

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**LES REACTIONS IMMUNES DANS LES  
XENOGREFFES INTRACEREBRALES :  
MECANISMES ET PREVENTION**

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole Doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE**

**Discipline : Médecine**

**Spécialité : Neuroimmunologie**

*Présentée et soutenue publiquement par*

**MICHEL Delphine**

*Le 27 Avril 2007, devant le jury ci-dessous*

***Rapporteurs : Dr Afsaneh GAILLARD, UMR 6187, Poitiers***

***Dr Didier WION, INSERM U318, Grenoble***

***Examineurs : Pr Pascal DERKINDEREN, Service de neurologie, Nantes***

***Dr Michel MALLAT, INSERM U711, Paris***

***Directeurs de thèse : Dr Philippe BRACHET et Dr Philippe NAVEILHAN***

***INSERM U643, Nantes, Directeur : Pr Jean-Paul SOULILLOU***

# SOMMAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	p8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	p9
AVANT PROPOS.....	p11
<b>INTRODUCTION</b>	<b>p13</b>
<hr/>	
<b>I. LA MALADIE DE PARKINSON.....</b>	<b>p13</b>
<b>I.1. Symptomatologie</b>	p13
<b>I.2. Physiopathologie</b>	p14
<b>I.2.1. Les pertes neuronales</b>	p14
<b>I.2.2. Les corps de Lewy</b>	p15
<b>I.3. Etiologie</b>	p16
<b>I.3.1. Les facteurs environnementaux</b>	p17
I.3.1.1. Le MPTP	p17
I.3.1.2. Les infections précoces	p17
I.3.1.3. Les pesticides	p18
I.3.1.4. L'extase	p18
<b>I.3.2. Les facteurs génétiques</b>	p19
I.3.2.1. L' $\alpha$ -synucléine	p19
I.3.2.2. La parkine	p20
<b>I.4. Mécanismes de la mort neuronale</b>	p20
<b>I.4.1. Théorie du stress oxydatif</b>	p20
<b>I.4.2. Le rôle des cellules microgliales dans la MP</b>	p21
<b>I.5. Interventions thérapeutiques</b>	p23
<b>I.5.1. Les traitements pharmacologiques</b>	p23
<b>I.5.2. Le traitement chirurgical</b>	p24
<b>I.5.3. Les stratégies de protection et de réparation</b>	p24
I.5.3.1. La neuroprotection	p24
<i>a. Les anti-oxydants</i>	p24
<i>b. Les anti-inflammatoires</i>	p25
<i>c. Les anti-apoptotiques</i>	p25
<i>d. Les facteurs neurotrophiques</i>	p25
I.5.3.2. La substitution neuronale	p26
<b>CONCLUSION I</b>	p27

