyzed using one-side Fisher's exact test. The graft volume was analyzed using Mann-Whitney U test. Infiltration of the graft by immune cells was evaluated using the semiquantitative scale as described earlier, and the results, expressed as mean of histological score for a given group, were analyzed using Student's test. Differences were defined as statistically significant when P less than 0.05 (\*) and P less than 0.01 (\*\*).

#### RESULTS

#### Minocycline Treatment Extends the Survival of Xenogeneic Neuroblasts

To define the role of activated microglial cells in the rejection of xenogeneic neuroblasts, rats were treated (n=39) or not (n=38) treated with minocycline and received transplants of pNBs isolated from G28 fetuses as described in the Materials and Methods section. Rats were then sacrificed at different time points from day 3 to day 63 (D3, D8, D28, D42, and D63). The impact of minocycline treatment on graft survival was investigated by assessing the presence of porcine neurofilament NF70. The number of rats displaying NF70 positive grafts is reported in Table I. Porcine NF70-expressing cells were detected in the striatum of all the rats at D8 and D28 posttransplantation. At D42, the number of rats exhibiting NF70<sup>+</sup> grafts decreased in both untreated and treated rats, but the biggest difference between the two groups was observed at

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

FIGURE 1. Effect of minocycline on the survival and phenotype of porcine neurons transplanted into the rat striatum. (a-b) NF70+ cells. Micrograph of the whole graft (a) and high-magnification picture (b) show the presence of pNF70-positive neurons in the striatum of minocycline-treated rats at D63. (c-d) TH<sup>+</sup> neurons. Micrograph of the whole graft (c) and high-magnification picture (d) show the presence of tyrosine hydroxylase-positive neurons (arrows) in the striatum of minocycline-treated rats at D63. (e) Control rats. Only a residual scar was observed in the control rats at D63, as illustrated by the NF70 immunostaining. Scale bars: (a, c, and e) 400  $\mu$ m; (b) 60  $\mu$ m; and (d) 80 µm. D63, day 63.

D63. At D63, no NF70<sup>+</sup> cell was detected in the untreated rats (Fig. 1e), whereas 40% of the animals treated with minocycline still exhibited a graft with porcine NF70<sup>+</sup> neurons (Fig. 1a and b). This difference between the untreated and minocyclinetreated groups was statistically significant (one-side Fisher's exact test, P<0.05).

To check that minocycline treatment did not interfere with dopaminergic differentiation, immunohistochemistry was performed using anti-TH antibodies. TH<sup>+</sup> cells were detected in the transplanted striatum of both untreated and minocycline-treated rats from D28. At all the examined stages, we did not observe differences between the two groups, in the intensity of TH staining or in the amount of positive cells as long as the grafts were NF70<sup>+</sup> (Fig. 2a). At D63, TH<sup>+</sup> cells were detected in all minocycline-treated rats that had not rejected their transplant (Fig. 1c and d) with an average of 777 TH<sup>+</sup> cells inside the graft (Fig. 2a).

Analyses of healthy transplants showed a progressive increase in the volume of the graft along with time (Fig. 2b). This growth was observed in both control and minocyclinetreated rats, reaching a 6 to 10 times increase at D42 when compared with D3. Interestingly, we observed a huge increase in the size of the transplant between D42 and D63, reaching a 25.5-fold increase at D63 when compared with D3. This important augmentation in the graft volume was only observed in minocycline-treated rats because all the grafts were rejected in control rats at D63. The increase was not due to cell proliferation or due to infiltration of the graft by host cells, because the number of nuclei in the graft at D42 (87213±13313) was not significantly different from the number of nuclei at D63 (95367±24669) as assessed by nuclei counting on cresyl violetstained sections (Student's t test, P<0.05). The high number of NF70<sup>+</sup> fibers at D63 (Fig. 1a) rather suggest that the increase in graft volume is due to neurite outgrowth.

#### Minocycline Treatment Reduces Microglial Activation

The impact of minocycline treatment on the activation of microglial cells after intracerebral xenografting was studied







FIGURE 2. Analyze of the graft in control and minocyclinetreated rats. (a) Number of TH<sup>+</sup> neurons in control and minocycline-treated rats. Control and minocycline-treated rats were sacrificed at D28, D42, and D63. Semiserial brain sections of rats exhibiting healthy graft were selected for TH immunostaining. The number of TH<sup>+</sup> neurons in the graft was estimated as described in the Materials and Methods section. (b) Graft volume in control and minocyclinetreated rats. Control and minocycline-treated rats were sacrificed at D3, D8, D28, D42, and D63. The semiserial brain sections were stained with cresyl violet. Volume of healthy grafts was determined using the method of Cavalieri as described in the Materials and Methods section. D3, day 3; D28, day 28; D42, day 42; D63, day 63.

using Ox42 and ED1 antibodies. Cells immunopositive for these antibodies were detected in the grafted striatum in both untreated and minocycline-treated rats at D28 (Fig. 3a). In both groups, Ox42<sup>+</sup> and ED1<sup>+</sup> cells were mostly localized

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

#### Résultats





FIGURE 3. Immunostaining for Ox42 and ED1. The brains of control and minocycline-treated rats were immunostained for Ox42 (a and c) or ED1 (a and b) at D28 (a) or D42 and D63 (b and c). (a) At D28, Ox42<sup>+</sup> and ED1<sup>+</sup> cells were mostly localized within and around the graft in both groups. At this stage, no particular difference in microglial activation was observed between control and minocycline-treated rats. High magnifications show the amoeboid shape of ED1<sup>+</sup> cells (insert), whereas Ox 42<sup>+</sup> cells appeared as ramified cells (insert). (b) ED1 staining at D42 and D63 shows a vigorous and diffuse infiltration of the grafts by ED1<sup>+</sup> cells in the control groups, whereas only few ED1<sup>+</sup> cells were observed within and around the graft in minocyclinetreated rats. (c) Ox42 immunostaining shows a strong and diffuse Ox42 labeling at the graft site (arrowhead) in the control group, and a weak Ox42 labeling was still observed around the scar at D63 (arrow). Analyze of the minocycline-treated groups reveals a moderate number of ramified Ox42° cells scattered within the graft at D42 and D63. Scale bars, (a) 200  $\mu$ m; (insert) 20  $\mu$ m, (b) 200  $\mu$ m, (c) 150  $\mu$ m. (d) ED1 immunostaining was evaluated using the semiquantitative scale described in the Materials and Methods section. The results show no significant difference between control and treated rats up to D28. At later stages (D42 and D63), ED1 immunostaining increased significantly in the control groups when compared with minocycline-treated animals. The number of rats per group is indicated in brackets. D28, day 28; D42, day 42; D63, day 63.

#### Transplantation • Volume 89, Number 7, April 15, 2010

around and within the graft. Their morphology was different: Ox42<sup>+</sup> cells presented long ramifications, and ED1<sup>+</sup> cells exhibited an amoeboid shape (Fig. 3a, insert). At this stage, no major difference was detected between untreated and minocycline-treated rats, but at later stages such as D42, ED1 and Ox42 staining strongly increased in the untreated group, becoming diffuse and heterogeneous, and preventing us from delineating the border of the graft (Fig. 3b and c). At D63, all the porcine neurons were rejected in the control rats and, only moderate ED1 and Ox42 staining remained along the scar (Fig. 3b and c). Evolution of ED1 and Ox42 staining in minocycline-treated animals that had not rejected their graft was different. Indeed, we did not observe major changes at D42 and D63 (Fig. 3b and c) when compared with the labeling at D28 (Fig. 3a). The strong inflammation and the absence of clear limit between graft and brain parenchyma in control rats did not enable a quantitative estimation of the number of macrophages or microglial cells at D42 and D63. So, we used the semiquantitative scale described by Armstrong et al. (33) to evaluate the immune cell recruitment in transplanted brain as described previously (31). As indicated in the Figure 4(d), histologic analyze of the 77 rat brains confirmed a strong



FIGURE 4. R73 immunostaining at D28, D42, and D63 in control and minocycline-treated rats. A strong infiltration of the graft by R73<sup>+</sup> cells was observed around D42 in the control rats (a-c), but not in most minocycline-treated rats (d-f). Scale bar, (a and f) 200 μm. (g) R73 immunostaining was analyzed using the semiquantitative scale described in the Materials and Methods section. The number of rats per group is indicated in brackets. D28, day 28; D42, day 42; D63, day 63.

Copyright C Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

© 2010 Lippincott Williams & Wilkins

recruitment of ED1<sup>+</sup> cells at D42 and D63 in untreated rats when compared with minocycline-treated rats. At earlier stages, we did not observe significant difference between untreated and minocycline-treated rats, suggesting that the drug did not interfere with the early recruitment of microglial cells which is believed to be consecutive to the surgical procedures. This view is further supported by similar ED1<sup>+</sup> and Ox42<sup>+</sup> cell recruitment in untreated (n=3) and minocycline-treated (n=3) sham-operated rats at 8 days postsurgery (data not shown).

#### Minocycline Treatment Reduces T-Cell Infiltration

Because T-cell infiltration is a major process in the rejection of neuronal xenografts, we evaluated the impact of minocycline on their recruitment using R73 mAb. As shown in Figure 4, R73<sup>+</sup> cells were scarce inside and around the graft at D28 in both the control and minocycline-treated rats (Fig. 4a and d). In this regard, it is important to note that no sign of rejection was detected in any of the transplanted animals by this time (Table 1). In contrast, a strong and widespread immunostaining was observed at D42, but only in untreated animals. Indeed, analyses of the control animals revealed a large invasion of the graft by R73<sup>+</sup> cells, 42 days posttrans-plantation (Fig. 4b), whereas no R73<sup>+</sup> cell was detected inside or around the graft in most rats treated with minocycline (Fig. 4e). At D63, all of the untreated rats had rejected their grafts, and rare R73+ cells were detected around the scar (Fig. 4c). Interestingly, we did not detect any R73<sup>+</sup> staining in minocycline-treated animals that had not rejected their grafts (Fig. 4f), with the exception of one animal in whom sparse R73+ cells were detected. To get an estimation of these differences, R73 immunostaining was evaluated using the semiquantitative scale mentioned earlier. The results illustrated in Figure 4(g) clearly show significant differences in R73 staining between control and minocycline-treated rats at D42 and D63 while the labeling was similar at D28.

#### DISCUSSION

In this study, we show that chronic oral administration of minocycline significantly enhances the survival of porcine mesencephalic neurons transplanted into the rat striatum without altering the appearance of neurons exhibiting a dopaminergic phenotype. Because several studies have reported an inhibitory effect of minocycline on microglia activation in vitro (26) and in vivo (34), we first analyzed its impact on markers of microglial activation in the case of intracerebral xenotransplantation. The results indicate that the drug did not inhibit the activation of microglial cells observed from D3 to D28 after the transplantation of pNBs into the rat brain. However, there were clear differences in the immune response as the strong invasion of the graft by ED1+ cells and the presence of Ox42+ cells within the grafted striatum in control rats at D42 were not observed in treated rats. In the presence of minocycline, the activation of microglial cells or macrophages seemed to have been hampered in its progression, at least during the 6 weeks that followed the transplantation of xenogeneic neurons into the brain. This blockade of full microglial activation might be due to a direct effect of minocycline on microglial cells or macrophages and also due to the low number of T cells in the grafted striatum. Indeed,

#### Michel-Monigadon et al. 821

R73+ cells inside or around the graft were extremely rare in minocycline-treated animals when compared with untreated rats. This might be due to an inhibition of T-cell infiltration because minocycline was reported to inhibit enzymatic activity and leukocyte production of matrix metalloproteinases (35, 36), enzymes that are essential for the transmigration of these cells through the blood-brain barrier (37). In addition to its effect on cell transmigration, minocycline may affect leukocytes by inhibiting their proliferation and the synthesis of several cytokines such as interferon-y, tumor necrosis factor-a, and IL-2 (38, 39). Inhibition of microglial and T-cell activation might both contribute to the weak immune response observed in minocycline-treated rats when compared with untreated animals. However, the chronic administration of minocycline at the tested doses did not prevent the rejection of intracerebral xenografts, because NF70+ neurons were no longer observed in 60% of the rats at 9 weeks posttransplantation. The dose that we used was reported to be efficient at inhibiting microglial activation in the case of lipopolysaccharide-induced inflammation in the brain (27) or in animal models of Parkinson's disease (40). This does not mean that the tested protocol for minocycline administration is optimal for intracerebral cell grafting, and a dose-response study may prove informative.

According to the recent publications, minocycline is as an interesting drug for CNS disorders because of its antiinflammatory and neuroprotective properties. Indeed, minocycline has been shown to have beneficial effects in animal models of Parkinson's disease (40-42), cerebral ischemia (30, 43), intracerebral hemorrhage (44, 45), or spinal cord injury (46, 47). Here, we show that minocycline might also be of great interest to prevent cell rejection in restorative strategies. Indeed, intracerebral xenografts persisted up to 9 weeks in 40% of the minocycline-treated animals without any signs of immune reaction. Dose-response studies and administration more than 63 days are now necessary to determine whether the drug prevents or only delays cell rejection in the brain. In both cases, minocycline shows potential as an immunosuppressive monotherapy or in cotreatment strategies. Indeed, classic molecules such as cyclosporine A do not cross the bloodbrain barrier, and the high doses required to limit cell rejection in the brain provoke severe side effects, including renal failure (48). Moreover, cyclosporine A only delays the rejection of intracerebral xenografts by blocking T-cell activation (49). By inhibiting the recruitment of various immune cells in the brain (present data), minocycline might replace or cooperate with other drug to prevent cell rejection. The mechanism underlying its beneficial effect has to be further explored, and its efficiency has to be tested in a model of injured or diseased CNS, but the long-term survival of the porcine xenograft in 40% of the minocycline-treated rats indicate that this drug, which has a good safety record and excellent brain tissue penetration (50-53), could be of interest to reduce the dose of hazardous immunosuppressive molecules such as cyclosporine A.

In 2006, Karimi-Abdolrezaee et al. (54) combined minocycline and cyclosporine A to evaluate the efficiency of cell replacement therapy in the context of spinal cord injury. In this work, the tetracycline derivative was used as an antiinflammatory drug to prevent posttransplant activation of microglial cells in a rat model. Consequently, minocycline was

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

#### 822 www.transplantjournal.com

administrated for only 10 days, whereas classic doses of cyclosporine A were administrated until the end of the experiments. Such utilization of minocycline is likely to be without effect in these circumstances, because we show that minocycline treatment has no significant effect on the activation of microglial cells observed up to 28 days posttransplantation. In contrast, longterm treatment might be beneficial by reducing the late recruitment of macrophages or microglial cells.

Our present data raise new perspectives for the use of minocycline in the CNS, by providing evidence that the drug is able to alter the host immune response and prolong cell survival in case of intracerebral xenotransplantation. Rejection of the grafts in 60% treated rats suggests, however, that minocycline might not be sufficient to fully protect xenotransplants. In this regard, a deep evaluation of the mechanisms underlying the reduced demise of minocycline-treated grafts should be of great interest to find complementary drugs and design multiple therapeutic strategies that warrant safe and efficient immunosuppression in the CNS. Concerning this point, it should be noted that long-term immunosuppression might be required in case of allotransplantation because alloimmunization and ongoing cell rejection process were recently observed in patients transplanted with human neural tissue (7).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pr. Jean-Paul Soulillou for his support and encouragement. They also thank Joanna Ashton-Chess for editing the manuscript.

#### REFERENCES

- Bjorklund A, Dunnett SB, Brundin P, et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2: 437.
   Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al. Grafts of fetal dopamine neu-
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 1990; 247: 574.
- Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, et al. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease. Functional recovery and graft morphology. Exp Neurol 1996; 140: 1.
- 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: 329.
- Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P, et al. Transplanted xenogenetic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. Nat Med 1995; 1: 1189.
- Isacson O, Deacon TW. Specific axon guidance factors persist in the adult brain as demonstrated by ptg neuroblasts transplanted to the rat. *Neuroscience* 1996; 75: 827.
- 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.
- Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, et al. A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2000; 20: 3415.
   Larsson LC, Czech KA, Widner H, et al. Discordant neural tissue xeno-
- Larsson LC, Czech KA, Widner H, et al. Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. *Transplantation* 1999; 68: 1153.
- Larsson LC, Frielingsdorf H, Mirza B, et al. Porcine neural xenografts in rats and mice: Donor tissue development and characteristics of rejection. Exp Neurol 2001; 172: 100.
- Melchtor B, Remy S, Nerriere-Daguin V, et al. Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. J Neurosci Res 2002: 68: 284.
- Melchtor B, Nerriere-Daguin V, Degauque N, et al. Compartmentaltzation of TCR repertoire alteration during rejection of an intrabrain xenografi. Exp Neurol 2005; 192: 373.

#### Transplantation • Volume 89, Number 7, April 15, 2010

- Okura Y, Tanaka R, Ono K, et al. Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation: Tolerance induction by anti-T-cell antibodies. J Neurosci Res 1997; 48: 385.
- Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, et al. Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience* 1996; 70: 775.
- Remy S, Canova C, Daguin-Nerriere V, et al. Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotransplantation* 2001; 8: 136.
   Duan WM, Widner H, Brundin P. Temporal pattern of host responses
- Duan WM, Widner H, Brundin P. Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngenetc, allogenetc or xenogenetc embryonic neuronal tissue in rats. Exp Brain Res 1995; 104: 227.
- Brundin P, Widner H, Nilsson OG, et al. Intracerebral xenografts of dopamine neurons: The role of immunosuppression and the bloodbrain barrier. Exp Brain Res 1989; 75: 195.
- Honey CR, Shen H, Immunosuppression for neural xenografis: A comparison of cyclosporin and anti-CD25 monoclonal antibody. J Neurosurg 1999; 91: 109.
- Larsson LC, Corbascio M, Widner H, et al. Simultaneous inhibition of B7 and LFA-1 signaling prevents rejection of discordant neural xenografts in mice lacking CD40L. Xenotransplantation 2002; 9: 68.
- Larsson LC, Corbascio M, Pearson TC, et al. Induction of operational tolerance to discordant dopaminergic porcine xenografis. *Transplantation* 2003; 75: 1448.
- Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapterre LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. J Immunol 1986; 137: 1893.
- Calvo CF, Yoshimura T, Geiman M, et al. Production of monocyte chemotactic protein-1 by rat brain macrophages. Eur J Neurosci 1996: 8: 1725.
- Brett J, Gerlach H, Nawroth P, et al. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. J Exp Med 1989; 169: 1977.
- Alotst F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: Different roles for microglia and astrocytes. *Immunal Today* 2000; 21: 141.
- Colovic M, Caccia S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2003; 791: 337.
- Suk K. Minocycline suppresses hypoxic activation of rodent microglia in culture. Neurosci Lett 2004; 366: 167.
- Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, et al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 13632.
   Kim SS, Kong PJ, Kim BS, et al. Inhibitory action of minocycline on
- Kim SS, Kong PJ, Kim BS, et al. Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. Arch Pharm Res 2004; 27: 314.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, et al. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. J Neurosci 2001; 21: 2580.
- Yrjanheikki J, Ketnanen R, Peliikka M, et al. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 15769.
- Mtchel DC, Nerriere-Daguin V, Iosien R, et al. Dendrittic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. Exp Neurol 2006; 202: 76.
- Michel RP, Cruz-Ortve LM. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: Estimation of volume and pleural surface area. J Microsc 1988: 150(pt 2): 117.
- 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.
- Lin S, Zhang Y, Dodel R, et al. Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 2001; 315: 61.
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, et al. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: Minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125(pt 6): 1297.
- Power C, Henry S, Del Bigio MR, et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. Ann Neurol 2003; 53: 731.
- Yong VW, Power C, Forsyth P, et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. Nat Rev Neurosci 2001; 2: 502.
- Kloppenburg M, Verwelj CL, Miltenburg AM, et al. The influence of tetracyclines on T cell activation. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 635.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

© 2010 Lippincott Williams & Wilkins

- 39. Kloppenburg M, Brinkman BM, de Rootj-Dtjk HH, et al. The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes. Antimicrob Agents Chemother 1996: 40: 934. Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, et al. Blockade of microglial activa-
- 40. tion is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-
- pyridine mouse model of Parkinson disease. J Neurosci 2002: 22: 1763. 41. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and
- Fie T, Appel S, Le W. Minocycline infinitis microgial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. Brain Res 2001; 905: 187.
   Du Y, Ma Z, Lin S, et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopami-nergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 14669.
   Weng YC, Kriz J. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-based drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-tection of the drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-tection of the drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-tection of the drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-tection of the drue occlubil to transformed neuroprotective effects of a minocycline-tection of the drue occlubil to transformed neuroprotective effects of the drue occlubil to transformed neuroprotective effective occlubil to transformed neuroprotective
- based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. Exp Neurol 2007; 204; 433.
- 44. Szymanska A, Bternaskie J, Laidley D, et al. Minocycline and intracerebral hemorrhage: Influence of injury severity and delay to treatment. Exp Neurol 2006; 197: 189.
  45. Wasserman JK, Schlichter LC. Minocycline protects the blood-brain
- barrier and reduces edema following intracerebral hemorrhage in the rat. Exp Neurol 2007; 207; 227.
- 46. Stirling DP, Khodarahmi K, Ltu J, et al. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. J Neurosci 2004; 24: 2182.

- 47. Teng YD, Chot H, Onario RC, et al. Minocycline inhibits contusiontriggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates func tional deficits after spinal cord injury. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 3071.
- 48. Rezzant R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: The morphological and immunohisto-chemical studies. Histol Histopathol 2006; 21: 301.
- 49. Larsson LC, Czech KA, Brundin P, et al. Intrastriatal ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: Immune responses and functional effects. Cell Transplant 2000; 9: 261.
- O'Dell IR, Hatre CE, Palmer W, et al. Treatment of early rheumatoid arthritis with minocycline or placebo: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 1997; 40: 842.
- Kletn NC, Cunha BA. Tetracyclines. Med Clin North Am 1995; 79: 789.
   Aronson AL. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. J Am
- Vet Med Assoc 1980; 176; 1061. 53. Barza M, Brown RB, Shanks C, et al. Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetra-cycline, and oxytetracycline in dogs. Antimicrob Agents Chemother 1975; 8; 713
- 54. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, et al. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. J Neurosci 2006; 26; 3377.

#### The Transplantation Society Mission Statement

The Transplantation Society will provide the focus for global leadership in transplantation:

- . development of the science and clinical practice
- scientific communication .
- continuing education
- guidance on the ethical practice

There are many benefits of being a part of TTS. Applying has never been so easy. Visit the TTS website at www.transplantation-soc.org and apply today.

Copyright C Lippincott Williams & Wilkins, Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

#### 823 Michel-Monigadon et al.

## Discussion

Selon notre étude, l'administration quotidienne de minocycline permet une prolongation significative de la survie de neurones porcins mésencéphaliques transplantés dans le striatum de rats adultes, sans altérer l'apparition de cellules présentant un phénotype dopaminergique. Même si l'effet n'est pas observé pour 100% des rats, il est suffisamment significatif pour que l'on s'intéresse au mécanisme d'action de la minocycline dans ce modèle. En effet, l'hypothèse de départ était que l'activation microgliale/macrophagique due au geste opératoire pouvait jouer un rôle important dans la réponse immunitaire (Hickey et Kimura, 1988; Poltorak et Freed, 1989; Shinoda et al., 1996a; Shinoda et al., 1996b). De ce fait, nous nous attendions à ce que le traitement par la minocycline inhibe la réaction microgliale observée durant les premiers jours qui suivent la greffe. Or, les analyses immunohistochimiques montrent que l'administration de 50 mg/kg de minocycline 2 fois par jour, deux jours avant et après la greffe, puis une fois par jour durant les 8 jours suivant n'affecte pas cette activation microgliale. L'administration de minocycline par voie intraveineuse (Szymanska et al., 2006) pourrait peut-être permettre d'inhiber ce pic d'activation précoce mais quoi qu'il en soit, l'effet bénéfique de la minocycline sur la survie des xénogreffes ne semble pas du à l'absence d'activation microgliale durant les premiers jours qui suivent la greffe.

En revanche, vers 6 semaines post-greffe, on note de grandes différences selon que les rats ont été traités ou non par la minocycline. Ainsi, à ce stade, une importante infiltration du greffon par les cellules microgliales/macrophages activés et les lymphocytes T est observé chez les rats contrôles alors que ces cellules sont en nombre beaucoup plus restreint, voir parfois absente, dans le striatum d'une grande majorité des rats traités.

La minocycline semble donc affecter la réponse immune induite par la transplantation de neurones mésencéphaliques porcins dans le striatum de rat, mais l'impact n'est visible qu'à un stade relativement tardif. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour définir la succession d'évènements conduisant à de telles observations, mais différentes hypothèses peuvent être proposées. Ainsi, la minocycline pourrait agir directement sur les cellules microgliales en inhibant la protéine Mitogen Activated Map Kinase p38 (MAPK p38) impliquée dans leur activation (Lin et al., 2001; Tikka et Koistinaho, 2001), en limitant la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 et de

chimiokines comme MCP1 (Kremlev et al., 2007). L'inhibition de l'activation microgliale et la faible production de molécules comme le TNFα ou MCP-1 pourraient en retour limiter le recrutement des lymphocytes dans le parenchyme cérébral. Toutefois, la minocycline pourrait avoir une action directe sur les lymphcoytes T en inhibant leur activation, par la réduction de production d'IL-2 (Kloppenburg, 1995), ou leur recrutement. En effet, il a été montré dans un modèle murin que ce dérivé de la tétracycline pouvait inhiber la migration transendothéliale des LT ainsi que la production de métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire de la lame basale des vaisseaux sanguins, un phénomène essentiel pour le passage des LT à travers la BHE (Brundula et al., 2002). L'inhibition de l'activation des cellules microgliales et des lymphocytes T pourrait donc tous les deux, contribuer à la faible réponse immune observée chez les rats traités par la minocycline. A ce propos, il est intéressant de noter que l'antibiotique peut également induire dans le LT, une diminution de l'expression de CD40 ligand, une molécule clef du contact entre cellule microgliale et LT (Giuliani et al., 2005). Dès lors, l'absence de contact possible entre LT et microglie activée empêcherait la restimulation des LT et induirait leur anergie.

A 63 jours post-greffe, 40% des rats traités par la minocycline présentent une greffe saine avec un nombre non négligeable de neurones TH+. Ces résultats, aussi encourageants soient-ils, suggèrent toutefois que la stratégie immunosuppressive n'est pas optimale pour une xénogreffe intracérébrale. Une étude dose-réponse pourrait permettre d'augmenter l'efficacité du traitement mais il est fort probable que la seule administration de la minocycline ne suffise pas à assurer la survie à long terme des xénogreffes intracérébrales. En revanche, il serait intéressant d'étudier quelles molécules pourraient être associées à la minocycline pour développer une multithérapie adaptée à la transplantation intracérébrale.

## Article 2

## Trophic and immunoregulatory properties of neural precursor cells: benefit for intracerebral transplantation

### -Accepté-

Delphine Michel-Monigadon<sup>1.2.3.6</sup>, Virginie Bonnamain<sup>1.2.3.6</sup>, Véronique Nerrière-Daguin<sup>1.2.3</sup>, Anne-Sophie Dugast<sup>1.2.3</sup>, <u>Xavier Lévèque<sup>1.2.3</sup></u>., Martine Plat<sup>4</sup>, Eric Venturi<sup>5</sup>, Philippe Brachet<sup>1.2.3</sup>, Ignacio Anegon<sup>1.2.3</sup>, Bernard Vanhove<sup>1.2.3</sup>, Isabelle Neveu<sup>1.2.3.6</sup> and Philippe Naveilhan<sup>1.2.3.6.\*</sup>.

- 1, INSERM, UMR643, Nantes, France.
- 2, CHU de Nantes, ITERT, Nantes, France.
- 3, Université de Nantes, UFR de Medicine, Nantes, France.

4, INRA, UMR85 INRA-CNRS-Université de TOURS-Haras Nationaux, P.R.C., Nouzilly, France

- 5, I.N.R.A., UEPAO, Nouzilly, France
- 6, equal contribution

Corresponding author: Naveilhan P., INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44 093 Nantes cedex 01, France. Tel: +33 (0)240087414; Fax: +33 (0)240087411; e-mail: Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr

## Introduction

L'intensité et la rapidité de la réaction immunitaire en cas de greffe dans le cerveau dépendent non seulement de l'espèce mais également des types cellulaires transplantés. Ainsi des cellules endothéliales aortiques porcines sont rejetées en moins de 10 jours alors que cellules fœtales isolés du mésencéphale de porc survivent dans le striatum d'un rat jusqu'à 4 à 6 semaines en l'absence de tout traitement immunosuppresseur (Remy et al., 2001 ; Michel et al., 2006). La présence de cellules immunogènes parmi les neuroblastes favoriserait le rejet de ceux-ci même dans un contexte d'allotransplantation (Duan et al., 1997). Aussi, avons-nous entrepris d'étudier les avantages que pouvaient présenter les cellules souches neurales/précurseurs neuronaux (CSPN) d'un point de vue immunitaire. En effet, de par leur multipotence et leur forte capacité d'expansion *in vitro*, les CSPN ont un fort potentiel thérapeutique, renforcé par une immunogénécité réduite (Armstrong et al., 2001). Pour étudier leur intérêt en thérapie cellulaire, nous avons préparé des CSPN à partir de cortex foetal porcin (pCSPN) et nous les avons greffées dans le striatum de rats immunocompétents pour comparer leur survie à celle de pNB (Figure 25).



Figure 25: Protocole utilisé pour la comparaison de greffes intrastriatale de pNB ou de pCSPN chez le rat non immunosupprimé.

Résultats

#### Abstract

Intracerebral xenotransplantation of porcine fetal neuroblasts (pNB) is considered as an alternative to human neuroblasts for the treatment of neurodegenerative diseases. However, pNB are systematically rejected, even in an immunoprivileged site such as the brain. Within this context, neural stem/precursor cells (NSPC), which were suggested as exhibiting low immunogenicity, appeared as a useful source of xenogeneic cells. To determine the advantage of using porcine NSPC (pNSPC) in xenotransplantation, pNB and pNSPC were grafted into the striatum of rats without immunosuppression. At Day 63, all the pNB were rejected while 40% of the rats transplanted with pNSPC exhibited large and healthy grafts with numerous pNF70-positive cells. The absence of inflammation at Day 63 and the occasional presence of T cells in pNSPC grafts evoked a weak host immune response which might be partly due to the immunosuppressive properties of the transplanted cells. T cell proliferation assays confirmed such a hypothesis by revealing an inhibitory effect of pNSPC on T cells through a soluble factor. In addition to their immunosuppressive effect, in contrast to pNB, very few pNSPC differentiated into tyrosine hydroxylase-positive neurons but the cells triggered an intense innervation of the striatum by rat dopaminergic fibers coming from the substantia nigra. Further experiments will be required to optimize the use of pNSPC in regenerative medicine but here we show that their immunomodulatory and trophic activities might be of great interest for restorative strategies.

**Key words** : axonal growth, brain repair, differentiation, immunosuppression, rejection, neural stem cells, T cells, neurotrophic, Parkinson's disease, xenotransplantation

#### Introduction

Neural transplantation is a promising strategy to restore cell function in the human central nervous system (CNS). However, the limited access to human fetal neurons and the ethical concerns regarding their use have fuelled a search for alternative sources of transplantable cells. Among these, cells derived from pig embryos are of great interest (Isacson and Deacon, 1996, Isacson, et al., 1995). Fetal pig neurons have the capacity to develop large axons (Deacon, et al., 1994) and small-scale clinical trials indicate that neural cells isolated from porcine fetal brains integrate the host tissue after their transplantation into the brain of immunosuppressed patients (Deacon, et al., 1997, Fink, et al., 2000, Pakzaban and Isacson, 1994). For this reason, fetal porcine neurons have numerous advantages in addition to their wide availability. Their use as donor cells is however highly limited by the host immune response. Indeed, as previously shown for other intracerebral xenografts (Duan, et al., 1995, Finsen, et al., 1988, Lund, et al., 1989, Pollack, et al., 1990, Widner and Brundin, 1988), fetal porcine neurons implanted into the brain of immunocompetent rat are systematically rejected. This occurs within 5-7 weeks post-transplantation (Barker, et al., 2000, Michel, et al., 2006, Remy, et al., 2001). The rejection process is accompanied by an infiltration of the graft by microglial and dendritic cells, and a sudden appearance of T lymphocytes (Barker, et al., 2000, Michel, et al., 2006, Remy, et al., 2001). This coincides with a marked accumulation of transcripts encoding monocyte chemoattractants such as MCP-1 and RANTES, as well as proinflammatory lymphokines and Th1 cytokines (Barker, et al., 2000, Melchior, et al., 2002, Remy, et al., 2001). Continuous exposure to high doses of cyclosporine A or treatments with several immunosuppressors prolong the survival of intracerebral xenografts (Cicchetti, et al., 2003, Deacon, et al., 1997, Fink, et al., 2000, Jacoby, et al., 1999, Larsson, et al., 2000, Larsson, et al., 2001, Pedersen, et al., 1997) but few xenogeneic neurons survive and systemic treatments with immunosuppressors produce severe secondary effects (Rezzani, 2006). Progress has therefore to be made in order to control cell rejection even in a relatively immunoprivileged site such as the CNS (Barker and Widner, 2004).

Genetic modifications of porcine neurons are currently performed to evaluate the advantage of a local production of immunosuppressive molecules such as CTLA4-Ig (Martin, et al., 2005). Transplantation of multipotent stem cells is another alternative. Xenogeneic mesenchymal stem cells or expanded neural precursors show long-term survival in the brain

of immunocompetent animals (Armstrong, et al., 2001, Rossignol, et al., 2009). Such lengthy survival has been partially attributed to the low immunogenicity of multipotent cells (Armstrong, et al., 2001, Odeberg, et al., 2005), but recent evidence points to the sizeable immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells (for review, see Di Nicola, et al., 2002, Krampera, et al., 2003, Rasmusson, 2006, Uccelli, et al., 2007). Neural precursor cells (NSPC) may also display such immunoregulatory properties. In 2005, Pluchino et al., showed that syngeneic NSPC systemically injected in a mouse model of multiple sclerosis promoted neuroprotection by immunomodulatory mechanisms (Pluchino, et al., 2003, Pluchino, et al., 2005). If porcine NSPC (pNSPC) exhibit such immunoregulatory properties, their use would be of great interest for restorative strategies. In fact, NSPC derived from fetal or adult pig brains could be easily expanded upon treatment with bFGF, providing an indefinite source of transplantable cells. Like human NSPC, porcine NSPC are able to generate the three major neural lineages -oligodendrocytes, astrocytes and neurons- both in vitro and following transplantation in vivo (Harrower, et al., 2006, Smith and Blakemore, 2000). In addition, experimental work on immunosuppressed rats has shown a good differentiation of pNSPC into neurons with the formation of synapses and the extension of fibers (Harrower, et al., 2006).

In the present paper, we show that pNSPC are a valuable source of donor cells, displaying immunosuppressive properties while also producing a trophic effect upon the host dopaminergic system.

#### Materials and methods

#### Cell preparation

Porcine embryos were obtained from Large White domestic pigs, 28 days after artificial insemination. Animals were obtained from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Nouzilly, France) and killed in the institute's accredited slaughterhouse. After hysterectomy, the embryos were collected and washed in Hank's balanced salt solution (HBSS; Life Technologies Ltd, CergyPontoise, F) before dissection of the brain tissue.

Porcine neuroblasts (pNB) were prepared from G28 ventral mesencephalon as previously described (Remy, et al., 2001). After dissection, the pieces of brain tissues were kept in a hibernation medium for up to three days. One hour before intracerebral transplantation and freed of meninges, the brain tissues were incubated in 0.1% trypsin (Sigma-Aldrich, Lyon, F) for 20 min at 37°C. After addition of 10% FCS (Sigma-Aldrich), tissues were washed and incubated for 10 min at 37°C in HBSS supplemented with 0.01 % DNAse (Sigma-Aldrich). Cells were dissociated by gentle trituration, and centrifuged at 750 RPM for 10 min. The pellet was resuspended in HBSS containing 0.01%. DNAse. The viability was assessed by eosin exclusion and the cell suspension was adjusted to a concentration of  $2x10^5$  cells/µl.

pNSPC were prepared and analyzed from G28 forebrains as previously described (Sergent-Tanguy, et al., 2006). Briefly, brain tissues freed of meninges were incubated with 0.25% trypsin for 15 min at 37°C. Following addition of 10% fetal calf serum (FCS), tissues were exposed to 0.01 % of DNase I prior to mechanical trituration. Aggregates were removed by decantation and cells were centrifuged at 750 RPM for 10 min. pNSPC were plated in uncoated dishes in basal culture medium composed of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Ham's F12 (1/1, v/v) (Life technologies Ltd.) with 33 mM glucose, 5 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM L-glutamine, 5  $\mu$ g/ml streptomycin and 5 UI/ml penicillin (AS-basal medium), supplemented with 10% FCS (AS-FCS medium). The following day, the floating cells were recovered, washed and resuspended in AS-basal medium supplemented with N2 (Life technologies Ltd.; AS-N2 medium). 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 (bFGF) with a complete change of the N2 medium after 5 days of culture, and addition of bFGF every 3 days. One hour prior to intracerebral transplantation, the cells were

mechanically dissociated and adjusted to a concentration of  $2x10^5$  cells/ µl as described for the porcine neuroblasts. To analyze the fate of pNSPC *in vitro*, mechanically dissociated neurospheres were transferred to poly-L-ornithine-coated (PORN, 50 µg/ml, Sigma-Aldrich) glass coverslips and incubated in AS-FCS medium overnight. The following day, the medium was changed and the cells were allowed to differentiate for 7 days in AS-N2 medium (Differentiation conditions).

#### Animals and surgical procedures

Male Lewis 1A rats (250 g) purchased from Janvier CERJ (Rouen, F) were manipulated in compliance with the ethical rules and guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The animals were housed at 22°C, under 12 hr light / 12 hr dark conditions with ad libitum access to food and water.

#### Cell transplantation in unlesioned animals

According to a protocol previously described (Michel, et al., 2006), 66 unlesioned animals were anesthetized with an intramuscular injection of 2% Rompun (0.3 ml/kg) and 50 mg/ml ketamine (1.3 ml/kg) (PanPharma, Fougères, F) before being held in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). After partial skull removal, pNB or pNSPC were transplanted unilaterally at the following coordinates according to the bregma and the skull surface: anterior, +0.7 mm; lateral, -2.8 mm; ventral, -5.4 mm and -5.8 mm; incisor bar, -3.3 mm. Cells were injected with a 10-µl Hamilton syringe, mounted on an automated microinjector (Phymed, Paris, F). Each site received 1 µl of a suspension at 2 x  $10^5$  cells/µl, over a period of 1 min. After 4 minutes, the syringe was gently withdrawn, the pieces of cranial bone were replaced on the skull, and the skin incisions were sewn. Animals received a total of 400 000 pNSPC or pNB.

At the indicated times (Tab 2), the rats were deeply anesthetized to perform transcardiac perfusion with 100 ml of 0.9% NaCl, followed by 250 ml of cold 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS). Brains were cryoprotected by a successive immersion in 15% and 30% sucrose. Following this, they were gently frozen in cold isopentane ( $-35^{\circ}$ C) and stored at  $-80^{\circ}$ C.

#### Cell transplantation in 6-OH-dopamine-lesioned animals

To clarify the origin of the TH<sup>+</sup> fibers, nigral dopaminergic neurons were lesioned by injecting the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the medial forebrain bundle of 2 animals. The rats anesthetized with intraperitoneal injection of Rompun/ketamine (1.6 ml/kg) were placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL). The neurotoxin dissolved in 0.1% ascorbate / saline (( $3 \mu g / \mu l$ ) was then injected unilaterally ( $0.5 \mu l / min$ ) as a single dose of 12  $\mu g$  at the following coordinates (in mm relative to the bregma and the skull surface): anterior (A) = -4.4; lateral (L) = -1.2; ventral (V) = -7.8; tooth bar at - 3.3. Efficiency of the lesion was tested two weeks later by counting the amphetamine-induced rotation (5 mg/kg, IP). Both rats exhibited a number of rotations superior to 200 over a period of 40 min. Two weeks later, the two animals were then transplanted bilaterally with 400 000 pNSPC at the following coordinates (in mm relative to the bregma and the skull surface): anterior, +0.7; lateral, -2.8 or +2.8; ventral, -5.4 and -5.8; incisor bar, -3.3. Fourty-two days post-transplantation, the rats were deeply anesthetized and perfused as described above.

#### Histological procedure

Striatum of the transplanted rats was serially sectioned in 16  $\mu$ m section on a freezing cryostat (Leica, CM 3050, Nanterre, F). The sections were collected onto glass slides. Every seventh section was stained with cresyl violet to localize the graft. Adjacent sections were processed for immunohistochemistry. Brain of the 6-OH-dopamine treated rats was processed similarly, except that serial coronal sections were also made through the mesencephalon to control efficiency of the lesion. Cresyl violet staining showed that the 66 transplants in unlesioned rats and the 4 transplants in the lesioned rats were all correctly placed in the striatum.

#### *Immunostaining*

*Antibodies*. The antibodies used in this study are presented in table 1. For information, DP5, a monoclonal antibody raised against the porcine NF70, does not cross recognize the rat subunit. The anti-nestin antibody raised against the rat molecule does not cross-react with the porcine intermediate filament.

*Immunocytochemistry*. Cells plated onto poly-ornithine-coated coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min, saturated for 30 min in PBT-NGS (1X PBS, 4% bovine serum albumin 0.1% triton and 10% normal goat serum) and then incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted in PBT. After several washes, cells were incubated for

1h at room temperature with fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG diluted in PBS-4% BSA. The cells were then mounted in DABCO anti-fading medium (Sigma-Aldrich).

Immunohistochemistry. Brain sections were left for 10 min at RT and fixed for 15 min with chilled 4% PFA in PBS, pH 7.4. After washes, endogenous peroxidases were neutralized by incubating the slides in 0.3% H2O2 at RT. After three further washes in PBS, slides were incubated for about 30 min in PBS containing 4% bovine serum albumin and 10% normal goat serum. Slides were then exposed overnight at 4°C to primary antibody. The antibodies were diluted in PBS containing 4% BSA and 0.1% triton except for ED1 and R73 staining from which the triton was omitted. After several washes, the slides were incubated with biotinylated anti-mouse or anti-rabbit antibodies before their exposure to the avidin-biotinperoxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector, AbCys, Paris, F). For single labeling, the very intense purple (VIP, Vector ABC kit) was used as substrate. For double labeling, we used diaminobenzidine (DAB, Vector) on its own (grey staining) or with NiCl (Black staining). Slides were dehydrated and mounted with Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, F). For each antibody, the immunohistochemistry analyses were performed on a minimum of 3 brain sections from a same transplanted animal. Efficiency of the lesion with 6-OH-dopamine was controlled by analyzing 6 sections covering the pars compacta of the substantia nigra. The sections were separated by 112 micrometers. Since 4% PFA fixation is not optimal for immune mediator staining, as compared to periodate-lysine-paraformaldehyde fixative (PLP)(Subramanian, et al., 1995), ED1 and R73 immunoreactivity might be underestimated in the present study, but this should not affect the comparative study between pNB and pNSPC since all the transplanted rats were fixed with 4% PFA. A flaw of the study design was the lack of stereological method to estimate the number of nestin+, ED1+ and R73+ infiltrating the graft but blind-coded slides were evaluated by two independent readers using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss).

#### Histological classification of the graft

The graft status was assessed using pNF70 and R73 staining (Table2). These parameters were used because their variation corresponds to critical changes in the graft status following the transplantation of porcine neural cells in the rat brain (Michel-Monigadon, et al., 2010, Michel, et al., 2006, Remy, et al., 2001). Indeed, all the grafts are healthy (no sign of degeneration, presence of pNF70 fibers) with no (-) or low (+/-) amount of R73 cells, until the sudden and strong invasion of the graft by T cells (NF70+R73+) which corresponds to the

rejecting stage. The next step is the rapid disappearance of the NF70 staining (NF70-R73+) which corresponds to the loss of the transplant. Then, the graft turned into a scar (Scar) which term was used despite the presence or not of a limited number of R73 cells around the scar. This semi-quantitative 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)..

#### T cell proliferation assay

T cells were isolated from the spleens of Sprague-Dawley rats as previously described (Dugast, et al., 2008). For polyclonal stimulation, T cells were incubated with 5 µg/ml anti-CD28 antibody in flat-bottom 96-well plates previously coated with anti-CD3 (5 µg/ml; 2 h at 37°C). Anti-CD3 and -CD28 antibodies are agonist antibodies inducing the polyclonal proliferation of T cells. For the proliferation assay, polyclonally stimulated T cells ( $10^5$ ) were mixed with irradiated (30 Gy) or non irradiated pNSPC seeded in triplicate in 96-well flat-bottom culture plates. The cells were cocultured for 3 days in AS-N2 / RPMI 1640 (1:1) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 5% heat-inactivated FCS, 1% non essential amino acids, 5 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 1 µM 2-ME. [<sup>3</sup>H] thymidine (0.625µCi per well, Amersham, Orsay, F) was added to the medium 12 hours before collection of the cells onto fiberglass filters using a harvester (Tomtech). For each condition, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was measured in three independent wells by a standard scintillation technique.

A dose-response was performed by adding  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$ , or  $2 \times 10^5$  irradiated NSPC/ well to  $10^5$  stimulated T cells in 96-well flat-bottom culture plates. Inhibition of nitric oxide synthases and prostaglandin synthesis was performed by treating the cocultured cells with *N*G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 1.25 mM, Sigma-Aldrich) or indomethacin (10 µM, Sigma-Aldrich), respectively. For transwell assays,  $4 \times 10^5$  polyclonally stimulated purified T cells were plated in the lower chamber of a 24-well Falcon transwell plate (BD Falcon, Le Pont de Claix, F) and cultured for three days with  $8 \times 10^5$  irradiated (30 Gy) NSPC seeded in the upper chamber. T cell proliferation was measured as described above.

Résultats

#### Flow cytometry analysis

Cells were harvested and incubated for 20 min at 4°C with the following antibodies : R73-Alexa Fluor 488, OX35-PECy7 and OX39-Alexa Fluor 647. Fluorescent labeling was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences, Le Pont de Claix, F) and analyzed with FlowJo® software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

#### Statistical analysis

Graft survival expressed as a percentage of rats displaying NF70+ grafts was analyzed using a one-side Fisher exact test. T cell immune response expressed as the percentage of graft infiltrated by R73+ cells was analyzed using a one-side Fisher exact test. The inhibitory effect of pNSPC on anti-CD3/CD28-stimulated rat T lymphocytes was analysed using the Kruskal-Wallis test. When a significant interaction was observed, the data were further analyzed with the Dunn's multiple comparison test using GraphPad Prism software (Prism Software Corporation, Orange County, CA, USA).

#### Results

#### Survival of pNSPC in the rat brain.

pNSPC were isolated from the forebrain of G28 porcine embryos and expanded as neurospheres for 10 days in the presence of bFGF (Fig. 1). After 7 days in differentiation conditions, 98.4% of the neurospheres contained both GFAP<sup>+</sup> and NF70<sup>+</sup> cells (Fig 1b, c). Very few pNSPC were undergoing a dopaminergic differentiation. Indeed, immunocytochemistry analyses revealed an amount of one tyrosine hydroxylase <sup>+</sup> cells for 100 neurospheres (Fig. 1d).