<b>II. LES DIFFERENTES STRATEGIES DE TRANSPLANTATION DANS LA MALADIE DE PARKINSON.....</b>	<b>p28</b>
--	------------

## **II.1. L'autotransplantation**

<b>II.2. L'allotransplantation</b>	p29
<b>II.2.1. L'expérimentation animale</b>	p29
<b>II.2.2. Les applications cliniques</b>	p30
<b>II.2.3. Les limites de l'allotransplantation neuronale</b>	p32
<b>II.3. La xénotransplantation</b>	p34
<b>II.3.1. La xénotransplantation comme alternative aux limites de l'allotransplantation</b>	
<b>II.3.2. Les risques sanitaires</b>	p35
<b>II.3.3. L'expérimentation animale</b>	p35
<b>II.3.4. Les essais cliniques</b>	p36
<b>CONCLUSION II</b>	p37
<b>III. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DU CERVEAU.....</b>	<b>p38</b>
<b>III.1. Caractéristiques anatomiques uniques du SNC</b>	p38
<b>III.1.1. Isolement de l'environnement extérieur</b>	p38
III.1.1.1 La boîte crânienne	p38
III.1.1.2. Les méninges	p39
<b>III.1.2. Isolement de l'environnement intérieur : la (BHE)</b>	p40
III.1.2.1 Organisation de la BHE	p41
III.1.2.2 Fonction de la BHE	p43
<b>III.2. Un drainage lymphatique particulier</b>	p44
<b>III.3. Les cellules à potentiel immunologique du SNC</b>	p46
<b>III.3.1. La microglie</b>	p46
III.3.1.1. Caractéristiques générales	p46
III.3.1.2. Microgliose	p47
<b>III.3.2. Les astrocytes</b>	p50
III.3.2.1. Caractéristiques générales	p50
III.3.2.2. Astrogliose	p52
<b>III.4. Le trafic leucocytaire</b>	p53
<b>CONCLUSION III</b>	p55
<b>IV. CARACTERISATION DU REJET DES XENOGREFFES INTRACEREBRALES.....</b>	<b>p56</b>
<b>IV.1. Absence de rejet hyper aigu</b>	p56
<b>IV.2. Le rejet humoral</b>	p57
<b>IV.2.1. Le rôle des immunoglobulines (Ig)</b>	p57
<b>IV.2.2. Le rôle du complément</b>	p58
<b>IV.3. Le rejet cellulaire</b>	p60
<b>IV.3.1. Le rôle des macrophages périvasculaires</b>	p60
<b>IV.3.2. Le rôle des cellules microgliales</b>	p60
<b>IV.3.3. Le rôle des astrocytes</b>	p62
<b>IV.3.4. Le rôle des cellules Natural Killer (NK)</b>	p62
<b>IV.3.5. Le rôle des lymphocytes T</b>	p63
<b>IV.4. La réponse cellulaire T en xénotransplantation</b>	p65
<b>IV.4.1. Les différents types de cellules T en périphérie</b>	p65
IV.4.1.1. Les cellules T CD4 <sup>+</sup>	p65
IV.4.1.2. Les cellules T CD8 <sup>+</sup>	p66

<b>IV.4.2. Le mécanisme d'activation des cellules T</b>	p68
IV.4.2.1. La reconnaissance antigénique	p68
a. Les différents types d'antigènes	p68
b. Les voies de reconnaissance	p69
IV.4.2.2. L'interaction TCR/CMH peptide	p70
III.4.2.3. La costimulation	p70
<b>IV.4.3. Les cellules présentatrices d'antigène dans le SNC</b>	p72
IV.4.3.2. La microglie	p72
IV.4.3.1. Les astrocytes	p73
IV.4.3.3. Les cellules endothéliales	p73
IV.4.3.4. Les macrophages périvasculaires	p74
<b>CONCLUSION IV</b>	p74
<b>V. LES CELLULES SOUCHES NEURALES.....</b>	<b>p76</b>
<b>V.1. Définition</b>	p76
<b>V.1.1. Les cellules souches neurales chez l'embryon</b>	p77
<b>V.1.2. Les cellules souches neurales chez l'adulte</b>	p78
<b>V.2. Isolement et prolifération des CSN in vitro</b>	p79
<b>V.3. Les cellules souches dans la MP</b>	p80
<b>V.3.1. L'autotransplantation</b>	p80
<b>V.3.2. L'allogreffe</b>	p81
<b>V.3.3. La xénotransplantation</b>	p82
<b>CONCLUSION V</b>	p82
<b>TRAVAIL DE THESE</b>	<b>p83</b>
<hr/>	
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....</b>	p83
- <b>PREMIERE PARTIE.....</b>	p85
<i>"Minocycline delays the rejection of xenogeneic neurons following their grafting into the rat brain" En préparation</i>	
<b>D. Michel, V. Nerrière-Daguin, P. Brachet, I. Neveu, P. Naveilhan.</b>	
- <b>DEUXIEME PARTIE.....</b>	p91
<i>"Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain" Exp. Neurol. 2006 (202): 76-84.</i>	
<b>D. Michel, V. Nerrière-Daguin, R. Josien, P. Brachet, P. Naveilhan, I. Neveu.</b>	
- <b>TROISIEME PARTIE.....</b>	p97
<i>"Comparison of porcine neuroblasts and neural precursor cells xenografts into the rat striatum" En préparation</i>	
<b>D. Michel, V. Nerrière-Daguin, P. Brachet, I. Neveu, P. Naveilhan.</b>	
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	p102