To analyze the survival of pNSPC in the rat brain, the cells were transplanted into the striatum of non-immunosuppressed rats. The animals were killed at days 8, 28, 42 and 63 posttransplantation (D8, D28, D42 and D63) to compare the survival of pNSPC to that of porcine fetal neuroblasts (pNB) (Tab. 2). This analyse was performed using a specific antibody directed against porcine neurofilament (pNF70, DP5 hybridoma). This anti-pNF70 was the only available antibody that distinct porcine neurons from those of rat, but its restricted pattern of expression (mainly neurites) did not allow a reliable quantification of the total number of porcine neurons by unbiased stereological methods. Fortunately, neural xenografts were healthy displaying strong pNF70 immunoreactivity (pNF70+) until the sudden and strong invasion of the graft by T cells. So, the presence of pNF70+ fibers in the graft was used as indicator of porcine graft survival (pNF70+ graft). As illustrated in Figure 2, the pNB grafts contained a large number of NF70<sup>+</sup> cells at early time-points (D8, Fig.2a) and a dense network of NF70<sup>+</sup> fibers was observed at D28 (Fig. 2b) and D42 (Fig. 2c) in non-rejected pNB grafts. At D63 (Fig. 2d), we did not detect any immunopositive labeling given that all the rats transplanted with pNB had already rejected their graft at this stage (Tab. 2). Immunolabeling of the pNSPC grafts was very different. At D8, very few NF70<sup>+</sup> cell bodies were found in the pNSPC transplants and the cells did not extend processes (Fig. 2e and insert). At D28, certain NF70<sup>+</sup> fibers were present inside the graft (Fig. 2f) but the highest amount of immunopositive fibers was observed at a later time-point such as D42 and D63 (Fig. 2g, h). The high amount of NF70<sup>+</sup> fibers at D63 in pNSPC grafts might be partly explained by the longer survival of these cells in the rat brain as compared to pNB (Tab. 2). 40% of the rats transplanted with pNSPC displayed NF70<sup>+</sup> grafts by D63 (Fig. 2h, i), while at this stage, all the rats transplanted with pNB had already rejected their grafts (Fig. 2d, i). The difference in graft survival was statistically significant at D63 (one-side Fisher exact test, n = 10, P = 0.043) but certain animals

transplanted with pNB had already rejected their grafts as early as D28 and D42 (Fig. 2i and Tab. 2).

## Characterization of the inflammatory and immune responses after the transplantation of pNSPC into the rat brain

Rejection of pNB in the rat brain is accompanied by inflammatory and immune reactions (Michel, et al., 2006, Remy, et al., 2001). As a consequence, immunohistochemical analyses were performed to characterize and compare the host responses after the transplantation of pNSPC and pNB in the rat striatum. We first analyzed the expression of nestin, an embryonic marker strongly downregulated in the adult brain but reexpressed by reactive astroglial cells in case of inflammation (Clarke, et al., 1994). For this purpose, we used the rat 401, an antibody that does not cross react with the porcine form of nestin (data not shown). Nestin<sup>+</sup> cells were consistently found in the rats transplanted with pNB on condition that the transplant was present. The immunopositive cells were confined to the graft (Fig. 3a), but the nestin immunoreactivity spread throughout the striatum as rejection occurred (Fig. 3b). Subsequently, the staining almost completely disappeared as the graft turned into a scar (Fig. 3c). The same pattern was observed in the few pNSPC-rejecting grafts (data not shown). In contrast, in the rats displaying a healthy pNSPC graft, although nestin<sup>+</sup> cells were present within the graft at D28 and 42 (Fig. 3d, e), their number significantly dwindled at later time-points and almost no immunopositive cells were observed at D63 (Fig. 3f).

The same resting status of the pNSPC transplants was observed using the ED1 antibody which labels activated macrophages/microglial cells (Fig. 4). After a first invasion of the pNSPC graft by ED1<sup>+</sup> cells at early time-points such as D8 (Fig. 4e), the staining greatly diminished and at D28, a limited number of ED1<sup>+</sup> cells was observed, mostly at the periphery of the transplant (Fig. 4f). The staining further decreased, becoming very weak at D42 and being almost undetectable at D63 in non rejecting transplants (n = 4/10; Fig 4g, h). This weak ED1 labeling contrasted with the intense ED1 labeling observed at D42 in rats rejecting pNB grafts (Fig. 4c) and even after the complete rejection at D63, ED1<sup>+</sup> cells were still observed around the scar in the brain of pNB-grafted rats (Fig. 4d).

Differences were also noticed using an anti-R73 antibody that labels T cells (Fig. 5, Tab. 2). At early time-points such as D8, T cells were rarely detected in the grafted striatum whatever the cell type transplanted (Fig. 5e). In contrast, at later time-points such as D28 or D42, a massive infiltration of  $R73^+$  cells was observed in pNB-grafted rats (Fig. 5b, e) whereas the presence of T cells in the striatum of pNSPC-grafted rats remained rare (Fig. 5a,

e). At D28 and D42,  $R73^+$  cells were observed in the brain of 40% and 90% of the pNBtransplanted rats respectively, while at the same stages, no immunopositive cells was detected in the brain of 100% and 90% of the pNSPC-transplanted rats, respectively (Fig. 5e). At D42, only one of the **7** rats transplanted with NSPC exhibited  $R73^+$  cells at the graft site and the complementary analyses clearly indicated that the corresponding graft was undergoing cell rejection. At D63, only a scar with few  $R73^+$  cells persisted in the rats transplanted with pNB (Fig. 5d). In contrast, 40% of the rats transplanted with NSPC exhibited healthy and large grafts with no  $R73^+$  cells (Fig. 5c). As a matter of fact, T cells were only found in two of the 22 rats transplanted with pNSPC (Fig. 5e, Tab. 2). A double labeling CD8 $\beta$ /R73 indicated that these R73<sup>+</sup> cells corresponded to both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 5f).

#### Immunoregulatory properties of the neural precursor cells.

The long survival of pNSPC in the rat brain and the weak infiltration of the graft by R73<sup>+</sup> cells raise the possibility that NSPC exert particular immunomodulatory properties. To test this hypothesis, naive rat T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies were incubated with an increasing number of irradiated pNSPC for 3 days (Fig. 6a). A pulse of <sup>3</sup>H]-thymidine was performed during the last 12 hours. Analysis of the cells revealed that the uptake of thymidine by stimulated T cells was significantly reduced in the presence of pNSPC. The effect was closely correlated to the number of NSPC. Indeed, co-cultures (pNSPC/stimulated T cells) at ratios of 1:4; 1:2; 1:1 and 2:1 led to 47%, 65%, 87% and 98% inhibition of T cell proliferation, respectively (mean of 10 experiments). As indicated in Figure 6a, the inhibition of T cell proliferation was statistically significant for a minimum of 1 pNSPC for 2 T lymphocytes. The inhibitory effect was not due to cell irradiation inhibition was observed using non irradiated pNSPC at a 2:1 ratio (Fig. 6c). To characterize the mechanisms underlying NSPC effects, the question was asked whether cell contact was required to inhibit T cell proliferation. For this purpose, T cells were plated in the lower chamber of a 24-transwell plate coated with anti-CD3 mAb and stimulated with anti-CD28 mAb. Then, T cells were cultured for three days with irradiated pNSPC seeded in the upper chamber. The results described in Figure 6b show an 80% inhibition of T cell proliferation even if the cells were separated by a semi-permeable membrane. This result favors the implication of a soluble factor in the inhibition of T cell proliferation by pNSPC.

To determine whether pNSCP interfere with T cell activation, induction of CD25 was controlled by flow cytometry. Naive T cells were then incubated for 3 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in presence or absence of pNSPC (ratios pNSPC/ T cells : 0:1, 1:1 or

2:1) but as shown on the figure 6g, stimulated  $R73^+$  cells were all immunopositive for CD25<sup>+</sup> even after incubation with high amount of pNSCP. We also showed that pNSPCs did not have major influence on the type of  $R73^+$  cells that respond to anti-CD3/CD28 stimulation since the percentage of CD4-/CD25+ et CD4+/CD25+ T cells were not significantly different in presence or in absence of pNSPC (Fig.6, d-f, h-i).

Since prostaglandins and nitric oxide have been recently suggested as being implicated in the immunosuppressive effect of a mouse NSPC line (Wang, et al., 2009), indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis or L-NMMA, an inhibitor of nitric oxide synthase, were added to the co-culture. As described in Figures 6j and 6k, neither indomethacin nor LNMMA reversed the T cell inhibition induced by pNSPC, suggesting that these molecules are not involved in the immunosuppressive activity of porcine NSPCs.

#### Presence of TH fibers in NSPC transplants

In addition to the differences in graft survival, major distinctions in the profile of TH expression were also observed after the transplantation of pNSPC into adult rat striatum as compared to the grafting of pNB (Fig.7). TH<sup>+</sup> cells exhibiting a neuronal morphology (Fig. 7d) were clearly present in all the healthy pNB grafts at D28 (Fig. 7a), while neither TH<sup>+</sup> cells nor TH<sup>+</sup> fibers were detected in any pNSPC grafts at this time (data not shown). At D42, thin TH<sup>+</sup> fibers were clearly present inside the pNSPC grafts (Fig.7 b, e) but no TH<sup>+</sup> cell body could be detected within or around the transplants. At D63, the immunostaining was much stronger with a dense network of TH<sup>+</sup> fibers inside the pNSPC transplants (Fig. 7c, f) but, here again, no TH<sup>+</sup> cell body could be detected inside the grafts. Since the striatum is naturally innervated by dopaminergic fibers from the substantia nigra, the TH<sup>+</sup> fibers might come from the host and not from the differentiation of transplanted pNSPC. This possibility was made more feasible by the absence of thin TH<sup>+</sup> fibers inside the pNB transplants.

To clarify the origin of the TH<sup>+</sup> fibers, dopaminergic neurons of the substantia nigra were lesioned by unilaterally injecting 6-hydroxydopamine into the medial forebrain bundle. Efficiency of the lesion was first assessed by counting the number of amphetamine-induced rotations achieved by lesioned rats (over 5 rotations/min). Immunohistochemistry analyses confirmed an extensive loss of dopaminergic neurons since no TH+ was found in the SNpc of the lesioned side (Fig.7j) while the pars compacta was intact on the unlesioned side (Fig. 7i). Four weeks after the lesion, pNSPC were grafted into the contralateral and ispilateral striatum. Immunohistochemical analyses performed at day 42 post-transplantation showed the presence of TH<sup>+</sup> fibers in the pNSPC implanted in the striatum innervated by host dopaminergic neurons (unlesioned side; Fig. 7g), while no TH immunostaining was observed in the pNSPC transplanted in the striatum that have lost their afferences from the substantia nigra (lesioned side) (Fig.7h). These data indicated that the TH<sup>+</sup> fibers inside the pNSPC grafts were due to the innervation of the striatum by rat dopaminergic fibers coming from the substantia nigra.

#### Discussion

The intensity and rapidity of the rejection in the brain depend on the phylogenetic distance between donor and host (Dymecki, et al., 1990, Mason, et al., 1986, Pakzaban and Isacson, 1994) and the status of the host immune system (Marion, et al., 1990) but our present data emphasize the fact that the host immune response is also influenced by the nature of the transplanted cells. Porcine aortic endothelial cells (PAEC) implanted into the rat striatum are eradicated within 1-2 weeks (Remy, et al., 2001) while pNB are rejected within 4-6 weeks (Barker, et al., 2000, Melchior, et al., 2002, Michel, et al., 2006, Remy, et al., 2001). Here, we show that pNSPC survive even longer since large and healthy NF70<sup>+</sup> grafts were observed 9 weeks post-transplantation of these cells into the rat brain. The prolonged survival of pNSPC in a xenogeneic host has been previously attributed to the low immunosuppressive and neurotrophic properties that probably contribute to the lengthy survival of intracerebral xenografts.

One of the early immune response following cell transplantation in the brain is a strong infiltration of the graft by ED-1<sup>+</sup> cells (Armstrong, et al., 2001, Barker, et al., 2000, Mason, et al., 1986, Michel, et al., 2006, Remy, et al., 2001). Since ED1-immunostaining was observed in non-rejecting syngeneic grafts (Shinoda, et al., 1996) or after injection of vehicle into the striatum (Michel, et al., 2006), the early recruitment of microglia/macrophages might be part of the inflammatory process induced by the surgical procedure. This does not exclude more specific roles and studies suggest an implication of microglial/macrophages as specific cytotoxic effectors (Dheen, et al., 2007, Fanger, et al., 1989, Nakajima and Kohsaka, 2001), as innate phagocytes (Davis, et al., 1994, Giulian, et al., 1995) or as antigen-presenting cells to lymphocytes (Beauvillain, et al., 2008). Here, we show a similar activation of microglia/macrophages in response to the transplantation of pNB or pNSPC but the temporal evolution over the following 9 weeks varied significantly. In fact, ED1<sup>+</sup> cells were consistently present inside and around all the pNB grafts while in the non rejecting pNSPC, their amount progressively decreased and became almost undetectable by Day 63. The same difference was observed using the rat nestin as a marker, i.e., an intermediate filament expressed by reactive astroglial in case of inflammation in the brain (Clarke, et al., 1994). Nestin<sup>+</sup> cells derived from the host were consistently observed in pNB grafts while very few rat nestin<sup>+</sup> cells were detected in non rejecting pNSPC grafts. Such observations are consistent with a resting status of the pNSPC grafts, which contrasts with the residual inflammatory reaction consistently observed in pNB grafts. The immaturity and the low immunogenicity of pNSPC might contribute to the weak host immune response (Armstrong, et al., 2001), and we can not exclude that all the pNSPC transplants will be finally rejected as pNSPC become fully mature as neurons. Alternatively, primary cell suspensions may contain cells such as microglial or astroglial cells which strongly express molecules of the major histocompatibility complex (MHC) in presence of inflammatory cytokines (Fierz, et al., 1985, Finsen, et al., 1991, Subramanian, et al., 1995). However, the fact that syngeneic NSPC can hamper inflammatory brain processes in experimental models of multiple sclerosis (Einstein, et al., 2006) raises other possibilities that can contribute to the lengthy survival of pNSPC in the brain of immunocompetent rat. In multiple sclerosis models, the beneficial outcomes were partially due to the immunosuppressive effects exerted by NSPC on peripheral T cells (Einstein, et al., 2007, Pluchino, et al., 2005). The absence of T cells in most pNSPC transplants and the inhibition of rat T cell proliferation by pNSPC advocate an immunosuppressive role for pNSPC following intracerebral xenotransplantation. The suppression was dose-dependent with 47% inhibition for a ratio of 1 pNSPC to 4 T cells and 87 % inhibition for a ratio of 1: 1. This immunoregulatory effect was stronger than the inhibitory activity triggered by porcine mesenchymal stem cells on human peripheral blood lymphocytes as assessed by the mixed lymphocyte reaction system (Liu, et al., 2004). In an attempt to characterize the factors responsible for the suppressive effect of pNSPC, LNMMA or indomethacin was added to the co-cultures. Neither of the two drugs was able to restore the proliferation of anti-CD3/CD28-activated T cells, indicating that nitric oxide and prostaglandin E2 were probably not the main mediators of the immunosuppressive effect triggered by pNSPC on rat T cells. These data contrast with the results of Wang et al., showing that inhibition of nitric oxide and prostaglandin E2 production restored the proliferation of Concanavalin A-activated T cells inhibited by co-cultures with the C17.2 mouse stem cells (Wang, et al., 2009). This discrepancy may be due to species differences but also to the stimuli used to activate T cells. In 2005, Rasmusson et al. showed that prostaglandins were significant in the inhibition by mesenchymal stem cells when the T cells were activated by mitogens such as phytohemagglutinin (PHA), but not by alloantigens (Rasmusson, et al., 2005). Further studies are required to fully elucidate the mechanisms through which pNSPC suppress the proliferation of rat T cells, but our present study already distinguishes a major role for soluble factors. An 80% decrease in the rate of T cell proliferation was observed even when rat lymphocytes and pNSPC were separated by a semipermeable membrane. According to previous studies on the mechanisms of immunosuppression by mesenchymal stem cells (Uccelli, et al., 2008), several molecules are potential candidates for the induction of NSPC-mediated immunosuppression, including soluble factors such as IL-10 or Transforming Growth Factor (TGF $\beta$ ). The induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in NSPC may also contribute to their immunoregulatory activity by depleting tryptophan from the local environment, which is an essential amino acid for lymphocyte proliferation (Hwu, et al., 2000, Munn, et al., 1999). All these possibilities have to be investigated but it is likely that diverse pathways contribute to the immunosuppressive activity of NSPC as shown for mesenchymal stem cells (Beyth, et al., 2005, Di Nicola, et al., 2002, Krampera, et al., 2006).

In addition to their immunosuppressive effect, pNSPC exhibit particular properties in terms of cell differentiation. In fact, very few pNSPC extended processes and expressed the NF70 neuronal marker at Day 8 post-transplantation in contrast with the high number of NF70<sup>+</sup> cell bodies in pNB grafts. This difference is probably due to the undifferentiated state of pNSPC at the time of grafting and to the low amount of neurotrophic factors in the intact brain. Pre-treatment of the cells with neurotrophic factors or transplantation in a favorable microenvironment might be useful to hasten the differentiation of pNSPC since the early expression of neuronal markers has been observed following the transplantation of bFGF/EGF expanded neural precursors in a rat model of Parkinson's disease (Armstrong, et al., 2001). However, the large amount of pNF70<sup>+</sup> cells at D63 indicates that such treatment should not be necessary, except if one particular neuronal phenotype is required. Indeed, very few pNSPC differentiated into dopaminergic neurons in vitro and no TH<sup>+</sup> cell body was detected inside the graft. The low efficiency of dopaminergic neuron generation could not be explained by the use of porcine embryos as a source of NSPC since the same problem has been previously observed using rat, mouse or human NSPC (Ling, et al., 1998, Studer, et al., 1998, Svendsen, et al., 1996). As a result, the strategies developed to control the fate of stem cells should be of great interest in promoting the differentiation of pNSPC into dopaminergic neurons. For instance, the overexpression of transcriptional factors involved in the commitment of the neural cells such as Nurr1 might favor the appearance of a dopaminergic phenotype in association with astrocyte-derived factors (Kim, et al., 2003, Wagner, et al., 1999). Treatment with ascorbic acid (Yan, et al., 2001) or serum (Studer, et al., 1998) as well as a combination of soluble factors such as fibroblast growth factor 8 (FGF8) and sonic hedgehog (SHH) (Lee, et al., 2000) or IL-1, IL-11, LIF and GDNF (Ling, et al., 1998) might also increase the yield of TH<sup>+</sup> neurons derived from the NSPC.
Another striking observation following the transplantation of pNSPC into an unlesioned rat striatum was the large amount of TH<sup>+</sup> fibers in the NSPC transplants, which contrasts to the low number of TH<sup>+</sup> cell bodies. One explanation is that nigral dopaminergic neurons extend TH<sup>+</sup> fibers upon contact with pNSPC implanted in the striatum. The absence of TH<sup>+</sup> fibers in the NSPC grafts after the lesion of nigral dopaminergic neurons by 6-OH dopamine bears out such a hypothesis. This finding is of great interest for restorative strategies, since it raises the possibility of trophic activity in addition to cell replacement. Such a bystander effect was previously suspected in animal models for which motor recovery was observed without any evidence of cell differentiation of the transplanted cells into the expected phenotype. Neuroprotection by human neural progenitor cells has been observed in an experimental model of brain contusion (Hagan, et al., 2003) but here we show a specific neurotrophic effect of pNSPC, which should be useful to trigger extra-innervation from the substantia nigra towards the striatum in the case of partial loss of dopaminergic neurons. Of course, this impact on fiber outgrowth does not rule out the possibility of a direct neuroprotective effect on dying dopaminergic neurons. Further studies are required to fully characterize the neurotrophic effects of NSPC but the increase in the density of TH<sup>+</sup> fibers is probably due to the secretion of one or several factors known for their effect on nigral dopaminergic neurons such as GDNF, BDNF, and stem cell factor. Importantly, everything may depend on the pNSPC differentiation state. Lu et al., showed that the NT3-induced differentiation of C17.2 cells led to the loss of GDNF expression and to an increased production of BDNF (Lu, et al., 2003). Another experimental work performed on a human immortalized cell line indicated that undifferentiated NSPC protected mesencephalic dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine neurotoxicity, probably through the production of the stem cell factor (Yasuhara, et al., 2006). For this reason, a better definition of the underlying mechanism of the pNSPC neurotrophic effect should include a careful analysis of whether the transplanted pNSPC exert their effect on dopaminergic neurite outgrowth as undifferentiated or committed cells.

pNSPC were introduced as a cell source for restorative therapy, but the present data indicate that these cells might also contribute to host neural repair by controlling the host immune reaction and by promoting neurite outgrowth and/or neuron rescue. Further experiments are required to optimize their application in restorative therapy but like mesenchymal stem cells, pNSPC appear as multifaceted immunomodulatory cells with promising perspectives for neural transplantation in the case of neurodegenerative diseases.

Acknowledgments: The authors are grateful to Pr. Jean-Paul Soulillou for his support. We also thank Joanna Ashton-Chess for critical reading the manuscript. The nestin antibody obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) was developed by Susan Hockfield developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. The DP5 antibody was a gift of Dr Denise Paulin, Université Pierre et Marie Curie, Paris, F. The work was supported by the "Association Française contre les Myopathies" (AFM) and by the "Fédération des Groupements de Parkinsoniens". D. Michel and V.Bonnamain were supported by fellowships from INSERM/Région Pays de Loire, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Association Progreffe.

#### References

- Armstrong, R. J., Harrower, T. P., Hurelbrink, C. B., McLaughin, 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.
- Barker, R. A., Ratcliffe, E., McLaughlin, M., Richards, A., and Dunnett, S. B., 2000. A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. J Neurosci 20, 3415-3424.
- Barker, R. A., and Widner, H., 2004. Immune problems in central nervous system cell therapy. NeuroRx 1, 472-481.
- Beauvillain, C., Donnou, S., Jarry, U., Scotet, M., Gascan, H., Delneste, Y., Guermonprez, P., Jeannin, P., and Couez, D., 2008. Neonatal and adult microglia cross-present exogenous antigens. Glia 56, 69-77.
- 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.
- Cicchetti, F., Fodor, W., Deacon, T. W., van Horne, C., Rollins, S., Burton, W., Costantini, L. C., and Isacson, O., 2003. Immune parameters relevant to neural xenograft survival in the primate brain. Xenotransplantation 10, 41-49.
- Clarke, S. R., Shetty, A. K., Bradley, J. L., and Turner, D. A., 1994. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. Neuroreport 5, 1885-1888.
- Davis, E. J., Foster, T. D., and Thomas, W. E., 1994. Cellular forms and functions of brain microglia. Brain Res Bull 34, 73-78.
- Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penney,
  D., Kassissieh, S., Dempsey, P., and Isacson, O., 1997. Histological evidence of fetal
  pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease.
  Nat Med 3, 350-353.
- Deacon, T. 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.

- Dheen, S. T., Kaur, C., and Ling, E. A., 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. Curr Med Chem 14, 1189-1197.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A. M., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress Tlymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood 99, 3838-3843.
- Duan, W. M., Widner, H., and Brundin, P., 1995. Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngeneic, allogeneic or xenogeneic embryonic neuronal tissue in rats. Exp Brain Res 104, 227-242.
- Dugast, A. S., Haudebourg, T., Coulon, F., Heslan, M., Haspot, F., Poirier, N., Vuillefroy de Silly, R., Usal, C., Smit, H., Martinet, B., Thebault, P., Renaudin, K., and Vanhove, B., 2008. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. J Immunol 180, 7898-7906.
- Dymecki, J., Poltorak, M., and Freed, W. J., 1990. The degree of genetic disparity between donor and host correlates with survival of intraventricular substantia nigra grafts. Reg Immunol 3, 17-22.
- 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.
- 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.
- Fanger, M. W., Shen, L., Graziano, R. F., and Guyre, P. M., 1989. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. Immunol Today 10, 92-99.
- Fierz, W., Endler, B., Reske, K., Wekerle, H., and Fontana, A., 1985. Astrocytes as antigenpresenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. J Immunol 134, 3785-3793.
- Fink, J. S., Schumacher, J. M., Ellias, S. L., Palmer, E. P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H. S., Dempsey, P. K., Fischman, A. J.,

Raineri, R., Manhart, C., Dinsmore, J., and Isacson, O., 2000. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. Cell Transplant 9, 273-278.

- Finsen, B., Poulsen, P. H., and Zimmer, J., 1988. Xenografting of fetal mouse hippocampal tissue to the brain of adult rats: effects of cyclosporin A treatment. Exp Brain Res 70, 117-133.
- Finsen, B. R., Sorensen, T., Castellano, B., Pedersen, E. B., and Zimmer, J., 1991. Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron microscopical immunocytochemical study. J Neuroimmunol 32, 159-183.
- Giulian, D., Li, J., Bartel, S., Broker, J., Li, X., and Kirkpatrick, J. B., 1995. Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. J Neurosci 15, 7712-7726.
- Hagan, M., Wennersten, A., Meijer, X., Holmin, S., Wahlberg, L., and Mathiesen, T., 2003. Neuroprotection by human neural progenitor cells after experimental contusion in rats. Neurosci Lett 351, 149-152.
- 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.
- Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., and Young, H. A., 2000. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. J Immunol 164, 3596-3599.
- 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.
- Jacoby, D. B., Lindberg, C., Cunningham, M. G., Ratliff, J., and Dinsmore, J., 1999. Longterm survival of fetal porcine lateral ganglionic eminence cells in the hippocampus of rats. J Neurosci Res 56, 581-594.