**BIBLIOGRAPHIE**.....p108

**ANNEXE**.....p142

*“Long-lasting coexpression of Nestin and Glial Fibrillary Acidic Protein in primary cultures of astroglial cells with major participation of Nestin+/GFAP- cells in cell proliferation” J. Neurosci. Res. 2006 (83): 1515-1524.*

S. Sergent-Tanguy, **D. Michel**, I. Neveu, P. Naveilhan.

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Fig. 1 : La voie dopaminergique nigrostriée*  
*Fig. 2 : Organisation des ganglions de la base*  
*Fig. 3 : Hypothèses étiologiques de la MP*  
*Fig. 4 : Les voies de dégradation de la dopamine*  
*Fig. 5 : Le cercle vicieux de l'activation microgliale et de la mort neuronale*  
*Fig. 6 : Hypothèse chronologique de la MP*  
*Fig. 7 : Localisation du MV*  
*Fig. 8 : Suivi des greffes neuronales*  
*Fig. 9 : Organisation de la boîte crânienne*  
*Fig. 10 : Les méninges*  
*Fig. 11 : Localisation de la BHE dans le SNC*  
*Fig. 12 : Constituants cellulaires de la BHE*  
*Fig. 13 : Les différents types de jonctions endothéliales*  
*Fig. 14 : Le drainage lymphatique du SNC*  
*Fig. 15 : La circulation des antigènes dans le SNC*  
*Fig. 16 : Les étapes de l'activation microgliale*  
*Fig. 17 : Les astrocytes et leurs fonctions*  
*Fig. 18 : La migration des leucocytes à travers la BHE*  
*Fig. 19 : La structure des immunoglobulines*  
*Fig. 20 : Le système du complément*  
*Fig. 21 : Schéma récapitulatif sur le mécanisme de rejet des xélogreffes intracérébrales*  
*Fig. 22 : La différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th1 et Th2*  
*Fig. 23 : La différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> en Tc1 et Tc2*  
*Fig. 24 : Le système cytotoxique perforine/granzyme*  
*Fig. 25 : Les voies de présentation antigénique*  
*Fig. 26 : Les molécules de costimulation*  
*Fig. 27 : Les voies de costimulation*  
*Fig. 28 : La neurogénèse*  
*Fig. 29 : La neurogénèse embryonnaire*  
*Fig. 30 : La neurogénèse adulte*  
*Fig. 31 : Composition des neurosphères dans les cultures de CSN*  
*Fig. 32 : Les mécanismes de protection de la minocycline*  
*Fig. 33 : Localisation périparenchymateuse des CD*  
*Fig. 34 : Cinétique d'infiltration de la greffe par les cellules immunitaires*  
*Fig. 35 : Localisation périvasculaire des LT et des CD*
- Tab. 1 : Symptômes associés à la MP*  
*Tab. 2 : Les facteurs sécrétés par les cellules microgliales activées.*

## LISTE DES ABREVIATIONS

**6-OHDA** : 6-hydroxydopamine  
**ADCC**: Antibody-dependant cell mediated cytotoxicity  
**ADN**: Acide désoxyribonucléique  
**ARNm**: Acide ribonucléique messenger  
**ATP**: Adenosine tri-phosphate  
**BDNF**: Brain-derived neurotrophic factor  
**bFGF**: basic Fibroblast growth factor  
**BHE**: Barrière hématoencéphalique  
**BrdU** : Bromodéoxyuridine  
**CD** : Cellule dendritique  
**CD** : Cluster of differentiation  
**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité  
**CNE** : Cellule neuroépithéliale  
**COMT** : Catéchol-O-méthyl transférase  
**CPA**: Cellule présentatrice d'antigène  
**CSN** : Cellule souche neurale  
**EAE** : Encéphalomyélite allergique expérimentale  
**EOPS** : Exempt d'organismes pathogènes spécifiques  
**FC**: Facteur de croissance  
**GAG** : Glycosaminoglycane  
**G-CSF**: Granulocyte colony-stimulating factor  
**GDNF**: Glial cell line-derived neurotrophic factor  
**GFAP**: Glial fibrillary acidic protein  
**GM-CSF**: Granulocyte/macrophage colony stimulating factor  
**GP**: Globus pallidus  
**ICAM-1** : Intercellular adhesion molecule-1  
**IGF**: Insulin-like growth factor  
**IL** : Interleukine  
**INF** : Interferon gamma  
**iNOS** : Inducible nitric oxyde synthase

**IVG:** Interruption volontaire de grossesse  
**LB :** Lymphocyte B  
**LCR :** Liquide céphalo-rachidien  
**L-DOPA :** Lévo-dopa  
**LPS :** Lipopolysaccharide  
**LT :** Lymphocyte T  
**MAC :** Complexe d'attaque membranaire  
**MANF:** Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor  
**MAO :** Monoamine oxydase  
**MCP-1 :** Monocyte chemoattractant protein  
**MDMA :** 3, 4-méthylendioxyamphétamine  
**MEC :** Matrice extracellulaire  
**MMP :** Métalloprotéinase matricielle  
**MP :** Maladie de Parkinson  
**MPP+ :** 1-méthyl-4-phénylpyridinium  
**MPTP :** 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine  
**MPV :** Macrophage périvasculaire  
**MV:** Mésencéphale ventral  
**NGF:** Nerve growth factor  
**NK:** Natural killer  
**NO :** Oxyde nitrique  
**NT :** Neurotrophine  
**PERV:** Porcin endogenous retrovirus  
**P-gp MDR :** Multidrug-resistance P-glycoprotein  
**PNE :** Précurseurs neuronaux embryonnaires  
**SEP :** Sclérose en plaque  
**SNC :** Système nerveux central  
**SNpc :** Substance noire pars compacta  
**Tc:** Lymphocyte T cytotoxique  
**TCR:** T cell receptor  
**TGF:** Transforming growth factor  
**TH:** Tyrosine hydroxylase  
**Th:** Lymphocyte T helper  
**TNF:** Tumor necrosis factor

**VCAM-1:** Vascular cell adhesion molecule-1

**XAN :** Xénoanticorps naturels

# AVANT-PROPOS

Il a longtemps été admis que la diminution du nombre de neurones et de leurs synapses correspondait à l'un des processus, qu'il soit cause ou conséquence, impliqué dans le vieillissement cérébral. Cependant, des études réalisées sur des populations âgées saines ont montré que ces pertes neuronales demeuraient limitées, même dans des structures comme l'hippocampe longtemps considéré comme particulièrement susceptible. Il convient donc de distinguer le vieillissement cérébral normal du vieillissement pathologique. Ce dernier se manifeste par le dysfonctionnement ou la mort d'un groupe de neurones relativement bien défini et spécifique d'une maladie neurodégénérative. C'est ainsi que dans la Chorée de Huntington ce sont les neurones gabaergiques du striatum qui dégènèrent alors que la maladie de Parkinson se caractérise par une perte sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta. Malheureusement, le diagnostic de ces maladies ne peut s'établir que lorsqu'une mort neuronale a réduit substantiellement les populations nerveuses menacées par le processus physiopathologique. C'est pourquoi, une intervention thérapeutique en amont destinée à prévenir ces pertes neuronales, est très difficile. Aussi, la plupart des stratégies ont été développées afin d'agir en aval, c'est-à-dire, pour pallier d'une façon ou d'une autre le rôle physiologique joué par les neurones dégénérés. Outre les diverses stratégies palliatives, le caractère sélectif des pertes neuronales a permis d'envisager le remplacement des neurones morts par de nouvelles cellules. Cette approche thérapeutique substitutive qui vise à remplacer les neurones perdus par des neuroblastes embryonnaires est donc aujourd'hui porteuse d'espoir. L'utilisation de tissu embryonnaire, dès qu'elle concerne l'être humain, présente néanmoins des limites d'ordre éthique et logistique. C'est afin de s'affranchir de ces problèmes que la greffe de cellules embryonnaires issues d'autres espèces, c'est-à-dire la xénotransplantation a été envisagée. Cependant, bien que le système nerveux central (SNC) soit connu pour la spécificité de son organisation immunologique, les xéno greffes conduisent presque systématiquement à une réaction de rejet du receveur. Dès lors, la xénotransplantation intracérébrale constitue un modèle d'étude intéressant du statut immunologique du SNC.