- 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., and Lee, S. H., 2003. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. J Neurochem 85, 1443-1454.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F., 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 24, 386-398.
- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F., 2003.Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood 101, 3722-3729.
- Larsson, L. C., Czech, K. A., Brundin, P., and Widner, H., 2000. Intrastriatal ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. Cell Transplant 9, 261-272.
- Larsson, L. C., Frielingsdorf, H., Mirza, B., Hansson, S. J., Anderson, P., Czech, K. A., Strandberg, M., and Widner, H., 2001. Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. Exp Neurol 172, 100-114.
- 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.
- 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.
- Liu, J., Lu, X. F., Wan, L., Li, Y. P., Li, S. F., Zeng, L. Y., Zeng, Y. Z., Cheng, L. H., Lu, Y. R., and Cheng, J. Q., 2004. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. Transplant Proc 36, 3272-3275.
- 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.

- Lund, R. D., Rao, K., Kunz, H. W., and Gill, T. J., 3rd, 1989. Immunological considerations in neural transplantation. Transplant Proc 21, 3159-3162.
- Marion, D. W., Pollack, I. F., and Lund, R. D., 1990. Patterns of immune rejection of mouse neocortex transplanted into neonatal rat brain, and effects of host immunosuppression. Brain Res 519, 133-143.
- Martin, C., Plat, M., Nerriere-Daguin, V., Coulon, F., Uzbekova, S., Venturi, E., Conde, F., Hermel, J. M., Hantraye, P., Tesson, L., Anegon, I., Melchior, B., Peschanski, M., Le Mauff, B., Boeffard, F., Sergent-Tanguy, S., Neveu, I., Naveilhan, P., Soulillou, J. P., Terqui, M., Brachet, P., and Vanhove, B., 2005. Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. Transgenic Res 14, 373-384.
- Mason, D. W., Charlton, H. M., Jones, A. J., Lavy, C. B., Puklavec, M., and Simmonds, S. J., 1986. The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. Neuroscience 19, 685-694.
- Melchior, B., Remy, S., Nerriere-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.
- Michel-Monigadon, D. C., 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 In press.
- Michel, D. C., Nerriere-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.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A. L., 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. J Exp Med 189, 1363-1372.
- Nakajima, K., and Kohsaka, S., 2001. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. J Biochem 130, 169-175.
- 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.

- Pakzaban, P., and Isacson, O., 1994. Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. Neuroscience 62, 989-1001.
- Pedersen, E. B., Zimmer, J., and Finsen, B., 1997. Triple immunosuppression protects murine intracerebral, hippocampal xenografts in adult rat hosts: effects on cellular infiltration, major histocompatibility complex antigen induction and blood-brain barrier leakage. Neuroscience 78, 685-701.
- Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., Furlan, R., Comi, G., Vescovi, A. L., and Martino, G., 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., Comi, G., Constantin, G., and Martino, G., 2005. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. Nature 436, 266-271.
- Pollack, I. F., Lund, R. D., and Rao, K., 1990. MHC antigen expression in spontaneous and induced rejection of neural xenografts. Prog Brain Res 82, 129-140.
- Rasmusson, I., 2006. Immune modulation by mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 312, 2169-2179.
- Rasmusson, I., Ringden, 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.
- Remy, S., Canova, C., Daguin-Nerriere, V., Martin, C., Melchior, B., Neveu, I., Charreau, B., Soulillou, 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.
- Rezzani, R., 2006. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. Histol Histopathol 21, 301-316.
- Rossignol, J., Boyer, C., Thinard, R., Remy, S., Dugast, A. S., Dubayle, D., Dey, N. D., Boeffard, F., Delecrin, J., Heymann, D., Vanhove, B., Anegon, I., Naveilhan, P., Dunbar, G. L., and Lescaudron, L., 2009. Mesenchymal stem cells induce a weak

immune response in the rat striatum after allo and xenotransplantation. J Cell Mol Med, In Press.

- Sergent-Tanguy, S., Veziers, J., Bonnamain, V., Boudin, H., Neveu, I., and Naveilhan, P., 2006. Cell surface antigens on rat neural progenitors and characterization of the CD3 (+)/CD3 (-) cell populations. Differentiation 74, 530-541.
- Shinoda, M., Hudson, J. L., Stromberg, I., Hoffer, B. J., Moorhead, J. W., and Olson, L., 1996. Microglial cell responses to fetal ventral mesencephalic tissue grafting and to active and adoptive immunizations. Exp Neurol 141, 173-180.
- Smith, P. M., and Blakemore, W. F., 2000. Porcine neural progenitors require commitment to the oligodendrocyte lineage prior to transplantation in order to achieve significant remyelination of demyelinated lesions in the adult CNS. Eur J Neurosci 12, 2414-2424.
- 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.
- Subramanian, T., Pollack, I. F., and Lund, R. D., 1995. Rejection of mesencephalic retinal xenografts in the rat induced by systemic administration of recombinant interferon-gamma. Exp Neurol 131, 157-162.
- Svendsen, C. N., Clarke, D. J., Rosser, A. E., and Dunnett, S. B., 1996. Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. Exp Neurol 137, 376-388.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol 8, 726-736.
- Uccelli, A., Pistoia, V., and Moretta, L., 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? Trends Immunol 28, 219-226.
- Wagner, J., Akerud, P., Castro, D. S., Holm, P. C., Canals, J. M., Snyder, E. Y., Perlmann, T., and Arenas, E., 1999. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. Nat Biotechnol 17, 653-659.
- 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.

- Widner, H., and Brundin, P., 1988. Immunological aspects of grafting in the mammalian central nervous system. A review and speculative synthesis. Brain Res 472, 287-324.
- 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.
- 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 26, 12497-12511.

Legend
--------

Specificity	Host	Clone	Dilution	Target cells	Origin
CD3	Mouse	G4.18	5 μg/ml	T cells	1
CD8	Mouse	JJ319	5 μg/ml	T cells	2
ED1	Mouse	ED1	Supernatant	Macrophages, microglial cells	3
GFAP	Mouse	G-A-5	2 µg/ml	Astrocytes	4
NF70	Mouse	DP5	10 µg/ml	Pig neurons	5
Rat Nestin	Mouse	RAT 401	1 μg/ml	Rat reactive astrocytes , NSPC	6
TCR	Mouse	TCR	Supernatant	T cells	3
TH	Rabbit	polyclonal	0.1 μg/ml	Dopaminergic neurons	7
Mouse IgG (FITC)	Goat	polyclonal	1.5 μg/ml		8
Mouse IgG (Biot)	Horse	polyclonal	1 μg/ml		8
Rabbit IgG (FITC)	Donkey	polyclonal	3 µg/ml		8
Rabbit IgG (Biot)	Goat	polyclonal	2.2 µg/ml		8

Antibodies used in this study.1, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA; 2, University of Würzburg, D.; 3, European Collection of Cell Culture, Salisbury, UK; 4, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA; 5, Université Paris VII, Paris, F; 6, Developmental Studies Hydridoma Bank, Iowa city, IA, USA, 7, PelFreeze, Rogers, Ark, USA; 8, Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, UK.

**Table 1**: Antibodies used in this study.

	D8		D28		D42		D63	
	рNВ	pNPC	pNB	pNPC	pNB	pNPC	pNB	pNPC
Number of rats	4	5	10	5	15	7	10	10
NF70 <sup>+</sup> /R73 <sup>-</sup>	1	5	4	5	0	4	0	4
NF70 <sup>+</sup> /R73 <sup>+/-</sup>	3	0	2	0	1	0	0	0
NF70 <sup>+</sup> /R73 <sup>+</sup>	0	0	2	0	4	0	0	0
NF70 <sup>-</sup> /R73 <sup>+</sup>	0	0	2	0	5	1	0	1
Scar	0	0	0	0	5	2	10	5

Rejection of the graft was determined by analyzing T cell infiltration (R73+) and the disappearance of the porcine neurons (NF70-) at Days

8, 28, 42 and 63 post-transplantation. Each rat was classified as NF70+/ R73-, NF70+/ R73+/-, NF70+/ R73+, NF70-/ R73+ or scar. R73+/- corresponds to a brain with 1-10 T cells per section.

Table 2: Graft survival in unlesioned rats grafted with pNB or pNSPC.

Rejection of the graft was determined by analyzing T cell infiltration ( $R73^+$ ) and the disappearance of the porcine neurons (NF70<sup>-</sup>) at Days 8, 28, 42 and 63 post-transplantation. Each rat was classified as NF70<sup>+</sup>/  $R73^-$ , NF70<sup>+</sup>/  $R73^{+/-}$ , NF70<sup>+</sup>/  $R73^+$ , NF70<sup>-</sup>/  $R73^+$  or scar.  $R73^{+/-}$  corresponds to a brain with 1-10 T cells per section.



**Fig. 1**: Characterization of the pNSPC. (**a**) Bright field micrograph of pNSPC grown as neurospheres in AS-N2 medium supplemented with 25 ng/ml of bFGF. (**b-d**) Fate of differentiated pNSPC. The pNSPC plated on poly-ornithine coated coverslips were grown for 7 days in AS-N2 medium. Immunocytofluorescence analyses indicate that pNSPC expressed NF70 (**b**) or GFAP (**c**) in differentiating conditions. Some cells also expressed tyrosine hydroxylase (**d**). Scale bar: a, 100  $\mu$ m; b-d, 25  $\mu$ m.



**Fig. 2**: Immunohistochemical analyses of pNB (**a-d**) and pNSPC (**e-h**) grafts using antipNF70 antibody. pNB or pNSPC were transplanted into the striatum of healthy rats and the presence of pNF70+ cells was analyzed at 8 (**a**, **e**), 28 (**b**, **f**), 42 (**c**, **g**) or 63 (**d**, **h**) days posttransplantation. (**i**) Percentage of grafts with pNF70<sup>+</sup> cells at 8, 28, 42 and 63 days posttransplantation. Asterisks denote statistical significance (one-side Fisher exact test,\* p =0.043). The total number of rats for each time point is reported in brackets. Scale bars: 133 µm ; insert, 15 µm.



**Fig. 3**: Immunohistochemical analyses of pNB and pNSPC grafts using the rat 401 anti-nestin antibody. The rats transplanted with pNB (**a-c**) or pNSPC (**d-f**) were killed at 28 (**a**, **d**), 42 (**b**, **e**) and 63 (**c**, **f**) days post-transplantation. Scale bars: a-f, 130 μm; insert, 15 μm.



**Fig. 4**: Immunohistochemical analyses of pNB (**a-d**) and pNSPC (**e-h**) grafts using ED1 antibody. The rats transplanted were killed at 8 (a, e), 28 (b, f), 42 (c, g) and 63 (d, h) days to analyze microglial activation using the ED1 antibody. Scale bar: 150 μm.



**Fig. 5**: Immunohistochemical analyses of pNB and pNSPC grafts using R73 antibody. The rats transplanted with pNB (**b**, **d**) or pNSPC (**a**, **c**) were killed at 42 (**a**, **b**) or 63 (**c**, **d**) days to analyze infiltration of the graft by R73<sup>+</sup> T cells. Numbers of animals in each group is presented in fig 2i. (**a-d**) Representative low-magnification micrographs. (**e**) Percentage of grafts infiltrated by R73+ cells. Asterisks denote statistical significance (one-side Fisher exact test,\* p = 0.0023 (D42), p= 0.0005 (D63)) (**f**) A double labeling CD8 $\beta$  (black) / R73 (brown) indicated that the R73<sup>+</sup> cells detected in a rat that rejected the pNSPC transplant at D63 corresponded to both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells. Scale bars: a-d, 133 µm ; f, 25 µm.



**Fig. 6**: pNSPC inhibit the proliferation of anti-CD3/CD28-stimulated rat T lymphocytes. (**a**) Dose-response. Purified T cells (10<sup>5</sup> cells/well) were stimulated (Stim T) or not (T cells) with anti-CD3/CD28 antibodies. Stim T cells were incubated for three days with various ratios of irradiated (30 Gy) pNSPC. [<sup>3</sup>H]-thymidine was added 12 hours before cell collection. For

each condition, thymidine incorporation was measured in three independent wells. Data are mean cpm  $\pm$  SEM of 10 independent experiments. (b) T cells (4x10<sup>5</sup> cells/well) were placed in the lower chamber of a 24-well Transwell plate and cultured with  $8 \times 10^5$  irradiated (30 Gy) pNSPC plated in the upper chamber. Data are mean cpm ± SEM of 9 independent experiments. (c) T cells ( $10^5$  cells/well) were incubated with  $2x10^5$  non irradiated pNSPC. Data are mean cpm  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. (d, i) Rat T cells (10<sup>5</sup> cells/well) were incubated for 3 days with anti-CD3/CD28 antibodies in the presence of irradiated porcine NSPCs (30 Gy). Flow cytometry experiments were then performed to evaluate CD25 expression by R73<sup>+</sup> cells (g), and to analyse the percentage of CD4<sup>-</sup>/CD25<sup>+</sup> (d-f, h) and  $CD4^{+}/CD25^{+}$  (d-f, i) among the R73<sup>+</sup> T cell population cultured at a ratio of 0/1 (d), 1/1 (e), 2:1 (f) NSPC/Stim T (n=3). (d-f) Flow cytometry dot plots are from one representative experiment out of three. (j-k) Suppression assays. T cells (10<sup>5</sup> cells/well) were incubated with 2x10<sup>5</sup> irradiated pNSPC in presence of indomethacin (INDO, non selective COX inhibitor) or L-NMMA (LN, non selective NOS inhibitor). Data are mean cpm  $\pm$  SEM of 5 (d) or 3 (e) independent experiments. Statistical significance was evaluated by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test (\*: p<0.05; \*\*: p<0.001; \*\*\*: p<0.0001) versus the 0/1 ratio (stimulated T cells in the absence of NSPCs).



**Fig. 7**: Immunohistochemical analyses of pNB (**a,d**) and pNSPC (**b, c, e, f**) grafts using anti-TH antibody. pNB or pNSPC were transplanted into the striatum of healthy rats. The animals were then sacrificed at 28, 42 or 63 post-transplantation to perform tyrosine hydroxylase staining. Micrographs of the whole graft (**a, b**) and high magnification (**c-f**) of a D28 pNB graft (**a, d**) or of D42 (**b, e**) and D63 (**c,f**) pNSPC grafts are presented. (**g-h**) To clarify the origin of TH<sup>+</sup> fibers, pNSPC were grafted into the striatum of rats unilaterally lesioned. Immunohistochemical analyses performed at day 42 clearly showed the presence of TH<sup>+</sup> fibers in the transplants on the non lesioned side (g) while no immunostaining was observed on the lesioned side (h). The absence of TH<sup>+</sup> neurons in the pars compacta on the lesioned side (j) indicate that lesion of the dopaminergic neurons innervating the striatum was

efficiently performed. This was further confirmed by the absence of  $TH^+$  fibers around the graft on the lesioned side (h). On the non lesioned side, the SNpc was intact (i) and numerous  $TH^+$  fibers was observed around the graft (g). Scale bars: a-c, g-h, 170  $\mu$ m; d, 15  $\mu$ m; e-f, 70  $\mu$ m.

## **Discussion**

Notre étude montre une survie plus importante des pCSPN transplantées dans le striatum de rats immunocompétents comparativement à des pNB. En effet, 63 jours après la transplantation, 40% des animaux greffés avec des pCSPN présentent encore un greffon alors que tous les rats transplantés avec des pNB ont totalement rejeté le xénotransplant.

Une particularité des rats greffés avec des pCSPN est le très faible nombre d'animaux chez lesquels on note une infiltration du greffon par des lymphocytes T et le nombre important de transplants ne présentant pas de réaction inflammatoire à J63. Des analyses complémentaires seraient nécessaires pour déterminer les causes exactes de la faible réponse immune observée chez ces animaux mais différentes hypothèses peuvent être proposés. Ainsi, il est probable que l'étape d'expansion *in vitro* augmente la proportion de cellules neurales transplantés dans le cerveau et limitent le nombre de cellules contaminantes comme les cellules endothéliales ou microgliales connues pour exprimer les molécules du CMH et pour synthétiser des cytokines pro-inflammatoires. Leur absence limiterait la réaction inflammatoire et le recrutement de lymphocytes T responsables du rejet.

Les pCSPN pourraient elles-mêmes intervenir pour inhiber la réponse immune. En effet, les analyses réalisées *in vitro* montrent que ces cellules inhibent fortement la prolifération des lymphocytes T. Un ou plusieurs facteurs solubles seraient impliqués dans l'effet immunosuppresseur mais les différents inhibiteurs que nous avons utilisés ne nous ont pas permis de caractériser les molécules mises en jeu. D'autres expériences seraient à réaliser notamment pour déterminer un rôle potentiel de l'IL10, du TGF $\beta$  ou d'IDO.

Outre leur activité immunosuppressive, les pCSPN présentent des particularités d'un point de vue différenciation neuronale et activité neurotrophique. En effet, les rats greffés avec les pCSPN présentent à J8 un très faible nombre de cellules exprimant le marqueur neuronal NF70. Cette différenciation tardive est très probablement due au statut indifférencié des pCSPN au moment de leur implantation dans le cerveau. En revanche, à J63, les greffes de pCSPN sont très volumineuses avec de nombreux neurones pNF70. Cette observation suggère un environnement très favorable mais les analyses immunohistologiques ont mis en évidence un grand nombre de fibres TH<sup>+</sup> au sein du greffon sans que l'on puisse détecter de corps cellulaires immunopositifs pour cette enzyme. Cette observation associée au fait qu'un très faible nombre de pCSPN se différencie spontanément en neurones dopaminergiques *in vitro* nous a incité à contrôler l'origine des fibres TH<sup>+</sup>. Le manque de marqueurs permettant

de distinguer les neurones TH<sup>+</sup> d'origine porcine ou murine nous a conduit à léser les neurones dopaminergiques de la substance noire de rat qui sont les seuls neurones TH<sup>+</sup> innervant le striatum. L'absence de fibres TH<sup>+</sup> dans le greffon situé du côté lésé a permis de démontrer que les fibres qui innervaient les greffes de pCSPN étaient issues de l'hôte et ne résultaient pas de la différenciation des pCSPN en neurones dopaminergiques. Les facteurs responsables de cet effet neurotrophique restent à mettre en évidence mais on sait que des facteurs comme le GDNF ont des effets neurotrophiques sur les neurones dopaminergiques de la substance noire, favorisant leur survie et la poussée axonale (Lin et al., 1993 ; Rosenblad et al., 2000 ; Connor, 2001).

Les pCSPN ont donc des propriétés immunosuppressives et neurotrophiques très intéressantes pour les thérapies cellulaires dans le SNC. En effet, leur utilisation en remplacement des pNB pourrait peut-être permettre une survie à long terme de xénogreffes neurales avec un minimum d'immunosuppresseurs, et leurs propriétés neurotrophiques pourraient favoriser la survie des neurones dopaminergiques encore en vie et l'intégration du greffon dans le parenchyme de l'hôte. Un des freins majeurs à leur utilisation comme source unique de cellules est sans doute leur faible capacité à se différencier en neurones dopaminergiques. En effet, nous n'avons pas été en mesure de détecter un seul corps cellulaire TH+ dans les greffes de pCSPN alors que de nombreux neurones TH+ ont été détectés dans les greffes de pNB. Les différentes données de la littérature soulignent bien la difficulté à contrôler le phénotype des CSPN. C'est pourquoi nous avons envisagé d'utiliser les cellules souches non pas comme cellules de remplacement mais comme source de facteurs immunosuppresseurs et neurotrophiques. Pour étudier l'intérêt de cette stratégie, nous avons utilisé, non pas les pCSPN, mais des cellules souches dont les potentiels immunosuppresseurs et neurotrophiques avaient déjà été abondamment décrit, qui étaient faciles d'accès et qui permettaient de réaliser des autogreffes : les cellules souches mésenchymateuses.

### Article 3

### Advantages of mensenchymal stem cells for the long term survival of intracerebral xenotransplant

**<u>Xavier Lévèque<sup>1.2.3</sup></u>**, Elodie Mathieux<sup>1.2.3</sup>, Véronique Nerrière-Daguin<sup>1.2.3</sup>, Reynald Thinard<sup>1.2.3</sup>, Thomas Haudebourg<sup>1.2.3</sup>, Bernard Vanhove<sup>1.2.3</sup>, Laurent Lescaudron<sup>1.2.3</sup>, Isabelle Neveu<sup>1.2.3.6</sup> and Philippe Naveilhan<sup>1.2.3.6.\*</sup>.

- 1, INSERM, UMR643, Nantes, France.
- 2, CHU de Nantes, ITERT, Nantes, France.
- 3, Université de Nantes, UFR de Medicine, Nantes, France.
- 4, INRA, UMR85 INRA-CNRS-Université de TOURS-Haras Nationaux, P.R.C., Nouzilly, France
- 5, I.N.R.A., UEPAO, Nouzilly, France
- 6, equal contribution

Corresponding author: Naveilhan P., INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44 093 Nantes cedex 01, France. Tel: +33 (0)240087414; Fax: +33 (0)240087411; e-mail: Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr

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

The work was supported by the "Association Française contre les Myopathies" (AFM) and by the "Fédération des Groupements de Parkinsoniens". **CECAP. Centaure.** 

### Introduction

Les pCSPN se différencient trop peu en neurones dopaminergiques pour que leur simple implantation dans le cerveau puisse compenser la perte des neurones affectés par la maladie de Parkinson. En revanche, leurs propriétés immunosuppressives et neurotrophiques pourraient être d'un grand intérêt dans des stratégies de co-transplantation, notamment avec des pNB mésencéphaliques qui se différencient plus spontanément en neurones dopaminergiques et qui permettent des récupérations fonctionnelles (Galpern et al., 1996 ; Larsson and Widner, 2000, cf introduction générale partie 2.3). Pour une telle perspective, d'autres cellules souches comme les cellules souches mésenchymateuses pourraient être plus En effet. ces cellules qui présentent également des appropriées. propriétés immunosuppressives et neurotrophiques (pour revue, Kan et al., 2007), peuvent être prélevées chez le patient. Les cellules sont alors prélevées à partir du sternum ou de la crête iliaque. Elles sont ensuite multipliées in vitro, avant d'être réinjectées chez les patients. Différents essais ont déjà été effectués chez l'animal et chez l'Homme, pour d'autres pathologies. Ainsi, il a été montré, par exemple, que les MSC entraînaient une inhibition de la production des anticorps spécifiques de la myéline et une diminution de la perte axonale après transplantation au sein du SNC dans un modèle souris de l'EAE (Gerdoni et al., 2007). Chez l'Homme, les MSC ont démontré leur capacité immunosuppressive après greffe de moelle osseuse pour pallier à la réaction des cellules immunes du greffon contre les cellules de l'hôte (GVHD) (Le Blanc et al., 2004).

Quant à nous, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure la co-transplantation de MSC syngéniques avec des pNB dans le striatum de rat immunocompétent favorisait la survie des neurones xénogéniques. Pour ce faire, les MSC ont été isolés à partir de fémurs de rats Lewis 1A adultes, multipliées *in vitro* et co-transplantées avec des cellules isolées à partir de mésencéphale ventral d'embryons de porc G28 (Figure 26).



Figure 26 : co-transplantation de pNB et de rMSCS dans le striatum de rat adulte Lewis 1A.

Dans un premier temps, nous avons analysé la survie de la greffe et la réaction immune de l'hôte. Dans un second temps, nous avons contrôlé la fonctionnalité des co-greffes dans un modèle rat de la maladie de Parkinson.

### ADVANTAGES OF MESENCHYMAL STEM CELLS FOR THE LONG TERM SURVIVAL OF INTRACEREBRAL XENOTRANSPLANT

#### Running title: Advantages of MSC for intracerebral xenotransplant

Xavier Lévêque, Véronique Nerrière-Daguin, Reynald Thinard, Laurent Lescaudron, Isabelle Neveu\* et Philippe Naveilhan\*

\* Equal contribution

#### Affiliation

- 1, INSERM, U643, Nantes, F44000 France
- 2, CHU de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes,
- F44000 France

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

Corresponding author: Naveilhan P., INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44 093 Nantes cedex 01, France.

Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr Phone : +33 (0) 2 40 08 74 14 Fax : +33 (0) 2 40 08 74 11

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

The work was supported by the "Association Française contre les Myopathies" (AFM) and by the "Fédération des Groupements de Parkinsoniens". **CECAP. Centaure.** 

#### 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. Other cellular sources have therefore to be found. Fetal pig neuroblasts are interesting candidate 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 cyclosporineA has side effects and does not protect forever neural xenotransplants, we focused our work on local control of the host immune responses. In particular, we studied the advantage of co-transplanting syngenic mesenchymal stem cells (MSC) with porcine neuroblasts (pNb) in the striatum of immunocompetent rats. 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 six rats transplanted with both pNb and MSC exhibited healthy porcine neurons. Interestingly, 50% of the rats co-transplanted with both cell types 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 MSC and pNb in a rat model of Parkinson's disease. Taken together, the present data indicate that the immunosuppressive and the neurotrophic 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 using embryonic ventral mesencephalic tissue (EVMT) showed some beneficial effects on patients affected by Parkinson's disease but absence of effects in some patients or the development of dyskinesias in others underlined the requirement for technical improvements. Among those are the host immune response and the search for alternative source of transplantable cells. Indeed, alloimmunisation to donor antigens has been observed following the transplantation of fetal neural cells into the brain of patients affected by Huntington's Disease (Krystkowiak et al., 2007). On the other hand, the use of human fetal tissue raised ethical and logistical problems. That is the reason why we have been studying for several years the possibility of using EVMT isolated from the pig (Remy et al., 2001; Melchior et al., 2002; Michel et al., 2006). Porcine fetal neurons can restore behavioral function in models of Parkinson's disease (Galpern et al., 1996; Larsson and Widner, 2000) and clinical assays have been performed (Deacon et al., 1997; Fink et al., 2000; Schumacher et al., 2000). However, despite the particular immunologic statue of the brain, immune rejection occurred, even under conventional immunosuppressive strategies. Cell rejection is accompanied by a massive infiltration of dendritic and T cells within the brain with a Th1 profile (Melchior et al., 2002; Michel et al., 2006). Interestingly, mesenchymal stem cells (MSC) showed long term survival following their transplantation in the brain of xenogeneic host (Azizi et al., 1998; Rossignol et al., 2009a). This long term survival is not only due to the low immunogenicity of the cells but also to an active immunosuppressive activity. Indeed, MSC can inhibit maturation of dendritic cells and proliferation of T and B cells (Uccelli et al., 2007; Uccelli et al., 2008). Interestingly, transplantation of MSC in animal models of stroke or EAE revealed that these cells may have beneficial effect through their immune and trophic properties (Zappia et al., 2005). So, we thought of taking advantage of these properties to develop a local immunosuppressive strategy in the brain. In particular, we hypothesized that syngeneic MSC could protect pig mesencephalic neuroblasts from the host immune response. Our present data confirmed such a hypothesized and in the present study, we showed that MSC promote long-term survival of xenogeneic neural cells without affecting their functional properties.

#### Materials and methods

#### Culture of rat MSCs

MSCs were obtained from the bone marrow of adult LEW.1A rat. Femurs and tibias were collected by flushing femurs and tibias with alpha MEM medium (Sigma) supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. After plastic adherence selection, MSCs were split using trypsin and used at passage 4 (P4). Lewis Ia MSC culture were performed as previously described and the cells were constantly used after 4 passages in culture (Rossignol et al., 2009b).

#### pNb culture

pNb were obtained from 28 days gestation fetuses derived from adult Large White pigs. Animals were obtained from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Nouzilly, France) and sacrificed in the Institute's accredited slaughterhouse. Pieces of ventral mesencephalum were incubated in 5 mL of HBSS supplemented with 0.1 % trypsin (Sigma, France) during 15 min at 37°C. Reaction was stopped with 10 mL of medium with fetal calf serum. After incubation with HBSS DNase 0.01% (Sigma, France) cells were centrifuged and passed on a 70µm cell strainer. Cells were counted with Malassez and cultured at 2.10<sup>5</sup> cells per cm<sup>2</sup>.

For the cell grafting preparation, cells were concentrated to  $2.10^5$  cells per  $\mu$ L.

For the co-culture, pNb were cultured on a polyornithine coating cover slip at the concentration of  $2.10^5$  cells per cm<sup>2</sup> ( $6.10^5$  per cover slip). The cover slips were put on a Petri dish with a MSCs culture carpet at P4. We used loads of paraffin wax to have a physical separation between the two cell populations. We observed the neuritic network survival after 7, 11, 21 and 28 days in vitro (DIV).

#### Cell grafting

The transplantation was performed on male Lewis 1A rats of 250g weight average purchased from Janvier CERJ (Rouen, F). Anesthesia 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). Porcin neuroblasts with or without rat MSCs were transplanted unilaterally at precise coordinates from Bregma ; anterior : +0,7 mm, lateral : -2,8mm, ventral : -6mm and -5,6mm, incisor bar :

-3,3 mm. Animal received two injections of  $2.10^5$  cells using 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 and 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  $-80^{\circ}$ C. Sections of 16 µm were prepared using a cryostat (Leica) and stored at  $-80^{\circ}$ C.

For molecular analysis, brains were not perfused but directly removed from the skull. A piece of rat striatum graft was removed and directly frozen in azoth and stored at  $-80^{\circ}$ C. To confirm the survival of transplanted MSC in the rat brain, EGFP expressing MSC (fMSC) derived from GFP transgenic rats were cografted with pNb as described above and the animals were sacrificed at D35 (n=3) (Fig. S1).

#### *Immunocytochemistry*

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), and incubated for 1h at RT in PBT-DNS (1X PBS, 4% bovine serum albumine (BSA), 0,1% Triton, and 10% donkey normal serum (DNS)). The cells were subsequently exposed overnight at 4°C to primary anti-TH antibodies diluted in PBT. After washing, cells were incubated for 2h at RT with Alexa Fluor 568-conjugated anti-rabbit (Invitrogen, 1/1000) diluted in PBS. Cells were washed in PBS and mounted in an anti-fading medium (Vectashield, Vector laboratories). For analysis on an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). Pictures were acquired using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software.

#### *Immunohistochemistry*

After neutralization of endogenous peroxidase with 0.3%  $H_2O_2$  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 Tab 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). Brain sections were observed using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss).

The survival of MSC in the rat brain was confirmed by analysing the presence of GFP+ cells following the transplantation of fMSCs and pNB into the rat striatum. Immunohistochemistry using anti-GFP antibody confirmed the presence of GFP+ cells in the co-graft at D35. The cells were in majority CD90<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> as wild type MSC and provide a cresyl violet staining similar to the one observed following the transplantation of wild-type MSC into the rat striatum. Such staining was not observed following the transplantation of pNb alone.

#### Total RNA preparation and Q-PCR analysis

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<sup>™</sup> 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, TGFb1, IL6, IFNg, CD11b, GFAP NGF, BNDF) 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  quantification method, after normalization to HPRT values, have been previously described<sup>1</sup>. 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 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  where  $\Delta\Delta Ct$  = ( $Ct_{Target} - Ct_{HPRT}$ )<sub>sample</sub> - ( $Ct_{Target} - Ct_{HPRT}$ )<sub>CB</sub>. Specific amplifications were checked by amplicon melting curves.

#### 6-OHDA lesion

Rats received an unilateral injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the medial forebrain bundle (MFB). After anesthetized with intramuscular injection of Rompun/ketamine (1 mL/kg), the rats were placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL). 6-OHDA was dissolved in 0.02% ascorbate saline at a concentration of  $3\mu g/\mu L$  and was unilaterally injected ( $1\mu g/min$ ) at the following coordinates (in mm relative to bregma and the surface of the dura mater): anterior: -4.4; lateral: -1.2; ventral: -7.8; tooth set bar: -3.

Two weeks after lesion surgery rats were selectionned with amphetamine-induced rotation (0.05 mg/kg). Rats who present more than 100 contralateral rotations during 45 min present approximatively 90% of dopaminergic loss in the lesion side. Four experimental groups (n=6) will be constituted 1) non transplanted, or transplanted 2) with pig neuroblasts 3) LEW 1A MSC 4) MSC plus pig neuroblast. The recovery will be followed using the Cylinder test (Schallert et al., 2000) every 15 days. Briefly, rats were placed into a glass cylinder, and the number of supportive wall contacts executed independently with the left and right forepaw was counted for each rat. 20 contacts were counted. Data are presented as scores of limb-use asymmetry.

#### T cell proliferation

Briefly, Spleen cells were prepared from Sprague-Dawley rats. Polyclonally stimulated splenocytes ( $10^5$ ) and increasing number of MSCs were seeded in triplicate in 96-well flatbottom culture plates and were cocultured for 3 days in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 10% heat-inactivated FCS, 1% non essential amino acids, 5 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 1  $\mu$ M 2-ME. For polyclonal stimulation, T cells were stimulated with 2.6  $\mu$ g/ml anti-CD28 antibody and 0.5  $\mu$ g/ml anti-CD3 in flat-bottom 96-well plates . Proliferation was measured by addition of 0.625  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]thymidine (Amersham) per well for the 16 last hours. Cells were harvested on fiberglass filters using a harvester (Tomtech) and radioactivity was measured by standard scintillation technique.

#### Cylinder test

Forelimb asymmetry was measured using the cylinder test. The rat was placed into a clear cylinder and the number of times it touched the side walls with either its ipsilateral or contralateral paw was counted. The use of the contralateral (left) forepaw is expressed as percentage of the total use of both paws.

#### Results

## MSCs isolated from the bone marrow of Lewis 1A rats exhibit immunosuppressive and neurotrophic activities in vitro.

Flow cytometry analysis indicated that MSCs isolated from the bone marrow of Lewis 1A rats and expanded in vitro, expressed CD90 (Thy1) and were negative for the haematopoietic marker, CD45 (Fig. 1A). Their immunoregulatory functions were examined in vitro using activated splenocytes cells. As shown in the figure 1B, MSCs inhibited the proliferation of anti-CD3, anti-CD28 activated splenocytes in a dose-dependent way. A 50 % and 90 % decrease in thymidine uptake was observed for ratios of one MSC for 10 or 5 splenocytes, respectively. RT-PCR analyses revealed an expression of immunoregulatory molecules such as IL6, IL12, and TGFB1 (Fig. 1C). This pattern of expression is similar to the one observed in MSCs isolated from the bone marrow of Sprague-Dawley rats (Rossignol et al., 2009b) except for IL10 which transcript was not detected (Fig. 1C). Besides this immunosuppressive effect, rMSC exhibit neurotrophic effects as illustrated by the fact that they promoted the survival of cultured mesencephalic neuroblasts derived from porcine embryos (pNb). Indeed, pNb plated without MSCs exhibited signs of degeneration from 7 days in vitro and most cells died before day 11. In contrast, pNbm plated with MSC survived up to 28 days (data not shown). To further analyse the neurotrophic activity of rMSC, TH immunostaining was performed at day 11. The results show an increased survival of dopaminergic neurons in presence of MSC since 1 TH<sup>+</sup> cells per square millimeters was found in pNb cultures whereas 6.7 TH<sup>+</sup> cells per square millimeters was determinated in pNb/rMSCs co-cultures (Fig. 1D, E).

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

The immunosuppressive and neurotrophic activities of MSCs derived from the bone marrow of Lewis 1a rats prompted us to test their efficiency to promote the survival of intracerebral xenotransplant. For this purpose, pNb were transplanted into the striatum of Lewis 1A rat without or with rMSCs. Survival of the graft was analysed at 28, 35, 42, 63 and 120 days post-transplantation with a minimum of 5 rats for each time-point.

In absence of MSCs or of any other immunosuppressors, pNb graft underwent cell rejection within 63 days. At early stages such as D28, the grafts are homogeneous with delineated outlines (healthy grafts; Fig.2A). At intermediate stages such as D35 or D42, the transplants are often heterogeneous with undefined outlines (rejecting graft, Fig.2B). At later stages such as D63, there is no more graft and only a scar could be observed (rejected graft, Fig.2C). In the presence of MSCs, all the grafts looked healthy up to D35 (Table3). Infiltration of the graft by immune cells was only observed from D42 (Table 3) and interestingly, 50% of the rats transplanted with both rMSCs and pNb exhibited healthy grafts at D120 (Fig 2D, Table 1). To further analyse the grafts, immunohistochemistry was performed with an antibody that specifically recognised the porcine neurofilament 70KDa subunit. In the rat transplanted only with pNb, all the transplants exhibited NF70<sup>+</sup> cells at D28 (Fig. 3A and B). In contrast, no NF70<sup>+</sup> cells were detected in any of the co-transplants at D28 (Fig. 3C). NF70<sup>+</sup> cells appeared in healthy co-transplants at D35 but only in 2 out of 6. This percentage increased with time reaching 100% from D42 (Fig. 3A). Interestingly, TH<sup>+</sup> cells were detected in all the grafts as soon as they became immunopositive for NF70. Indeed, TH<sup>+</sup> cells were found in all the pNb grafts at D28. In rats co-transplanted with MSCs and pNb, TH<sup>+</sup> cells were detected from D35 but only in the two animals immunopositive for NF70. At D63 and D120, all the healthy co-transplant exhibited clear NF70<sup>+</sup> immunostaining and showed  $TH^+$  cells (Fig. 3 D-G).

#### Characterization of the cellular host immune response

To characterise the cellular immune response, immunohistochemistry was performed using antibodies directed against activated microglial cells/macrophage (Ox42) and T cells (R73). As previously described, the transplantation of pNb into the striatum of an 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 (Table 3). In the rats co-grafted with MSC, infiltration of the graft by T cells (Fig 3I) was never observed before D42 (Table 3) and at D120, 50% of them exhibited healthy grafts without T cells.

To evaluate the impact of MSC on the expression of inflammatory cytokines, another group of rats were transplanted with pNb alone or with MSC and pNb. Their striatum were collected at D28, D35, D42 or D63 days for RNA analyses. Seven or eight animals were sacrificed for

each time-point in a given group. Striata from six naïve rats were used to determine the basal levels (controls). We first analysed the expression of C $\beta$  and CD11b as marker of T cell infiltration and microglial cell activation, respectively (Fig. 4). In rats transplanted with pNb, a 6-fold and 3-fold increase in the levels of C $\beta$  and CD11b mRNA was observed at D35, respectively, as compared to the basal levels in naïve rats. At later stages such as D42 or D63, C $\beta$  and CD11b mRNAs were returned to basal levels. In contrast, we did not observe significant increase in the levels of C $\beta$  and CD11b in the rats transplanted with both MSC and pNbm 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 $\beta$ . 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 MSC and pNb, 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 5). 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 CB and CD11b. We also found at D28 an upregulation of the pro-inflammatory cytokines INFy and IL-6 which preceded the upregulation at D35 of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGFB. The levels of IFNy remained high up to D42 and then, strongly decreased whereas IL-6 returned to basal level before a second upregulation at D63. A high level of IL-10 was also observed from D35 to D63 whereas the TGF $\beta$  returned to basal level as soon as D42. Interestingly, we did not observe any of these regulations in the rat that received both MSC and pNb. Indeed, 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 naïve animals at any of the time point determined. To further characterize the immunomodulatory mechanism triggered by rMSCs 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 5, both enzymes mRNAs were upregulated in the brain of rat grafted with pNb. However, HO1 expression was upregulated between D28 and 42 whereas the levels of iNOS was significantly increased from D35 up to D63. Again, the upregulation of HO1 was blunted in rats co-grafted with MSC and pNb but interestingly, we observed a significant upregulation of iNOS at D35 that persisted up to D63.
#### **Characterization of BDNF and GDNF expression**

Besides the immunosuppressive effect, MSC may favour the long-term survival of pNb by providing neurotrophic factors. To explore this possibility, we analysed the regulation of GDNF and BDNF (Fig. 6). Q-PCR analyses revealed an upregulation of both neurotrophic factors at D35 and D42 in the rats transplanted with pNb but a stronger increase was observed in the group grafted with both MSC and pNb. Indeed, a 18-fold increase in the level of GDNF was observed for the GDNF at D42 in the co-grafts whereas the induction was only of 8.5 in pNb grafts. Similarly, a 16-fold increase in the levels of BDNF was observed at D63 in the co-graft whereas no significant upregulation of this neurotrophic factor was detected at this stage in the pNb grafts.

### Effect of cografting on 6-OH-DA

To evaluate the beneficial impact of MSC: pNb co-transplant in rat models of Parkinson, a set of rats were lesioned with unilateral injection of 6-OH DA and selected rats were grafted with pNb alone, MSC alone, pNb + MSC or vehicle. Behavioural improvement was followed using the cylinder test. As shown in the figure 7A, no behavioural improvement was observed following the transplantation of MSC or pNb in the striatum of lesioned immunocompetent rats. In contrast, clear signs of recovery were observed at D90 and D105 in the group of rats that received both MSC and pNb. This beneficial was not significant any more at D120 if all the rats were included in the statistical analyses. However, immunohistochemical analyses revealed that only 50 % of the animals transplanted with MSC/pNb exhibited healthy grafts at D120. At the end of the experiment, this parameter was included in the interpretation of the behavioral tests (Fig. 7B). In fact, the animals that exhibited healthy graft were those that presented better 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).

Résultats

#### Discussion

Our present paper provide the first evidence that cotransplantation of syngeneic MSC with xenogeneic neuroblasts promotes long term survival of xenografted neurons and allows motor recoveries in a rat model of Parkinson's disease. Behavioural 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 (Huffaker et al., 1989; Galpern et al., 1996; Larsson et al., 2000). Here, we show that pNb co-transplanted with rMSCs can survive up to 120 days without systemic immunosuppression. Such long survival is probably due, at least in part, to the immunosuppressive effect of MSC since the cells have been described as being potent immunosuppressors, acting at different levels of the immune response (Uccelli et al., 2007; Uccelli et al., 2008). For instance, MSC alter the maturation of the dendritic cells and their ability to present antigens to T cells, which is a key point of their activation (Maccario et al., 2005). MSC are also able to inhibit T cell proliferation and affect the differentiation of B cells into plasmocytes (Corcione et al., 2006). The exact mechanism leading to the long term survival of pNb in the rat brain remains to be determined, but interestingly, we show that the presence of MSC inhibits at least partially, numerous cellular and molecular events usually induced by the implantation of pNb in the rat brain. Indeed, the accumulation of GFAP mRNAs that precede 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 $\beta$  and CD11b at the analysed 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 antiinflammatory molecules such as TGF<sup>β</sup>1 or IL10. 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, IFNy, IL-6, IL-10, TGF<sup>β</sup> or HO-1 remained at the basal levels in the striatum of rats grafted with both MSC and pNb in contrast to their upregulation around D35 in the brain of pNb-grafted rats. Only one molecule was upregulated in both groups: iNOS. This molecule might be implicated in the immunosuppressive effects of MSC through the production of NO. Indeed, Ren et al., revealed a major role of iNOS in the immunosuppressive properties of mouse MSC (Ren et al., 2008) and exacerbation of EAE inflammatory response has been observed in mouse deficient for iNOS(Fenyk-Melody et al., 1998). Its mechanism of action remained to be fully determined but NO was reported as a potent inhibitor of T cell proliferation (Albina et al., 1991; Krenger et al., 1996) and leukocyte adhesion on the endothelial cell layer (Kubes et al., 1994). A local overexpression of iNOS by MSC in the co-graft might therefore favor the long term survival of intracerebral xenograft but other molecules that NO are most probably implicated since the high expression of iNOS in the striatum of pNb grafted animals did not prevent the rejection of xenogenic neurons. To this regard, it is important to note that different molecules mediate the immunosuppressive effect of MSC according to the species (Ren et al., 2009). So, further studies will be required to fully characterize the mechanisms by which MSC promote the long-term survival of xenografted pNb.

Interestingly, we show that the graft of MSC with pNb does not alter their restorative function since motor recovery was observed in rat model of Parkinson diseases. The high level of BDNF in the co-graft at D63 may contribute to this restorative effect but other parameters should be implicated since the implantation of 100 000 MSC into the striatum of lesioned rats did not promote motor recovery. The number of MSC might be insufficient to get a behavioral recovery through the secretion of neurotrophic factors by MSC as suggested by Bouchez in 6-OHDA rat model (Bouchez et al., 2008). However, the long-term survival of xenogenic TH+ cells and the motor recovery observed in our experimental model suggest that the implantation of 100 000 MSC with 300 000 pNb might be a good basis to develop new restaurative strategies with high efficiency and low detrimental secondary effects. Characterization of the mechanisms by which MSC contribute to motor recoveries in immunocompetent rats should be of great help to optimize such strategies. On the other hand, it would be interesting to test MSC-pNb co-graft with very low doses of classic immunosuppressors such as cyclosporine A.

### References

- Albina JE, Abate JA, Henry WL, 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 147:144-148.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ (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.
- Bouchez G, Sensebe L, Vourc'h P, Garreau L, Bodard S, Rico A, Guilloteau D, Charbord P, Besnard JC, 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.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood 107:367-372.
- Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P, Isacson O (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. Nat Med 3:350-353.
- Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, Weidner JR, Shen F, Shelton BA, Mudgett JS (1998) Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. J Immunol 160:2940-2946.
- Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. Cell Transplant 9:273-278.
- Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, 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.
- Huffaker TK, Boss BD, Morgan AS, Neff NT, Strecker RE, Spence MS, Miao R (1989) Xenografting of fetal pig ventral mesencephalon corrects motor asymmetry in the rat model of Parkinson's disease. Exp Brain Res 77:329-336.
- Krenger W, Falzarano G, Delmonte J, Jr., Snyder KM, Byon JC, Ferrara JL (1996) Interferongamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. Blood 88:1113-1121.
- Krystkowiak P, Gaura V, Labalette M, Rialland A, Remy P, Peschanski M, Bachoud-Levi AC (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, Kurose I, Granger DN (1994) NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. Am J Physiol 267:H931-937.

Larsson LC, Widner H (2000) Neural tissue xenografting. Scand J Immunol 52:249-256.

Larsson LC, Czech KA, Brundin P, Widner H (2000) Intrastriatal ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. Cell Transplant 9:261-272.

- Maccario R, Moretta A, Cometa A, Montagna D, Comoli P, Locatelli F, Podesta M, Frassoni F (2005) Human mesenchymal stem cells and cyclosporin a exert a synergistic suppressive effect on in vitro activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes. Biol Blood Marrow Transplant 11:1031-1032.
- Melchior B, Remy S, Nerriere-Daguin V, Heslan JM, Soulillou JP, 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.
- Michel DC, Nerriere-Daguin V, Josien R, Brachet P, Naveilhan P, Neveu I (2006) Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. Exp Neurol 202:76-84.
- Remy S, Canova C, Daguin-Nerriere V, Martin C, Melchior B, Neveu I, Charreau B, Soulillou JP, 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 AI, Zhao RC, 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 AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y (2009) Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. Stem Cells 27:1954-1962.
- Rossignol J, Boyer C, Thinard R, Remy S, Dugast AS, Dubayle D, Dey ND, Boeffard F, Delecrin J, Heymann D, Vanhove B, Anegon I, Naveilhan P, Dunbar GL, Lescaudron L (2009a) Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo and xenotransplantation. J Cell Mol Med:In Press.
- Rossignol J, Boyer C, Thinard R, Remy S, Dugast AS, Dubayle D, Dey ND, Boeffard F, Delecrin J, Heymann D, Vanhove B, Anegon I, Naveilhan P, Dunbar GL, Lescaudron L (2009b) Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. J Cell Mol Med 13:2547-2558.
- Schumacher JM, Ellias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, Fischman AJ, Thomas C, Feldman RG, Kassissieh S, Raineri R, Manhart C, Penney D, Fink JS, Isacson O (2000) Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. Neurology 54:1042-1050.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L (2007) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? Trends Immunol 28:219-226.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol 8:726-736.
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood 106:1755-1761.