Les cellules microgliales correspondent les cellules sentinelles du SNC et assurent l'immunosurveillance du cerveau. Elles sont ainsi rapidement activées suite à la

transplantation intracérébrale. Néanmoins, leur rôle précis au cours du processus de rejet des xéno greffes demeure confus. C'est pourquoi, la première partie de mon travail de thèse a eu pour objectif d'étudier les conséquences d'une inhibition de l'activation microgliale.

Le rejet des xéno greffes est principalement médié par les lymphocytes qui pénètrent massivement dans le parenchyme nerveux au moment du rejet, 5 à 7 semaines après la transplantation. Toutefois, les mécanismes responsables du recrutement de ces lymphocytes étant peu connus, nous avons entrepris, dans la deuxième partie de ce travail, de rechercher la présence de cellules susceptibles d'initier et de recruter des lymphocytes naïfs.

Enfin, la nature de la suspension cellulaire jouant un rôle important sur la réponse immune engendrée, nous avons entrepris une étude comparative entre des greffes de neuroblastes porcins et de précurseurs neuronaux porcins. Ces derniers sont en effet, caractérisés par un phénotype plus immature qui pourrait favoriser leur survie après transplantation.

# INTRODUCTION

## I. LA MALADIE DE PARKINSON

Le vieillissement cérébral normal présente des caractéristiques différentes de celles du vieillissement pathologique. Ainsi, la perte des neurones chez une personne âgée saine est minimale, alors que cette perte est massive, irréversible et sélective chez une personne souffrant d'une maladie neurodégénérative telle que la maladie de Parkinson (MP). C'est le britannique James Parkinson en 1817 qui décrit pour la première fois les symptômes caractéristiques de cette affection. La prévalence de la maladie est de 2 pour 1000 dans la population générale et s'élève à 2% au-delà de 65 ans (Lang and Lozano, 1998b, 1998a). D'autre part, avec le vieillissement démographique, la prévalence de la maladie tend à augmenter et atteint un poids socio-économique en augmentation constante.

### I.1. Symptomatologie

La MP est une maladie neurodégénérative progressive qui fut initialement qualifiée de « paralysie agitante » par James Parkinson. Le terme paralysie faisait référence à la difficulté d'amorcer des mouvements, symptôme désormais connu sous le terme de bradykinésie, et le qualificatif agitante représentait les tremblements. Parkinson a également décrit des troubles de la démarche ainsi que des altérations des réflexes posturaux. D'un point de vue clinique, on s'accorde aujourd'hui pour décrire sous le nom de syndrome parkinsonien l'association entre tremblements de repos, akinésie/bradykinésie et rigidité. L'akinésie

#### **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

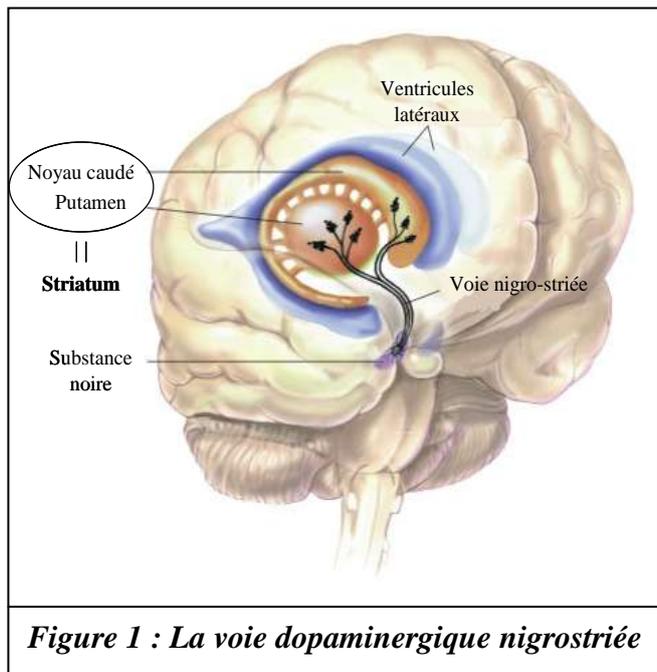
est le maître symptôme, caractérisé par des troubles de l'initiation et de l'exécution du mouvement dont la vitesse et l'amplitude sont également diminuées.

L'akinésie rend notamment difficile la réalisation des gestes fins tels que l'écriture (micrographie) et se retrouve également au niveau du visage (appauvrissement de la mimique), 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 répertoriées dans le tableau 1 se combinent entre elles selon les patients. La MP reste avant tout une maladie motrice, cependant, des atteintes cognitives et des désordres psychiatriques peuvent également apparaître et perturber la vie sociale et la prise en charge du patient.

## **I.2. Physiopathologie**

### **I.2.1. Les pertes neuronales**

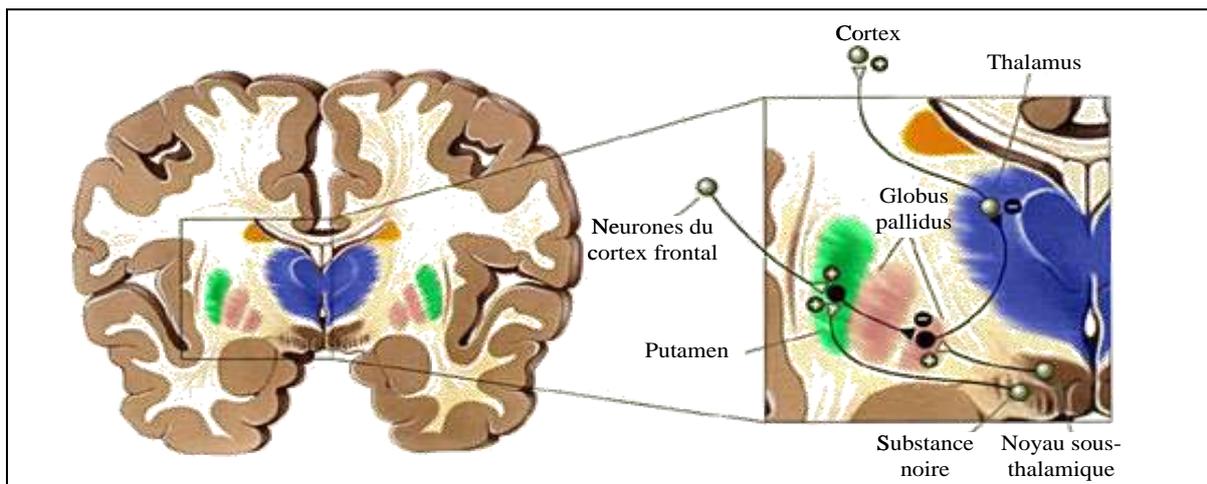
La MP se caractérise principalement par la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc) (Hornykiewicz, 1966). Cette population de neurones projette ses axones dans les noyaux gris centraux (putamen et noyau caudé, ou striatum) pour former la voie dopaminergique nigro-striée (Fig.1). Cinquante à 60% de ces neurones dopaminergiques ont disparu lorsque les premiers symptômes de la maladie apparaissent (Agid, 1991).