Specificity	Host	Clone	Dilution	Target cells	Origin	
Ox42	Mouse	Ox42	Supernatant	Macrophages,	1	
				microglial cells		
NF70	Mouse	DP5	10 µg/ml	Pig neurons	2	
TCR	Mouse	TCR	Supernatant	T cells	1	
TH	Rabbit	polyclonal	0.1 µg/ml	Dopaminergic	3	
				neurons		
Mouse IgG	Goat	polyclonal	1.5 μg/ml		4	
(FITC)						
Mouse IgG	Horse	polyclonal	1 µg/ml		4	
(Biot)						
Rabbit IgG	Donkey	polyclonal	3 µg∕ml		4	
(FITC)						
Rabbit IgG	Goat	polyclonal	2.2 µg/ml		4	
(Biot)						

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

Primers	Sequence			
	Up CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC			
rHPRT	Lo TTCGCTGATGACACAAACATGA			
rCb	Lo CACTGATGTTCTGTGTGACAGGTT			
CD111				
CDIIb	L0 IGUGACAGACACIIGAGAGGII			
	Up CTAGCCCTGG ACATCGAGAT C			
rGFAP	Lo TCCTGCTTCG ACTCCTTAAT GA			
MCP1(2)				
	Un GCATCCCTCACCGTCATCCT			
rRANTES				
	Un TGGATGCTATGGAAGGAAAGA			
IFNg	Lo GATTCTGGTGACAGCTGGTG			
rIL6				
	LU CATCATCULIUTICATACAATCA			
rIL10				
rTGFb				
rHO-1				
riNOS				
DDNE				
rbdnf	LOGIIGIGGIIIGIIGCCGIIGCCAAGAA			
	Up ACTCCAATATGCCCGAAGATTATCCTG			
rGDNF	Lo CCAAACCCAAGTCAGTGACATTTAATGG			

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
NF70orCV <sup>+</sup> /R7.3 <sup>-</sup>	4	5	1	6	2	1	0	2	3
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>+/-</sup>	1	0	3	0	0	2	0	1	0
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>+</sup>	1	0	1	0	2	0	0	1	0
NF70 <sup>-</sup> /R7.3 <sup>+</sup>	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 plus MSC. Rejection of the graft was determined by analyzing T cell infiltration (R73+) and the disappearance of the porcine neurons (NF70-) at Days 8, 28, 42 and 63 post-transplantation. Each rat was classified as NF70+/ R73-, NF70+/ R73+/-, NF70+/ R73+, NF70-/ R73+ or scar. R73+/- corresponds to a brain with 1-10 T cells per section.





(A) Representative results from flow cytometric analysis of CD45 and CD90 expression in Lew1a MSCs (B) Inhibition of T cell proliferation by rMSCs.  $1 \times 10^5$  allogenic T cells activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies were cultivated with increasing ratios of irradiated MSCs for 3 days. T cell proliferation was assessed by quantification of thymidine incorporation during the 12 last hours (n=3) (C) Expression of immunoregulatory molecules by rMSCs. Total RNAs were prepared from rMSC after 4 passages (n=3). Expression of IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL13, IL16, IL17 $\alpha$ , IP10, TGFb1, IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ 1 and MIG was analysed by RT-PCR. Representative results of three independent analyses are presented. (D, E) Impact of rMSCs on the survival of TH<sup>+</sup> porcine neurons. Porcine neuroblasts were cultured for 11 days in presence (+) or absence (-) of rMSCs and immunocytochemistry were performed using anti-TH antibody. (D) Representative immunocytochemistry analyses. Scale Bar: 40  $\mu$ M. (E) The number of TH+ cells per square

graph was determinated for each condition. Data are representative of three independent experiments. Mean value +/- SEM are presented. (Unpaired t-test, \*\*\* P<0.001).



#### Figure 2. Histological analyses of the xenotransplants.

(A-F). Micrographs illustrating the different status of the grafts following the transplantation of pNb in the rat striatum without (A-C) or with (D-F) MSCs. Cresyl violet staining revealed three main stages: healthy graft (A, D), graft undergoing rejection (B, E) and scar (C, F). Observation in light microscopy. Scale Bar: 200 µm..





(A) Numbers of rats displaying NF70 negative healthy graft (white bar), NF70 positive graft (black bar), and rejected (grey bar). (**B-G**) Representative micrograph of a healthy graft following the transplantation of pNb alone (B) or in presence of MSCs (C-G). At D28, a strong NF70 immunostaining was observed in pNb graft (B) whereas no NF70<sup>+</sup> cell was observed in the co-grafts (C). At later stages such as D63 (E,D) and D120 (F,G), the co-grafts

Résultats

were strongly immunopositive for NF70 (D,F) and exhibited  $TH^+$  cells (E,G). (H,I) Representative micrograph of a MSC-pNb co-graft undergoing rejection. The grafts are immunostained with OX42 (H) or R73 (I). Scale Bars: B-G, 50 µm; H-I, 150; insert, 25 µm.



**Figure 4**: Relative expression of C $\beta$ , CD11b and GFAP mRNAs in grafted animals. Total RNAs from grafted Striatum with pNb (- MSC) or pNb + MSC (+MSC) were collected at D 28, 35, 42, 63 (n = 7/8 per groups per days) or not grafted (D0, n=6) and submitted to Q-PCR.. Mean value +/- SEM are presented. (ANOVA test, \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001)



**Figure 5**: Relative expression of chemokines and cytokines, HO1 and iNOS mRNAs in grafted animals. Total RNAs from grafted Striatum with pNb (- MSC) or pNb + MSC (+MSC) were collected at D 28, 35, 42, 63 or not grafted (D0, n=6) and submitted to Q-PCR. n = 7/8 per groups per days. Mean value +/- SEM are presented. (ANOVA test, \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001)



**Figure 6:** Relative expression of BDNF and GDNF mRNAs in grafted animals. Total RNAs from grafted Striatum with pNb (- MSC) or pNb + MSC (+MSC) were collected at D 28, 35, 42, 63 or not grafted (D0, n=6) and submitted to Q-PCR. n = 7/8 per groups per days. Mean value +/- SEM are presented. (ANOVA test, \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001)



**Figure 7**: **A**-Behavioural evaluation overtime of 6OHDA lesionned animal. Unilaterally 6OH DA lesioned animals were transplanted with MSC, pNb, pNb+MSC or vehicle (Control) and cylinder test was performed every 15 days. Mean value +/- SEM, ANOVA test, \*\*P<0.01). **B**-Cylinder test Score was studied at 120 days post transplantation in function of the presence (Graft, n=3) or absence (Scar, n=5) of NF70<sup>+</sup>TH<sup>+</sup> graft and compared to vehicle group (Crtl, n=8).



**Figure S1: A-B** Characterisation of the MSC derived from EGFP transgenic rats. Expression of GFP together with CD90 (A) and CD45 (B) was analysed by flow cytometry. **C-D** NF70 (pink) and GFP immunostaining (brown) at D35 post transplantation Scale bar : C, 50  $\mu$ m; D, 10  $\mu$ m.

## Discussion

Notre étude constitue la première évidence d'un intérêt des MSCs comme immunosuppresseur local pour prévenir le rejet de xénogreffes intracérébrales. Alors qu'une greffe de pNB dans le cerveau d'un rat immunocompétent est systématiquement rejetée avant 63 jours, une co-greffe avec des MSCs syngéniques prolonge de façon significative la survie du greffon. Ainsi, 80% et 50% des animaux co-greffés présentent respectivement encore un greffon à 63 et 120 jours post-greffe.

Les analyses ont révélé une faible réponse immune chez les rats co-greffés avec des MSCs et des pNB. En effet, chez certains animaux greffés avec des pNB, les premiers signes de rejet peuvent apparaître dès J28. Ces signes sont une accumulation de transcrits GFAP pouvant être le témoin d'une astrogliose sur le site d'implantation, la production de cytokines proinflammatoires (IFN $\gamma$ , IL-6) et une infiltration du greffon par des cellules microgliales activées et des lymphocytes T. La présence des MSCs au sein des co-greffes a pour effet d'inhiber au moins en partie, l'ensemble de ces phénomènes.

Les MSCs présentent des propriétés immunosuppressives pouvant intervenir à différents niveaux de la réaction immunitaire. En premier lieu, elles sont capables d'altérer le recrutement des lymphocytes T en inhibant la maturation, la présentation antigéniques et l'expression de molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) par les CPA professionnelles comme les cellules dendritiques (Maccario et al., 2005b, Beyth et al., 2005; Aggarwal et al., 2005). D'autre part, les MSCs peuvent intervenir directement sur les lymphocytes T en inhibant leur prolifération (Di Nicola et al., 2002; Bartholomew et al., 2002). Les études in vitro suggéraient un rôle majeur de molécules immunosuppressives produites par les MSC (Meisel et al., 2004 ; Aggarwal and Pittenger, 2005 ; Kampera et al., 2006; Ryan et al., 2007; Ren et al., 2008) mais les analyses réalisées par Q-PCR sur des biopsies intrastriatales ont révélé une inhibition très globale de la transcription des chimiokines et des cytokines qu'elles soient pro- ou anti-inflammatoires. Une analyse avec d'autres molécules immunorégulatrices permettrait de conforter cette observation mais déjà, l'absence d'induction de 7 cytokines/chimiokines suggère un mécanisme d'action assez puissant intervenant sur de multiples voies de régulation. La forte expression d'iNOS dans les co-greffes ouvre la possibilité d'une intervention des MSCs via la production de NO. NO est en effet reconnu comme un intermédiaire immunorégulateur. Il interviendrait notamment en inhibant la prolifération des cellules T (Albina et Henry, 1991 ; Krenger et al., 1996) ainsi que

l'adhésion des leucocytes à la surface de la membrane endothéliale de la BHE, mécanismes indispensable à l'extravasation des lymphocytes au sein du parenchyme cérébrale (Kubes et al., 1994). De plus amples études seraient nécessaires pour déterminer l'étendue de son action mais il apparait peu probable que NO soient la seule molécule immunosuppressive impliquée dans l'effet des MSCs étant donné qu'une forte expression d'iNOS a également été observée dans les greffes de pNB. Dès lors, il serait intéressant d'étudier l'expression d'autres molécules immunosuppressives comme, par exemple, la prostaglandine E2 mais en privilégiant les études *in vivo*.

Un autre point essentiel apporté par notre étude est la fonctionnalité du greffon. En effet, non seulement, une partie des greffons survivent bien au-delà de 63 jours mais ces greffons sont fonctionnels et permettent une restauration motrice en l'absence de tout traitement immunosuppresseur conventionnel. Ce point est important car à ce jour, les seules améliorations comportementales observées avec des xénogreffes intracérébrales ont toujours été réalisées avec une administration systémique d'immunosuppresseurs (Galpern et al., 1996; Larsson et al., 2000). Cette récupération motrice à J90 et J105 semble transitoire mais les analyses complémentaires suggèrent que les faibles scores enregistrés à J120 seraient dus à la perte du greffon chez certains animaux. L'utilisation des MSCs comme agent immunosuppresseur est donc à optimiser mais les récupérations fonctionnelles et la présence de nombreux neurones porcins et de cellules TH+ dans le greffon 120 jours après la transplantation suggèrent que la stratégie de co-transplantation est intéressante comme immunosuppression locale et sans effet secondaire majeur au moins à court terme. Son développement pourrait notamment permettre de restreindre l'administration systémique d'immunosuppresseur comme la cyclosporine A.

## **Discussion générale**

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à développer différentes stratégies immunosuppressives dans l'espoir d'assurer une survie à long terme de neurones après leur implantation dans le cerveau d'un hôte xénogénique. En effet, même si le SNC est un site relativement protégé d'un point de vue immunologique, les xénogreffes et même certaines allogreffes sont rejetées quelques semaines après transplantation de cellules neurales. Les traitements immunosuppresseurs conventionnels comme l'administration de cyclosporine A préviennent à moyen terme le rejet mais ces traitements sont lourds et responsables d'effets secondaires délétères notamment sur la fonction rénale (pour revue, Hirose and Vincenti, 2006). La survie de neurones porcins 63 jours après leur transplantation dans le striatum de rats traités par la minocycline ouvre la possibilité d'utiliser ce dérivé de la tétracycline pour prévenir le rejet de greffe intracérébrale, même si le rejet observé chez certains animaux préconise une optimisation de son utilisation soit en effectuant des études dose-réponses, soit en l'associant à d'autres stratégies immunosuppressives. Parmi ces autres stratégies immunosuppressives se développent l'utilisation de cellules souches. En effet, outre l'intérêt préventif que revêt leur utilisation de par leur faible immunogénicité, des cellules souches comme les cellules souches/progéniteurs neurales (CSPN) et les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ont des propriétés immunosuppressives fortes intéressantes pour assurer une immunosuppression au niveau local. En effet, les pCSPN inhibe la prolifération des lymphocytes et une très faible réponse immune a été observée suite à leur implantation dans le cerveau de rat mais leur faible différenciation en neurones dopaminergiques, nous a incité à étudier une autre stratégie : la co-transplantation de pNB avec des MSCs. En effet, les propriétés immunosuppressives des MSC ont fait l'objet de nombreux articles et elles sont beaucoup utilisées dans des essais cliniques et pré-cliniques (Cf introduction générale chapitre 6.6). La survie jusqu'à 120 jours de neurones xénogéniques greffés en présence de rMSCs confirme l'intérêt des MSCs pour les thérapies cellulaires et l'utilité des co-greffes pour assurer une immunosuppression locale, même s'il reste à déterminer si cette survie à longterme résulte d'un mécanisme de tolérance induit chez certains animaux, d'une réelle immunosuppression induite par les MSCs ou d'un simple retard du rejet.

Outre leur intérêt immunosuppresseur, les cellules souches ont des propriétés neurotrophiques susceptibles d'être d'un très grand intérêt pour les greffes intracérébrales. En

effet, la greffe de pCSPN dans le striatum de rat stimule de façon spectaculaire la poussée neuritique des neurones dopaminergiques, entrainant une forte innervation du greffon par les fibres TH<sup>+</sup> en provenance de la substance noire. Selon de nombreuses études, les MSCs seraient également capables de produire des facteurs neurotrophiques.

Des expérimentations menées chez des rats ont même montré une augmentation de la survie neuronale et une régénération des fibres nerveuses au sein des sites lésés après implantation de MSCs dans des modèles de lésions de la moelle épinière (Ohta et al., 2004), d'ischémie cérébrale (Chen et al., 2003 ; Li et al., 2002) et de traumatismes craniens (Mahmood et al., 2004). Il a même été montré qu'une injection intraveineuse de 3 millions de MSCs était capable de stimuler la neurogenèse et la synaptogenèse dans un modèle rat d'accident vasculaire cérébral (Chopp and Li., 2002). Selon les auteurs, la synthèse et le relargage de facteurs neurotrophiques par les MSC transplantés et/ou la stimulation de leur production par les cellules de l'hôte seraient à la base des effets restaurateurs observés, mais à ce jour, aucune étude n'a clairement mis en évidence in vivo, la synthèse d'un facteur neurotrophique particulier. Dans le cadre de notre étude, nous avons recherché un facteur neurotrophique susceptible d'assurer la survie et la différenciation des neurones dopaminergiques. Nous nous sommes donc intéressés au GDNF et au BDNF, deux facteurs connus pour favoriser la survie et la poussée neuronale des neurones dopaminergiques (Hyman et al., 1991; Hyman et al., 1994; Lin et al., 1993; Bjorklund et al., 1997). Chez les animaux greffés avec des pNBm, une expression du GDNF et du BDNF a clairement été observée entre J35 et J42, à un stade où les neurones sont déjà bien différenciés et où une grande partie des greffons commence à être rejetés. Une expression comparable est observée chez les animaux co-greffés avec des MSCs et des pNB mais l'expression du GDNF est beaucoup plus forte à J42 et l'expression du BDNF perdure et augmente jusqu'à J63. La forte expression du BDNF à J63 pourrait expliquer la bonne survie des neurones greffés mais elle semble tout à fait insuffisante pour induire une innervation du greffon par les neurones dopaminergiques. Le faible nombre de MSCs transplantées (100 000) comparativement à d'autres études (Bouchez et al, 2008) pourrait expliquer ce faible effet neurotrophique. En effet, la nécessité de transformer les MSCs pour surexprimer le BDNF et assurer une neuroprotection et le guidage de la pousse axonale après lésion de la moelle épinière (Sasaki et al., 2009) suggère que la production de ce facteur par les MSCs peut être insuffisante. Dès lors, l'efficacité des pCSPN à stimuler la pousse axonale des neurones dopaminergiques devient d'autant plus intéressante et la caractérisation des facteurs impliqués dans cet effet neurotrophique serait fort utile.

Enfin, il est nécessaire de souligner que si le travail présenté a essentiellement porté sur la réponse cellulaire T, des analyses *in vitro* ont révélé une immunoréactivité importante des sérums prélevés sur de rats greffés contre les cellules neurales porcines. Aussi, une étude est actuellement en cours pour étudier la réponse humorale et notamment, caractériser les épitopes cibles des anticorps néoformés.

Notre étude a révélé de nombreuses possibilités en terme d'immunosuppression même si les stratégies demandent à être amélioré. Des études complémentaires sur les mécanismes mis en jeux par les MSCs, les NSPC ou la minocycline pour inhiber la réponse immune de l'hôte devrait permettre de développer de nouvelles stratégies d'immunosuppression adaptées au SNC. A ce propos, il est intéressant de souligner qu'une multithérapie est souvent utilisée pour prévenir le rejet de greffes périphériques. Les nouvelles stratégies proposées pourraient être utilisées en complément de traitements immunosuppressifs plus conventionnels, permettant de limiter les doses administrées et les effets secondaires.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## -A-

Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. Circ. Res. 2004 Oct 1;95(7):671-676.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005 Fév 15;105(4):1815-1822.

Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology. Lancet. 1991 Jun 1;337(8753):1321-1324.

Agid Y, Ruberg M, Javoy-Agid F, Hirsch E, Raisman-Vozari R, Vyas S, et al. Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease? Adv Neurol. 1993;60:148-164.

Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, et al. Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. Circulation. 2004 Mar 23;109(11):1401-1407.

Albertini A, Toscani M, Pezzoli G, Lucius R, Wilms H, Sulzer D, et al. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. Pigment Cell Res. 2004 Déc;17(6):610-617.

Albina JE, Henry WL. Suppression of lymphocyte proliferation through the nitric oxide synthesizing pathway. J. Surg. Res. 1991 Avr;50(4):403-409.

Aloisi F. Immune function of microglia. Glia. 2001 Nov;36(2):165-179.

Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. Arthritis Rheum. 2004 Mai;50(5):1522-1532.

Altman J, Das GD. Post-natal origin of microneurones in the rat brain. Nature. 1965 Aoû 28;207(5000):953-956.

Amaducci L, Forno KI, Eng LF. Glial fibrillary acidic protein in cryogenic lesions of the rat brain. Neurosci. Lett. 1981 Jan 1;21(1):27-32.

Anastassiou, E.D., Paliogianni, F., Balow, J.P., Yamada, H. & Boumpas, D.T. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R alpha gene expression at multiple levels. *J. Immunol* **148**, 2845-2852 (1992).

Annunziato F, Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, et al. Role for interferongamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006 Fév;24(2):386-398.

Aquino DA, Chiu FC, Brosnan CF, Norton WT. Glial fibrillary acidic protein increases in the spinal cord of Lewis rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurochem. 1988 Oct;51(4):1085-1096.

Armstrong RJE, Hurelbrink CB, Tyers P, Ratcliffe EL, Richards A, Dunnett SB, et al. The potential for circuit reconstruction by expanded neural precursor cells explored through porcine xenografts in a rat model of Parkinson's disease. Exp. Neurol. 2002 Mai;175(1):98-111.

Arvieux J, Yssel H, Colomb MG. Antigen-bound C3b and C4b enhance antigen-presenting cell function in activation of human T-cell clones. Immunology. 1988 Oct;65(2):229-235.

Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, et al. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. Ann. Neurol. 2006 Aoû;60(2):197-203.

Aschner M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. Toxicol. Lett. 1998 Déc 28;102-103:283-287.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur. J. Immunol. 2005 Mai;35(5):1482-1490.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2007 Avr;56(4):1175-1186.

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. 1998 Mar 31;95(7):3908-3913.

#### -B-

Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutsson E, Mårtensson A, Sedvall G, et al. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. J. Neurosurg. 1985 Fév;62(2):169-173.

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J. Cell. Biochem. 2003 Aoû 15;89(6):1235-1249.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. Nature. 1998 Avr 9;392(6676):565-568.

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. J. Intern. Med. 2001 Aoû;250(2):91-104.

Barker RA, Dunnett SB, Faissner A, Fawcett JW. The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. Exp. Neurol. 1996 Sep;141(1):79-93.

Barker RA, Ratcliffe E, Richards A, Dunnett SB. Fetal porcine dopaminergic cell survival in vitro and its relationship to embryonic age. Cell Transplant. 1999 Déc;8(6):593-599.

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 Mai 1;20(9):3415-3424.

Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., Haynesworth, S. & Zaia, J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **289**, 519-524 (2001).

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp. Hematol. 2002 Jan;30(1):42-48.

Bauer J, Bradl M, Hickley WF, Forss-Petter S, Breitschopf H, Linington C, et al. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. Am. J. Pathol. 1998 Sep;153(3):715-724.

Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. Science. 1982 Mai 21;216(4548):890-892.

Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. Glia. 1999 Jul;27(1):62-74.

Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, et al. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. Nature. 1995 Jan 26;373(6512):339-341.

Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. Appl Neurophysiol. 1987;50(1-6):344-346.

Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. J. Cell. Sci. 1991 Mai;99 (Pt 1):131-139.

Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood. 2005 Sep 1;106(5):1755-1761.

Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. J. Cell. Sci. 1992 Jun;102 (Pt 2):341-351.

Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. J. Neurol. Sci. 1973 Déc;20(4):415-455.

Besnard J, Chalon S, Bouchez G, Sensebé L, Vourc'h P, Garreau L, et al. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. Neurochem. Int. 2008 Jun;52(7):1332-1342.

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood. 2005 Mar 1;105(5):2214-2219.

Bezzi P, Domercq M, Vesce S, Volterra A. Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. Prog. Brain Res. 2001;132:255-265.

Bhat, R. & Steinman, L. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. *Neuron* **64**, 123-132 (2009).

BILLINGHAM RE, BOSWELL T. Studies on the problem of corneal homografts. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 1953 Jul 15;141(904):392-406.

Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH. Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. Nature. 1982 Aoû 12;298(5875):652-654.

Björklund A, Rothwell JC, Leenders KL, Frackowiak R, Marsden D, Johnels B, et al. Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. Arch. Neurol. 1989 Jun;46(6):615-631.

Björklund A, Rosenblad C, Winkler C, Kirik D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. 1997;4(3-4):186-200.

Björklund, A. et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. Lancet Neurol 2, 437-445 (2003)

Björklund A, Stenevi U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. Brain Res. 1979 Nov 30;177(3):555-560.

Block ML, Hong J. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. Prog. Neurobiol. 2005 Jun;76(2):77-98.

Bodine DM, Leri A, Anversa P, Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 Aoû 28;98(18):10344-10349.

Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2004 Déc;18(6):827-842.

Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Tissue Res. 2005 Fév;319(2):243-253.

Bourdet C, Haddad B, Baudic S, Gaura V, Maison P, Boissé MF, et al. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. Lancet. 2000 Déc 9;356(9246):1975-1979.

Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997 Jun 27;276(5321):2045-2047.

Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. J. Exp. Med. 1989 Jun 1;169(6):1977-1991.

Brevig T, Pedersen EB, Kristensen T, Zimmer J. Proliferative response of human T lymphocytes to porcine fetal brain cells. Cell Transplant. 1997 Déc;6(6):571-577.

Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. Brain Res. 1999 Mar 27;823(1-2):1-10.

Brundin, P. & Björklund, A. Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain. *Prog. Brain Res* **71**, 293-308 (1987).

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.

Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. Brain. 2002 Jun;125(Pt 6):1297-1308.

Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell. 1991 Déc 20;67(6):1033-1036.

## -C-

Calvo CF, Yoshimura T, Gelman M, Mallat M. Production of monocyte chemotactic protein-1 by rat brain macrophages. Eur. J. Neurosci. 1996 Aoû;8(8):1725-1734.

Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 2001 Jul 9;435(4):406-417.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J. Orthop. Res. 1991 Sep;9(5):641-650.

Carlén M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisén J. Functional integration of adult-born neurons. Curr. Biol. 2002 Avr 2;12(7):606-608.

Cascalho, M. & Platt, J.L. Xenotransplantation and other means of organ replacement. *Nat. Rev. Immunol* **1**, 154-160 (2001).

Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. Nature. 1996 Mar 21;380(6571):252-255.

Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood. 2006 Jan 1;107(1):367-372.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739-2749 (2007).

Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. J. Neurosci. Res. 2003 Sep 15;73(6):778-786.

Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. Lancet Neurol. 2002 Jun;1(2):92-100.

Clarke DL. Neural stem cells. Bone Marrow Transplant. 2003 Aoû;32 Suppl 1:S13-17.

Collier TJ, Redmond DE, Sladek CD, Gallagher MJ, Roth RH, Sladek JR. Intracerebral grafting and culture of cryopreserved primate dopamine neurons. Brain Res. 1987 Déc 15;436(2):363-366.

Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA, Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. Nature. 1996 Mar 21;380(6571):252-255.

Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. J. Cell. Physiol. 1999 Oct;181(1):67-73.

Connor B. Adenoviral vector-mediated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor provides neuroprotection in the aged parkinsonian rat. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2001 Nov;28(11):896-900.

Corcione, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367-372 (2006).

Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. Neurosci. Lett. 1993 Jan 12;149(2):111-114.

Cotzias GC. Parkinsoism anDopa. J Chronic Dis. 1969 Nov;22(5):297-301.

Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. Nat. Med. 1995 Sep;1(9):964-966.

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

Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM. Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. Brain Pathol. 1992 Oct;2(4):269-276.

Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gómez I, Yan M, Dujovny M. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. Neurol. Res. 2004 Mar;26(2):230-232.

## -D-

Dalla Barba G, Pailhous E, Degos JD, Lisovoski F, Ergis AM, Bachoud-Lévi AC, et al. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. Lancet. 2000 Déc 9;356(9246):1975-1979.

D'Amato RJ, Lipman ZP, Snyder SH. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. Science. 1986 Fév 28;231(4741):987-989.

Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. Neuroscience. 1993 Jan;52(1):1-6.

Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. Brain. 1999 Aoû;122 (Pt 8):1437-1448.

Damier P, Tremblay L, Féger J, Hirsch EC. [Development of dyskinesias induced by treatment for Parkinson's disease: potential role of first exposure to L-DOPA (or phenomenon of priming)]. Rev. Neurol. (Paris). 2000 Mar;156(3):224-235.

Daniloff JK, Bodony RP, Low WC, Wells J. Cross-species embryonic septal transplants: restoration of conditioned learning behavior. Brain Res. 1985 Oct 28;346(1):176-180.

Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F, 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 Avr;90(4):516-525.

de Andrade M, Maraganore DM, Rocca WA, Frigerio R, Sanft KR, Grossardt BR, et al. Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study. Mov. Disord. 2006 Oct;21(10):1688-1692.

De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. Arthritis Rheum. 2001 Jan;44(1):85-95.

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers J, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. J. Cell Biol. 2003 Mar 17;160(6):909-918.

del Rio-Hortega, P. Art and artifice in the science of histology. 1933. *Histopathology* **22**, 515-525 (1993).

de Silva HR, Khan NL, Wood NW. The genetics of Parkinson's disease. Curr. Opin. Genet. Dev. 2000 Jun;10(3):292-298.

Deacon TW, Pakzaban P, Burns LH, Dinsmore J, Isacson O. Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats. Exp. Neurol. 1994 Nov;130(1):151-167.

Deacon, T. et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat. Med* **3**, 350-353 (1997).

DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. Trends Neurosci. 1990 Jul;13(7):281-285.

Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. Stem Cells. 2006 Avr;24(4):1054-1064.

Devine, S.M. et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp. Hematol* **29**, 244-255 (2001).

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002 Mai 15;99(10):3838-3843.

Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. Blood. 2003 Nov 15;102(10):3837-3844.

Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. J. Bone Miner. Res. 1998 Mai;13(5):828-838.

Domínguez-Perles R, Peñuelas-Rivas G, Domenech N, Moscoso I, Centeno A, López E, et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. Transplant. Proc. 2005 Fév;37(1):481-482.

Doucet, G. et al. Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp. Neurol* **106**, 1-19 (1989).

Drucker-Colín R, Ostrosky F, Skurovich M, Madrazo I, León V, Torres C, et al. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 1988 Jan 7;318(1):51.

Duan, W.M., Cameron, R.M., Brundin, P. & Widner, H. Rat intrastriatal neural allografts challenged with skin allografts at different time points. *Exp. Neurol* **148**, 334-347 (1997).

Duenzl M, Lucas PA, Black AC, Young HE, Steele TA, Bray RA, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat. Rec. 2001 Sep 1;264(1):51-62.

Dunnett SB, Björklund A, Stenevi U, Iversen SD. Grafts of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. Brain Res. 1981 Déc 14;229(1):209-217.

Dunnett SB, Björklund A, Schmidt RH, Stenevi U, Iversen SD. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V. Behavioural recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions. Acta Physiol Scand Suppl. 1983;522:39-47.

Dunnett SB, Björklund A, Lindvall O. Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? Nat. Rev. Neurosci. 2001 Mai;2(5):365-369.

Duvoisin RC, Golbe LI, Di Iorio G, Polymeropoulos MH, Nussbaum RL, Lavedan C, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997 Jun 27;276(5321):2045-2047.

Dziewczapolski G, Lie DC, Ray J, Gage FH, Shults CW. Survival and differentiation of adult rat-derived neural progenitor cells transplanted to the striatum of hemiparkinsonian rats. Exp. Neurol. 2003 Oct;183(2):653-664.

## -E-

Elewa HF, Hilali H, Hess DC, Machado LS, Fagan SC. Minocycline for short-term neuroprotection. Pharmacotherapy. 2006 Avr;26(4):515-521.

Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. J Neural Transm. 2006 Avr;113(4):477-485.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat. Med. 1998 Nov;4(11):1313-1317.

Espejo EF, Montoro RJ, Armengol JA, López-Barneo J. Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. Neuron. 1998 Fév;20(2):197-206.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. Brain. 1991 Oct;114 (Pt 5):2283-2301.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998 Mar 6;279(5356):1528-1530.

Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp. Hematol. 2002 Jan;30(1):42-48.

Fink, J.S. et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. Cell Transplant 9, 273-278 (2000).

Finsen BR, Sørensen T, Castellano B, Pedersen EB, Zimmer J. 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. 1991 Mai;32(2):159-183.

Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O, Fink JS, et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. Cell Transplant. 2000 Avr;9(2):273-278.

Flügel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, et al. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. Brain Pathol. 2000 Jul;10(3):353-364.

Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, Björklund A, et al. In Reply: Fetal Brain Grafts and Parkinson's Disease. Science. 1990 Déc 7;250(4986):1435.

François C, Yelnik J, Tandé D, Agid Y, Hirsch EC. Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum. J. Comp. Neurol. 1999 Nov 22;414(3):334-347.

Frank RN, Dutta S, Mancini MA. Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1987 Jul;28(7):1086-1091.

Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. Immunol. Today. 1991 Sep;12(9):322-326.

Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A, Gerdoni E, Gallo B, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. Ann. Neurol. 2007 Mar;61(3):219-227.

Freed WJ, Morihisa JM, Spoor E, Hoffer BJ, Olson L, Seiger A, et al. Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. Nature. 1981 Jul 23;292(5821):351-352.

Freed, C.R. et al. Therapeutic effects of human fetal dopamine cells transplanted in a patient with Parkinson's disease. *Prog. Brain Res* **82**, 715-721 (1990).

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 2001 Mar 8;344(10):710-719.

Freed, C.R. et al. 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 (1992).

Freeman TB, Wojak JC, Brandeis L, Michel JP, Pearson J, Flamm ES. Cross-species intracerebral grafting of embryonic swine dopaminergic neurons. Prog. Brain Res. 1988;78:473-477.

Freeman, T.B. et al. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann. Neurol* **38**, 379-388 (1995).

Freeman, T.B., Willing, A., Zigova, T., Sanberg, P.R. & Hauser, R.A. Neural transplantation in Parkinson's disease. Adv Neurol 86, 435-445 (2001)

Freund TF, Bolam JP, Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Powell JF, et al. Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. J. Neurosci. 1985 Mar;5(3):603-616.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation. 1974 Avr;17(4):331-340.

Frigerio R, Sanft KR, Grossardt BR, Peterson BJ, Elbaz A, Bower JH, et al. Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study. Mov. Disord. 2006 Oct;21(10):1688-1692.

Fritz RB, Wang X, Zhao ML. The fate of adoptively transferred quiescent encephalitogenic T cells in normal and antigen-tolerized mice. J. Neuroimmunol. 2000 Jul 10;107(1):66-72.

Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. J. Cell Biol. 1999 Nov 15;147(4):891-903.

## -G-

Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000 Fév 25;287(5457):1433-1438.

Gai WP, Geffen LB, Denoroy L, Blessing WW. Loss of C1 and C3 epinephrine-synthesizing neurons in the medulla oblongata in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 1993 Avr;33(4):357-367.

Galili U. The natural anti-Gal antibody, the B-like antigen, and human red cell aging. Blood Cells. 1988;14(1):205-228.

Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL. Neural stem cells: an overview. Circ. Res. 2003 Avr 4;92(6):598-608.

Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, Isacson O. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. Exp. Neurol. 1996 Jul;140(1):1-13.

Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. Nature. 1996 Mar 21;380(6571):252-255.

Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. Immunopharmacology. 2000 Aoû;49(1-2):171-186.

Gaudin, D.P., Rioux, L. & Bédard, P.J. Fetal dopamine neuron transplants prevent behavioral supersensitivity induced by repeated administration of L-dopa in the rat. *Brain Res* **506**, 166-168 (1990).

Giasson BI, Lee VM. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. Neuron. 2001 Sep 27;31(6):885-888.

Gibb WR, Scott T, Lees AJ. Neuronal inclusions of Parkinson's disease. Mov. Disord. 1991;6(1):2-11.

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. Nat. Med. 2003 Mai;9(5):589-595.

Giuliani F, Hader W, Yong VW. Minocycline attenuates T cell and microglia activity to impair cytokine production in T cell-microglia interaction. J. Leukoc. Biol. 2005 Jul;78(1):135-143.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood. 2005 Avr 1;105(7):2821-2827.

Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. Nat. Rev. Neurosci. 2001 Jul;2(7):492-501.

Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? Nat. Rev. Neurosci. 2007 Jun;8(6):481-488.

Goldman JE, Yen SH, Chiu FC, Peress NS. Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. Science. 1983 Sep 9;221(4615):1082-1084.

Gollackner, B. et al. Porcine cytomegalovirus and coagulopathy in pig-to-primate xenotransplantation. *Transplantation* **75**, 1841-1847 (2003).

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998 Mar 17;95(6):3168-3171.

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyteendothelial cell adhesion. J. Leukoc. Biol. 1994 Mai;55(5):662-675.

Graybiel AM, Hirsch EC, Agid Y. The nigrostriatal system in Parkinson's disease. Adv Neurol. 1990;53:17-29.

Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J. Cell. Sci. 2003 Mai 1;116(Pt 9):1827-1835.

Guan J, Gunn AJ, Sirimanne ES, Tuffin J, Gunning MI, Clark R, et al. The window of opportunity for neuronal rescue with insulin-like growth factor-1 after hypoxia-ischemia in rats is critically modulated by cerebral temperature during recovery. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2000 Mar;20(3):513-519.

Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. Nat. Neurosci. 1999 Déc;2(12):1137-1140.

Guo Q, Sebastian L, Sopher BL, Miller MW, Glazner GW, Ware CB, et al. Neurotrophic factors [activity-dependent neurotrophic factor (ADNF) and basic fibroblast growth factor (bFGF)] interrupt excitotoxic neurodegenerative cascades promoted by a PS1 mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999 Mar 30;96(7):4125-4130.

Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. J. Immunol. 2007 Aoû 1;179(3):1855-1863.

#### -H-

Haber SN, Fudge JL. The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. Crit Rev Neurobiol. 1997;11(4):323-342.

Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development. 1989 Aoû;106(4):619-633.

Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, et al. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 1990 Avr;27(4):373-385.

Hanisch U. Microglia as a source and target of cytokines. Glia. 2002 Nov;40(2):140-155.

Hanisch UK, Neuhaus J, Quirion R, Kettenmann H. Neurotoxicity induced by interleukin-2: involvement of infiltrating immune cells. Synapse. 1996 Oct;24(2):104-114.

Haque NS, LeBlanc CJ, Isacson O. Differential dissection of the rat E16 ventral mesencephalon and survival and reinnervation of the 6-OHDA-lesioned striatum by a subset of aldehyde dehydrogenase-positive TH neurons. Cell Transplant. 1997 Jun;6(3):239-248.

Harrower TP, Richards A, Cruz G, Copeman L, Dunnett SB, Barker RA. Alpha Gal is widely expressed in embryonic porcine stem cells and neural tissue. Neuroreport. 2002 Mar 25;13(4):481-485.

Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000 Mar 14;97(6):2875-2880.

Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. J. Nutr. 2006 Jan;136(1 Suppl):218S-26S.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone. 1992;13(1):81-88.

He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. Brain Res. 2001 Aoû 3;909(1-2):187-193.

Herman, J.P. & Abrous, N.D. Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog. Neurobiol* 44, 1-35 (1994).

Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. Clin. Orthop. Relat. Res. 2002 Déc;(405):14-23.

Heymann D, Vanhove B, Anegon I, Naveilhan P, Dunbar GL, Lescaudron L, et al. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. J. Cell. Mol. Med. 2009 Aoû;13(8B):2547-2558.

Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. Brain Pathol. 1991 Jan;1(2):97-105.

Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. Semin. Immunol. 1999 Avr;11(2):125-137.

Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. Science. 1988 Jan 15;239(4837):290-292.

Hirose R, Vincenti F. Immunosuppression: today, tomorrow, and withdrawal. Semin. Liver Dis. 2006 Aoû;26(3):201-210.

Hirsch E, Ruberg M, Portier MM, Dardenne M, Agid Y. Characterization of two antigens in parkinsonian Lewy bodies. Brain Res. 1988 Fév 16;441(1-2):139-144.

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. Cardiovasc. Res. 1996 Oct;32(4):687-698.

Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, et al. Glial cell linederived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. Neurosci. Lett. 1994 Nov 21;182(1):107-111.

Holden C. Fetal Cells Again? Science. 2009 Oct 16;326(5951):358-359.

Honey CR, Clarke DJ, Dallman MJ, Charlton HM. Human neural graft function in rats treated with anti-interleukin II receptor antibody. Neuroreport. 1990 Déc;1(3-4):247-249.

Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, Streilein JW, Young MJ. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. Stem Cells. 2003;21(4):405-416.

Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. Pharmacol. Rev. 1966 Jun;18(2):925-964.

Horwitz, E.M. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med* **5**, 309-313 (1999).

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2005;7(5):393-395.

Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. J. Lab. Clin. Med. 2003 Mai;141(5):342-349.

Huffaker TK, Boss BD, Morgan AS, Neff NT, Strecker RE, Spence MS, 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.

Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debré P, et al. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J. Neurosci. 1999 Mai 1;19(9):3440-3447.

Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000 Mar 14;97(6):2875-2880.

Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. Nature. 1991 Mar 21;350(6315):230-232.

Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM. Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. J. Neurosci. 1994 Jan;14(1):335-347.
Ide C, Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J. Clin. Invest. 2004 Jun;113(12):1701-1710.

Imitola J, Comabella M, Chandraker AK, Dangond F, Sayegh MH, Snyder EY, et al. Neural stem/progenitor cells express costimulatory molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli. Am. J. Pathol. 2004 Mai;164(5):1615-1625.

Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. Exp. Eye Res. 2007 Aoû;85(2):234-241.

Inzelberg R, Nisipeanu P, Rabey JM, Orlov E, Catz T, Kippervasser S, et al. Double-blind comparison of cabergoline and bromocriptine in Parkinson's disease patients with motor fluctuations. Neurology. 1996 Sep;47(3):785-788.

Irvin DK, Dhaka A, Hicks C, Weinmaster G, Kornblum HI. Extrinsic and intrinsic factors governing cell fate in cortical progenitor cultures. Dev. Neurosci. 2003 Aoû;25(2-4):162-172.

Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH. Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. Nat. Med. 1995 Nov;1(11):1189-1194.

Isacson O, Costantini L, Schumacher JM, Cicchetti F, Chung S, Kim K-. Cell implantation therapies for Parkinson's disease using neural stem, transgenic or xenogeneic donor cells. Parkinsonism Relat. Disord. 2001 Jul;7(3):205-212.

Isacson O, Deacon T. Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. Trends Neurosci. 1997 Oct;20(10):477-482.

-J-

Jahanshahi M, Sawle G, Björklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, et al. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 1997 Jul;42(1):95-107.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J. Cell. Biochem. 1997 Fév;64(2):295-312.

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

Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp. Hematol. 2004 Mai;32(5):414-425.

Jellinger KA. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. Mol. Chem. Neuropathol. 1991 Jun;14(3):153-197.

Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. J Neural Transm Park Dis Dement Sect. 1990;2(4):327-340.

Jellinger, K.A. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol. Chem. Neuropathol* **14**, 153-197 (1991).

Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. Mov. Disord. 1998;13 Suppl 1:24-34.

Jiang X, Zhang Y, Liu B, Zhang S, Wu Y, Yu X, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2005 Mai 15;105(10):4120-4126.

Joel D, Weiner I. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. Neuroscience. 2000;96(3):451-474.

Johansen J, Dagø L, Kirik D, Patel UA, Lundberg C, Trono D, et al. In vivo protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-family member neublastin/artemin. Mol. Cell. Neurosci. 2000 Fév;15(2):199-214.

Johanson CE, Duncan JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. Cerebrospinal Fluid Res. 2008;5:10.

Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisén J. Neural stem cells in the adult human brain. Exp. Cell Res. 1999 Déc 15;253(2):733-736.

Johansson S, Price J, Modo M. Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells. Stem Cells. 2008 Sep;26(9):2444-2454.

Johnson S, Hu W, Verfaillie CM, Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J. Clin. Invest. 2002 Mai;109(10):1291-1302.

Joly E, Mucke L, Oldstone MB. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. Science. 1991 Sep 13;253(5025):1283-1285.

Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. Arthritis Rheum. 2004 Mar;50(3):817-827.

Jordan FL, Thomas WE. Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. Brain Res. 1988 Jun;472(2):165-178.

#### -K-

Kalyani A, Hobson K, Rao MS. Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. Dev. Biol. 1997 Jun 15;186(2):202-223.

Kan I, Melamed E, Offen D. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. Handb Exp Pharmacol. 2007;(180):219-242.

Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. Exp. Neurol. 2004 Jun;187(2):266-278.

Keating A, Prockop D, Horwitz E, Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-317.

Keir G, Thompson EJ, Hickey WF, Knopf PM, Harling-Berg CJ, Cserr HF, et al. Antigendependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. J. Immunol. 1998 Jul 15;161(2):692-701.

Kelly J, Durocher Y, Commissiong JW, Petrova PS, Raibekas A, Pevsner J, et al. Discovering novel phenotype-selective neurotrophic factors to treat neurodegenerative diseases. Prog. Brain Res. 2004;146:168-183.

Kiefer R, Streit WJ, Toyka KV, Kreutzberg GW, Hartung HP. Transforming growth factorbeta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. Int. J. Dev. Neurosci. 1995 Jul;13(3-4):331-339.

Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. N. Engl. J. Med. 1988 Avr 7;318(14):876-880.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature. 1998 Avr 9;392(6676):605-608.

Kitada T, Asakawa S, Matsumine H, Hattori N, Shimura H, Minoshima S, et al. Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism. Neurogenetics. 2000 Mar;2(4):207-218.

Klassen H, Schwartz MR, Bailey AH, Young MJ. Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. Neurosci. Lett. 2001 Oct 26;312(3):180-182.

Kloppenburg M, Verweij CL, Miltenburg AM, Verhoeven AJ, Daha MR, Dijkmans BA, et al. The influence of tetracyclines on T cell activation. Clin. Exp. Immunol. 1995 Déc;102(3):635-641.

Knopf, P.M. et al. Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J. Immunol* **161**, 692-701 (1998).

Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. J. Clin. Oncol. 2000 Jan;18(2):307-316.

Kompoliti K, Chu Y, Shannon KM, Kordower JH. Neuropathological study 16 years after autologous adrenal medullary transplantation in a Parkinson's disease patient. Mov. Disord. 2007 Aoû 15;22(11):1630-1633.

Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, Romand R, Hashino E. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005 Mar 29;102(13):4789-4794.

Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 Avr 10;98(8):4752-4757.

Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P, Isacson O, et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. Nat. Med. 1997 Mar;3(3):350-353.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood. 2003 Mai 1;101(9):3722-3729.

Kremlev SG, Roberts RL, Palmer C. Minocycline modulates chemokine receptors but not interleukin-10 mRNA expression in hypoxic-ischemic neonatal rat brain. J. Neurosci. Res. 2007 Aoû 15;85(11):2450-2459.

Krenger W, Falzarano G, Delmonte J, 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. 1996 Aoû 1;88(3):1113-1121.

Krystkowiak P, Gaura V, Labalette M, Rialland A, Remy P, Peschanski 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(1):e166.

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. 1994 Sep;267(3 Pt 2):H931-937.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J. Neurosci. 1996 Mar 15;16(6):2027-2033.

Künzle H. Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in Macaca fascicularis. Brain Res. 1975 Mai 2;88(2):195-209.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. J. Cell Biol. 2001 Mai 28;153(5):1133-1140.

#### -L-

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. N. Engl. J. Med. 1998 Oct 8;339(15):1044-1053.

Langston JW. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. Neurology. 1996 Déc;47(6 Suppl 3):S153-160.

Langston JW, Ballard PA. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. N. Engl. J. Med. 1983 Aoû 4;309(5):310.

Larsson LC, Duan WM, Widner H. Discordant xenografts: different outcome after mouse and rat neural tissue transplantation to guinea-pigs. Brain Res. Bull. 1999 Jul 15;49(5):367-376.

Larsson LC, Czech KA, Widner H, Korsgren O. Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. Transplantation. 1999 Oct 27;68(8):1153-1160.

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):100-114.

Larsson LC, Widner H. Neural tissue xenografting. Scand. J. Immunol. 2000 Sep;52(3):249-256.

Laschinger M, Vajkoczy P, Engelhardt B. 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. 2002 Déc;32(12):3598-3606.

Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V. Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. Neurochem. Res. 2001 Nov;26(11):1209-1216.

Laws ER, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK, Stacy M, Wooten GF, et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. Neurology. 2003 Jan 14;60(1):69-73.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 2004 Mai 1;363(9419):1439-1441.

Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EN. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. J. Immunol. 2000 Fév 1;164(3):1277-1285.

Lee K, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung Y, Lin C, Chou S, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. Hepatology. 2004 Déc;40(6):1275-1284.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006 Nov 14;103(46):17438-17443.

Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Lindvall O, Widner H, Rehncrona S, et al. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. Ann. Neurol. 1992 Fév;31(2):155-165.

Lees AJ, Shaw KM, Kohout LJ, Stern GM, Elsworth JD, Sandler M, et al. Deprenyl in Parkinson's disease. Lancet. 1977 Oct 15;2(8042):791-795.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell. 1990 Fév 23;60(4):585-595.

Lescaudron L, Fulop Z, Sutton RL, Geller HM, Stein DG. Behavioral and morphological consequences of primary astrocytes transplanted into the rat cortex immediately after nucleus basalis ibotenic lesion. Int. J. Neurosci. 2001 Jan;106(1-2):63-85.

Levesque MF, Neuman T, Rezak M. Therapeutic Microinjection of Autologous Adult Human Neural Stem Cells and Differentiated Neurons for Parkinson's Disease: Five-Year Post-Operative Outcome. The Open Stem Cell Journal, 2009, 1, 20-29

Levivier M, Peschanski M, Studer L, Barker R, Björklund A, Dunnett SB, et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2003 Jul;2(7):437-445.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep;7(9):678-689.

Li C, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, et al. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. Am. J. Pathol. 2002 Jun;160(6):2181-2190.

Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. J. Neurosci. 2002 Aoû 1;22(15):6639-6649.

Liedtke S, Rosenbaum C, Sorg RV, Fischer J, Greschat S, Knipper A, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J. Exp. Med. 2004 Jul 19;200(2):123-135.

Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, et al. Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 1998 Oct 15;339(16):1105-1111.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science. 1993 Mai 21;260(5111):1130-1132.

Lin S, Zhang Y, Dodel R, Farlow MR, Paul SM, Du Y. Minocycline blocks nitric oxideinduced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. Neurosci. Lett. 2001 Nov 23;315(1-2):61-64.

Lindvall, O. et al. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol* **31**, 155-165 (1992).