**Figure 1 : La voie dopaminergique nigrostriée**

La MP touche de manière moins importante d'autres neurones dopaminergiques (40 à 50%) dans la région médiane et médioventrale du mésencéphale.

Ces pertes neuronales occasionnent une diminution de la concentration cérébrale en dopamine et, par conséquent, un affaiblissement de la stimulation des récepteurs dopaminergiques du striatum. La dégénérescence de la voie nigro-striée induit alors un dysfonctionnement du circuit des ganglions de la base qui participe à la boucle dite « squelette-motrice » responsable des mouvements à effectuer et dont le fonctionnement est résumé figure 2.



**Figure 2 : Organisation des ganglions de la base.**

*Au repos les neurones du globus pallidus (GP) sont spontanément actifs et exercent une inhibition sur le thalamus. Lorsque survient une activation de la boucle en provenance du cortex, les neurones du striatum sont activés et inhibent ceux du GP. Ces derniers étant moins actifs, libèrent les cellules du thalamus de leur inhibition. L'activation du thalamus qui en résulte a pour effet de faciliter l'activité corticale. Les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc) participent à cet équilibre en inhibant les neurones du GP ce qui favorise l'activation thalamique et corticale. La perte des neurones dopaminergiques induit par conséquent la perte de l'inhibition du GP et donc la paralysie des voies thalamique et corticale responsables de l'absence de contrôle des mouvements.*

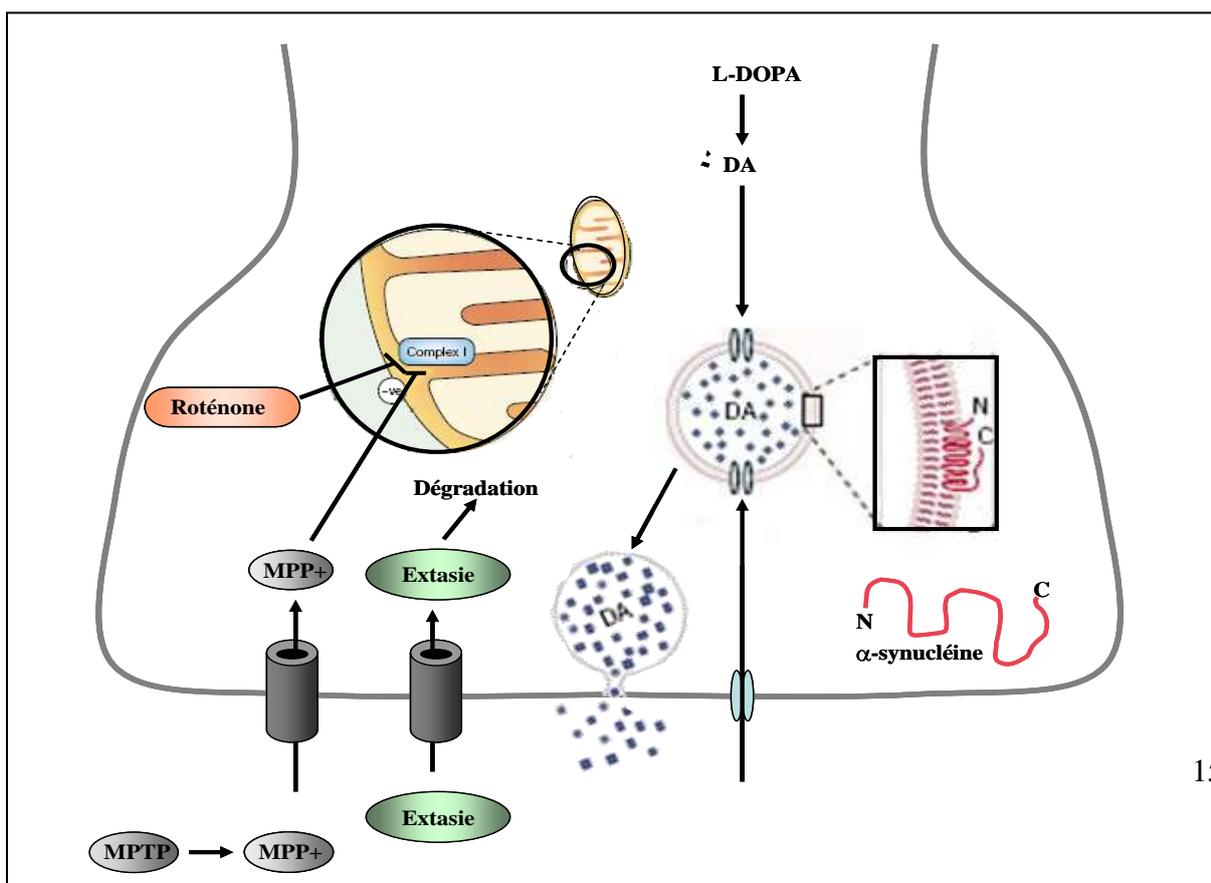
Bien que la perte des neurones dopaminergiques soit massive et relativement sélective dans la MP, certains signes cliniques peuvent persister après la prise des traitements visant à rétablir les taux physiologiques de dopamine. Cette observation suggère que des systèmes non dopaminergiques sont également altérés dans la maladie. Des lésions des neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Hirsch et al., 1988), des neurones adrénérgiques de la medulla oblongata (Gai et al., 1993) ainsi que des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert (Whitehouse et al., 1983) ont été décrites. D'autre part, les neurones sérotoninergiques du raphé peuvent également être affectés et pourraient ainsi être responsables du syndrome dépressif rencontré chez certains parkinsoniens (Mayeux, 1990).