Lindvall O. Clinical application of neuronal grafts in Parkinson's disease. J. Neurol. 1994 Déc;242(1 Suppl 1):S54-56.

Lindvall O. Update on fetal transplantation: the Swedish experience. Mov. Disord. 1998;13 Suppl 1:83-87.

Lindvall O, Backlund EO, Farde L, Sedvall G, Freedman R, Hoffer B, et al. Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. Ann. Neurol. 1987 Oct;22(4):457-468.

Lindvall, O. et al. Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch. Neurol* **46**, 615-631 (1989).

Lindvall, O. et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* **247**, 574-577 (1990).

Liu B, Du L, Kong LY, Hudson PM, Wilson BC, Chang RC, et al. Reduction by naloxone of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron-glia co-cultures. Neuroscience. 2000;97(4):749-756.

Liu B, Gao H, Hong J. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. Environ. Health Perspect. 2003 Jun;111(8):1065-1073.

Loddick SA, Liu C, Takao T, Hashimoto K, De Souza EB. Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. Brain Res. Brain Res. Rev. 1998 Mai;26(2-3):306-319.

Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993 Mar 1;90(5):2074-2077.

Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science. 1994 Mai 20;264(5162):1145-1148.

Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alphasynuclein. Nat. Rev. Neurosci. 2002 Déc;3(12):932-942.

Luquin MR, Montoro RJ, Guillén J, Saldise L, Insausti R, Del Río J, et al. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. Neuron. 1999 Avr;22(4):743-750.

## -M-

Maccario R, Moretta A, Cometa A, Montagna D, Comoli P, Locatelli F, et al. Human mesenchymal stem cells and cyclosporin a exert a synergistic suppressive effect on in vitro activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes. Biol. Blood Marrow Transplant. 2005 Déc;11(12):1031-1032.

Mackenzie IR, Munoz DG. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. Neurology. 1998 Avr;50(4):986-990.

Madrazo I, Drucker-Colín R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 1987 Avr 2;316(14):831-834.

Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. Neurosurgery. 2004 Nov;55(5):1185-1193.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J. Cell. Physiol. 1998 Jul;176(1):57-66.

Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D, Jones EA, Kinsey SE, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. Arthritis Rheum. 2002 Déc;46(12):3349-3360.

Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creyghton MP, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. Cell. 2008 Avr 18;133(2):250-264.

Mason DW, Charlton HM, Jones AJ, Lavy CB, Puklavec M, Simmonds SJ. The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. Neuroscience. 1986 Nov;19(3):685-694.

Mayeux R, Chen J, Mirabello E, Marder K, Bell K, Dooneief G, et al. An estimate of the incidence of dementia in idiopathic Parkinson's disease. Neurology. 1990 Oct;40(10):1513-1517.

McKay R. Stem cells in the central nervous system. Science. 1997 Avr 4;276(5309):66-71.

MEDAWAR PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. Br J Exp Pathol. 1948 Fév;29(1):58-69.

Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 2004 Jun 15;103(12):4619-4621.

Melchior B, Rémy S, Nerrière-Daguin V, Heslan J, Soulillou J, Brachet P. Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. J. Neurosci. Res. 2002 Mai 1;68(3):284-292.

Mendez I, Hong M, Smith S, Dagher A, Desrosiers J. Neural transplantation cannula and microinjector system: experimental and clinical experience. Technical note. J. Neurosurg. 2000 Mar;92(3):493-499.

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.

Michel-Monigadon D, Nerrière-Daguin V, Lévèque 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 Avr 15;89(7):816-823.

Mínguez-Castellanos, A. et al. Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr* **78**, 825-831 (2007).

Mirotsou M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gnecchi M, Noiseux N, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007 Jan 30;104(5):1643-1648.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. J Neural Transm. 2000;107(3):335-341.

Moore DJ, Dawson VL, Dawson TM. Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. Neuromolecular Med. 2003;4(1-2):95-108.

Morihisa JM, Nakamura RK, Freed WJ, Mishkin M, Wyatt RJ. Transplantation techniques and the survival of adrenal medulla autografts in the primate brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987;495:599-605.

Moroo I, Yamada T, Makino H, Tooyama I, McGeer PL, McGeer EG, et al. Loss of insulin receptor immunoreactivity from the substantia nigra pars compacta neurons in Parkinson's disease. Acta Neuropathol. 1994;87(4):343-348.

Morrish P, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Brown R, et al. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 1997 Jul;42(1):95-107.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell. 1997 Fév 7;88(3):287-298.

Moseley A, Hoffman R, Devine SM, Bartholomew A, Patil S, Mackay A, et al. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. Hum. Gene Ther. 2001 Aoû 10;12(12):1527-1541.

Moscoso, I. et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant. Proc* **37**, 481-482 (2005).

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 1986 Avr 1;136(7):2348-2357.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol. Today. 1996 Mar;17(3):138-146.

Mouradian MM. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. Neurology. 2002 Jan 22;58(2):179-185.

Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. Annu. Rev. Immunol. 1989;7:445-480.

Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, Kameda M, Yuan W, Hayase H, et al. The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus. Exp. Neurol. 2006 Jun;199(2):311-327.

-N-

Nadarajah B, Makarenkova H, Becker DL, Evans WH, Parnavelas JG. Basic FGF increases communication between cells of the developing neocortex. J. Neurosci. 1998 Oct 1;18(19):7881-7890.

Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T. Neurotrophin secretion from cultured microglia. J. Neurosci. Res. 2001 Aoû 15;65(4):322-331.

Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat. Med. 1999 Mar;5(3):309-313.

Neumann H, Cavalié A, Jenne DE, Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons. Science. 1995 Jul 28;269(5223):549-552.

Neumann H, Schmidt H, Cavalié A, Jenne D, Wekerle H. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. J. Exp. Med. 1997 Jan 20;185(2):305-316.

Neveu I, Jehan F, Houlgatte R, Wion D, Brachet P. Activation of nerve growth factor synthesis in primary glial cells by phorbol 12-myristate 13-acetate: role of protein kinase C. Brain Res. 1992 Jan 20;570(1-2):316-322.

Nikcevich KM, Gordon KB, Tan L, Hurst SD, Kroepfl JF, Gardinier M, et al. IFN-gammaactivated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. J. Immunol. 1997 Jan 15;158(2):614-621.

Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. Neurology. 2003 Jan 14;60(1):69-73.

## -0-

Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Tanuma N, Matsumoto Y. Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation: tolerance induction by anti-T-cell antibodies. J. Neurosci. Res. 1997 Jun 1;48(5):385-396.

Olanow CW. Present and future directions in the management of motor complications in patients with advanced PD. Neurology. 2003 Sep 23;61(6 Suppl 3):S24-33.

Olanow CW, Kordower JH, Freeman TB. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. Trends Neurosci. 1996 Mar;19(3):102-109.

Olanow CW, Jenner P, Brooks D. Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S167-174.

Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the bloodbrain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. Ann. Neurol. 1977 Mai;1(5):409-417.

Oliveira EM, He R, Geng Y, Willerson JT, Perin EC, Silva GV, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. Circulation. 2005 Jan 18;111(2):150-156.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature. 2001 Avr 5;410(6829):701-705.

Owen M. Marrow stromal stem cells. J. Cell Sci. Suppl. 1988;10:63-76.

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J. Comp. Neurol. 2000 Oct 2;425(4):479-494.

Paradis, K. et al. 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 (1999).

Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. PLoS ONE. 2007;2(9):e941.

Patience, C., Takeuchi, Y. & Weiss, R.A. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med* **3**, 282-286 (1997).

Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. Ann. Neurol. 2007 Mar;61(3):219-227.

Penney D, Fink JS, Isacson O, Schumacher JM, Ellias SA, Palmer EP, et al. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. Neurology. 2000 Mar 14;54(5):1042-1050.

Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. Science. 1979 Mai 11;204(4393):643-647.

Perry VH. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. J. Neuroimmunol. 1998 Oct 1;90(2):113-121.

Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. Neuroscience. 1985 Jun;15(2):313-326.

Perry VH, Gordon S. Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. J. Exp. Med. 1987 Oct 1;166(4):1138-1143.

Peschanski, M. et al. Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. Brain 117 (Pt 3), 487-499 (1994)

Peschanski M, Studer L, Barker R, Björklund A, Dunnett SB, Brundin P, et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2003 Jul;2(7):437-445.

Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesser ML. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1990 Nov;10(6):850-859.

Petrova PS, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, et al. Discovering novel phenotype-selective neurotrophic factors to treat neurodegenerative diseases. Prog. Brain Res. 2004;146:168-183.

Piccini, P. et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. Nat. Neurosci 2, 1137-1140 (1999).

Pittenger, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).

Pittenger, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).

Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006 Fév;24(2):386-398.

Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA. 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. 1986 Mar 1;136(5):1680-1687.

Poltorak M, Freed WJ. Immunological reactions induced by intracerebral transplantation: evidence that host microglia but not astroglia are the antigen-presenting cells. Exp. Neurol. 1989 Mar;103(3):222-233.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997 Jun 27;276(5321):2045-2047.

Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH. Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. Am. J. Pathol. 1996 Déc;149(6):2055-2066.

Prockop DJ, Olson SD. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. Blood. 2007 Avr 15;109(8):3147-3151.

#### -R-

Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. FASEB J. 2002 Aoû;16(10):1274-1276.

Rascol O. L-dopa-induced peak-dose dyskinesias in patients with Parkinson's disease: a clinical pharmacologic approach. Mov. Disord. 1999;14 Suppl 1:19-32.

Redmond DE, Naftolin F, Collier TJ, Leranth C, Robbins RJ, Sladek CD, et al. Cryopreservation, culture, and transplantation of human fetal mesencephalic tissue into monkeys. Science. 1988 Nov 4;242(4879):768-771.

Remy, P. et al. Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients. Ann. Neurol 38, 580-588 (1995)

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 Mai;8(2):136-148.

Ren G, Su J, Zhao X, Zhang L, Zhang J, Roberts AI, et al. Apoptotic cells induce immunosuppression through dendritic cells: critical roles of IFN-gamma and nitric oxide. J. Immunol. 2008 Sep 1;181(5):3277-3284.

Reynolds, B.A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-1710 (1992).

Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. Dev. Biol. 1996 Avr 10;175(1):1-13.

Ricaurte GA, Yuan J, Hatzidimitriou G, Cord BJ, McCann UD. Severe dopaminergic neurotoxicity in primates after a common recreational dose regimen of MDMA ("ecstasy"). Science. 2002 Sep 27;297(5590):2260-2263.

Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O, et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. Nat. Neurosci. 1999 Déc;2(12):1137-1140.

Rocca WA, Frigerio R, Sanft KR, Grossardt BR, Peterson BJ, Elbaz A, et al. Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study. Mov. Disord. 2006 Oct;21(10):1688-1692.

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells. 2003;21(1):105-110.

Root H, Boyer R, Rubenstein J, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997 Jun 27;276(5321):2045-2047.

Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Björklund A. Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. Eur. J. Neurosci. 1999 Mai;11(5):1554-1566.

Rosser AE, Barker RA, Armstrong RJ, Harrower TP, Hurelbrink CB, McLaughin M, et al. Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. Neuroscience. 2001;106(1):201-216.

Rossignol J, Boyer C, Thinard R, Remy S, Dugast A, Dubayle D, et al. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. J. Cell. Mol. Med. 2009 Aoû;13(8B):2547-2558.

Rothwell N, Allan S, Toulmond S. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. J. Clin. Invest. 1997 Déc 1;100(11):2648-2652.

Rozovsky I, Finch CE, Morgan TE. Age-related activation of microglia and astrocytes: in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. Neurobiol. Aging. 1998 Fév;19(1):97-103.

Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC, Hartmann A, Hunot S, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000 Mar 14;97(6):2875-2880.

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. Annu. Rev. Neurosci. 1999;22:11-28.

Russell JH, White CL, Loh DY, Meleedy-Rey P. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991 Mar 15;88(6):2151-2155.

Russell JH, Rush BJ, Abrams SI, Wang R. Sensitivity of T cells to anti-CD3-stimulated suicide is independent of functional phenotype. Eur. J. Immunol. 1992 Jun;22(6):1655-1658.

Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. Clin. Exp. Immunol. 2007 Aoû;149(2):353-363.

#### -S-

Sad S, Kägi D, Mosmann TR. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. J. Exp. Med. 1996 Oct 1;184(4):1543-1547.

Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. Cell Transplant. 2000 Avr;9(2):273-278.

Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. Exp. Cell Res. 2003 Jul 15;287(2):289-300.

Samson Y, Hantraye P, Jeny R, Peschanski M, Defer G, N'Guyen JP, et al. Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. Brain. 1994 Jun;117 (Pt 3):487-499.

Santa María L, Rojas CV, Minguell JJ. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp. Cell Res. 2004 Nov 1;300(2):418-426.

Sasaki M, Radtke C, Tan AM, Zhao P, Hamada H, Houkin K, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. J. Neurosci. 2009 Nov 25;29(47):14932-14941.

Sauer H, Frodl EM, Kupsch A, ten Bruggencate G, Oertel WH. Cryopreservation, survival and function of intrastriatal fetal mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease. Exp Brain Res. 1992;90(1):54-62.

Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1999 Jan;26(1):11-19.

Schapira AH. Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal. Mov. Disord. 1994 Mar;9(2):125-138.

Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. Brain Res. 1986 Mai 21;374(1):110-118.

Schumacher, J.M. et al. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. Neurology 54, 1042-1050 (2000).

Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. Trends Neurosci. 2003 Mar;26(3):125-131.

Seki, T. & Arai, Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci. Res* **17**, 265-290 (1993).

Sedgwick JD, Ford AL, Foulcher E, Airriess R. Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating T cell blasts. J. Immunol. 1998 Jun 1;160(11):5320-5330.

Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. Acta Neuropathol. 1998 Mar;95(3):229-234.

Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. Exp. Hematol. 2001 Fév;29(2):244-255.

Shinoda M, Giacobini M, Schmidt-Kastner R, Trok K, Olson L. Differential immune responses to fetal intracameral spinal cord and cortex cerebri grafts. Exp Brain Res. 1996 Jul;110(2):223-234.

Shinoda M, Hudson JL, Strömberg I, Hoffer BJ, Moorhead JW, Olson L. Microglial cell responses to fetal ventral mesencephalic tissue grafting and to active and adoptive immunizations. Exp. Neurol. 1996 Oct;141(2):173-180.

Shoulson I. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. Ann. Neurol. 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S160-166.

Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? Curr. Opin. Immunol. 1998 Oct;10(5):581-587.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. Ann. Neurol. 1994 Sep;36(3):348-355.

Silva, G.V. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* **111**, 150-156 (2005).

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood. 1991 Jul 1;78(1):55-62.

Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Avr 2;284(5411):143-147.

Smith Y, Kieval JZ. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. Trends Neurosci. 2000 Oct;23(10 Suppl):S28-33.

Soderstrom K, O'Malley J, Steece-Collier K, Kordower JH. Neural repair strategies for Parkinson's disease: insights from primate models. Cell Transplant. 2006;15(3):251-265.

Sommer L, Rao M. Neural stem cells and regulation of cell number. Prog. Neurobiol. 2002 Jan;66(1):1-18.

Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. Amino Acids. 1998;14(1-3):69-74.

Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood. 2008 Fév 1;111(3):1327-1333.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell. 1994 Jan 28;76(2):301-314.

Stacy M, Wooten GF, Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. Neurology. 2003 Jan 14;60(1):69-73.

Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat. Rec. 2001 Sep 1;264(1):51-62.

Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. Ann. Neurol. 2003 Sep;54(3):403-414.

Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. Glia. 2002 Nov;40(2):133-139.

Sumitran S, Liu J, Czech KA, Christensson B, Widner H, Holgersson J. Human natural antibodies cytotoxic to pig embryonic brain cells recognize novel non-Galalpha1,3Gal-based xenoantigens. Exp. Neurol. 1999 Oct;159(2):347-361.

Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD. Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Clin. Invest. 2000 Jan;105(2):223-231.

Szymanska A, Biernaskie J, Laidley D, Granter-Button S, Corbett D. Minocycline and intracerebral hemorrhage: influence of injury severity and delay to treatment. Exp. Neurol. 2006 Jan;197(1):189-196.

-T-

Tatton WG, Greenwood CE. Rescue of dying neurons: a new action for deprenyl in MPTP parkinsonism. J. Neurosci. Res. 1991 Déc;30(4):666-672.

Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. J. Neurosci. Res. 2002 Sep 15;69(6):745-749.

Taylor AW, Streilein JW. Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. Neuroimmunomodulation. 1996 Jun;3(2-3):112-118.

Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. Brain Res. Brain Res. Rev. 1999 Déc;31(1):42-57.

Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. Nat. Med. 1997 Mar;3(3):350-353.

Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D. & Björklund, A. 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 (2005).

Thuerauf N, Fromm MF. The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2006 Aoû;256(5):281-286.

Tian XC, Tuck DP, Weissman SM, Yang X, Cheng T, Sung L, et al. Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. Nat. Genet. 2006 Nov;38(11):1323-1328.

Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. J. Immunol. 2001 Jun 15;166(12):7527-7533.

Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2005 Jul;289(1):F31-42.

Tomac A, Widenfalk J, Lin LF, Kohno T, Ebendal T, Hoffer BJ, et al. Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1995 Aoû 29;92(18):8274-8278.

Trimmer PA, Smith TS, Jung AB, Bennett JP. Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity. Neurodegeneration. 1996 Sep;5(3):233-239.

Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 2001 Mar 8;344(10):710-719.

Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C. & Guinan, E.C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75**, 389-397 (2003).

Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, et al. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. Mol. Biotechnol. 2003 Jan;23(1):37-49.

## -U-

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 2008 Sep;8(9):726-736.

Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R. Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. J. Leukoc. Biol. 1994 Déc;56(6):732-740.

Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Gócza E, Vas V, Monostori E, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. Stem Cells. 2008 Jan;26(1):244-253.

# -V-W-X-Y-Z-

Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B. Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. J. Clin. Invest. 2001 Aoû;108(4):557-565.

Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. Glia. 1997 Sep;21(1):2-21.

Vass K, Lassmann H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. Am. J. Pathol. 1990 Oct;137(4):789-800.

Verfaillie CM. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. Blood. 1998 Oct 15;92(8):2609-2612.

Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire A, Shridhar V, Smith DI, et al. Discovering novel phenotype-selective neurotrophic factors to treat neurodegenerative diseases. Prog. Brain Res. 2004;146:168-183.

Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, et al. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 Fév 27;98(5):2837-2842.

von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. Cell. 1995 Sep 22;82(6):989-999.

Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. Neurology. 2002 Aoû 27;59(4):514-523.

Weiss, R.A. Xenografts and retroviruses. Science 285, 1221-1222 (1999).

Wenning, G.K. et al. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. Ann. Neurol 42, 95-107 (1997).

Whitehouse PJ, Hedreen JC, White CL, Price DL. Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson disease. Ann. Neurol. 1983 Mar;13(3):243-248.

Wictorin, K., Clarke, D.J., Bolam, J.P. & Björklund, A. Fetal striatal neurons grafted into the ibotenate lesioned adult striatum: efferent projections and synaptic contacts in the host globus pallidus. Neuroscience 37, 301-315 (1990).

Wictorin, K. et al. Extensive efferent projections of intra-striatally transplanted striatal neurons as revealed by a species-specific neurofilament marker and anterograde axonal tracing. Prog. Brain Res 82, 391-399 (1990).

Wictorin K, Brundin P, Sauer H, Lindvall O, Björklund A. Long distance directed axonal growth from human dopaminergic mesencephalic neuroblasts implanted along the nigrostriatal pathway in 6-hydroxydopamine lesioned adult rats. J. Comp. Neurol. 1992 Sep 22;323(4):475-494.

Williams K, Ulvestad E, Antel J. Immune regulatory and effector properties of human adult microglia studies in vitro and in situ. Adv. Neuroimmunol. 1994;4(3):273-281.

Winkler C, Kirik D, Björklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? Trends Neurosci. 2005 Fév;28(2):86-92.

Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo J, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. Stem Cells. 2005 Mar;23(3):392-402.

Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, Charlton HM. Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. Neuroscience. 1996 Fév;70(3):775-789.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, et al. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. J. Neurosci. 2002 Mar 1;22(5):1763-1771.

Yan Q, Matheson C, Lopez OT. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. Nature. 1995 Jan 26;373(6512):341-344.

Yang L, Matthews RT, Schulz JB, Klockgether T, Liao AW, Martinou JC, et al. 1-Methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyride neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. J. Neurosci. 1998 Oct 15;18(20):8145-8152.

Yin L, Fu S, Shi G, Li Y, Jin J, Ma Z, et al. Expression and regulation of major histocompatibility complex on neural stem cells and their lineages. Stem Cells Dev. 2008 Fév;17(1):53-65.

Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim D. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. Ann. Hematol. 2005 Oct;84(11):715-721.

Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood. 2005 Sep 1;106(5):1755-1761.

Zawada WM, Zastrow DJ, Clarkson ED, Adams FS, Bell KP, Freed CR. Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. Brain Res. 1998 Mar 9;786(1-2):96-103.

Zhao L, Duan W, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. Exp. Neurol. 2002 Mar;174(1):11-20.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. Neuron. 2008 Jan 24;57(2):178-201.

# Nouvelles stratégies pour la survie à long terme de xénogreffes neurales-Application à la maladie de Parkinson.

La transplantation intracérébrale est une approche prometteuse pour le traitement de la maladie de Parkinson mais les considérations éthiques encouragent le développement de la xénotransplantation et requiert la mise au point de stratégies immunosuppressives adaptées. Mon travail de thèse a permis d'étudier trois stratégies d'immunointervention en utilisant la transplantation de neuroblastes mésencéphaliques porcins (pNB) dans le striatum de rat. Une première approche a consisté à administrer de la minocycline. Une survie des pNB a été observée jusqu'à 63 jours pour 40% des rats. Le mécanisme à l'origine de cette survie reste à clarifier mais nos résultats suggèrent que la minocycline pourrait être utilisée en complément d'autres stratégies immunosuppressives, pour assurer la survie de xénogreffes intracérébrales. Une seconde approche a consisté à remplacer les pNB par des cellules moins immunogènes : les cellules souches neurales (CSN). Les expériences effectuées sur des rats immunocompétents ont révélé une survie prolongée des CSN porcines mais leur utilisation s'avère grandement limitée par leur faible différenciation en neurones dopaminergiques. La troisième stratégie a eu, quant à elle, pour objectif d'utiliser la différenciation spontanée des pNB en neurones dopaminergiques et les propriétés immunosuppressives des cellules souches mésenchymateuses (MSC). La survie des co-greffes pNB/MSC jusqu'à 120 jours pour 50% des rats et la présence de neurones TH+ au sein des greffons souligne l'intérêt de cette immunosuppression locale et suggère qu'une telle stratégie pourrait être utile pour assurer une survie à long terme de xénogreffe neuronale fonctionnelle.

Mots clefs : Parkinson, xénogreffe, réponse immunitaire, cellules souches mésenchymateuses, neuroblastes.

# New strategies for the long term survival of neural xenograft-Application to Parkinson's disease.

Intra-cerebral transplantation is a promising approach for the treatment of Parkinson's disease. However, ethical issues and problems of availability limit this approach. New cellular sources have therefore to be found. Foetal pig neuroblasts are an interesting candidate, but immunosuppressive treatments have to be developed to avoid cell rejection. During my PhD, I studied three immunosuppressive strategies in a xenotransplantation model of porcine neuroblasts (pNB) in rat striatum. The approach consisted of the administration of minocycline. After minocycline treatment and 63 days post transplantation, pNB survival was monitored in 40% of the rats. Although the survival mechanisms are not completely understood as of yet, my results suggest that minocycline might be used in addition to other immunosuppressive strategies to insure the long term survival of intra-cerebral xenografts. The second approach consisted of the use of porcine neural stem cells (NSC) for their low immunogenicity. An increased survival of porcine NSC in immune-competent rats was observed but they poorly differentiated into dopaminergic neurons. The aim of the last strategy was to co-graft pNB for their ability to differentiate in dopaminergic neurons and mesenchymal stem cells (MSC) for their immunosuppressive properties. A long term survival of pNB/MSC co-grafts 120 days post transplantation in 50% of the rats was then monitored. Furthermore, the presence of TH+ cells within the graft confirmed the need of local immunesuppression for cerebral xenotransplantation. In conclusion, this strategy might guarantee the long term survival of a functional neuronal xenograft.

Keywords: Parkinson, xenograft, immune response, mesenchymal stem cells, neuroblasts.