### I.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 de petites inclusions sphériques avec un cœur dense et granuleux entouré par un halo de filaments périphériques. Ces corps de Lewy sont notamment retrouvés dans les neurones dopaminergiques de la SNpc (Gibb et al., 1991). On ignore s'ils sont une conséquence de la souffrance neuronale, ou s'ils participent au processus dégénératif (Agid, 1991; Langston, 1996). Toutefois, ces inclusions contiennent de l' $\alpha$ -synucléine, une protéine dont la mutation est responsable des formes génétiques de la maladie (voir I.3.2.1) (Polymeropoulos et al., 1997). Par ailleurs, la présence de neurofilaments et de tubulines dans ces inclusions suggère une altération du cytosquelette (Goldman et al., 1983). On notera cependant, que les corps de Lewy ne sont spécifiques ni de la SNpc ni de la MP. En effet, ces inclusions peuvent également être présentes dans d'autres affections du SNC telles que la maladie d'Alzheimer ou même au cours du vieillissement normal (Fearnley and Lees, 1991).

### I.3. Etiologie

Il existe actuellement un vif débat dans le monde scientifique en ce qui concerne l'étiologie de la MP. La difficulté est de discerner les événements à l'origine de la mort des neurones de ceux qui sont une conséquence de leur souffrance et de leur mort. Les facteurs étiologiques sont divers et laissent penser à une origine multifactorielle de la maladie.



---

**Figure 3 : Hypothèses étiologiques de la maladie de Parkinson**

**I.3.1. Les facteurs environnementaux**

L'influence des facteurs environnementaux dans les processus physiopathologiques de la MP s'est avérée grâce à de nombreuses études cliniques et épidémiologiques qui ont démontré que l'exposition à certains composés chimiques synthétiques était associée à une augmentation de l'incidence de la maladie.

**I.3.1.1. Le MPTP**

L'un des événements les plus marquants en faveur de cette hypothèse est la description en 1979 d'un syndrome parkinsonien survenu brutalement dans un groupe de jeunes adultes californiens qui avaient consommé un mauvais lot de drogue synthétique illicite, la mépéridine, substitut de l'héroïne (Davis et al., 1979; Langston et al., 1999). Le produit toxique fut ensuite identifié : le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Langston et son équipe ont ensuite mis en évidence le rôle spécifique et mortel du MPTP sur les neurones dopaminergiques du système nigro-striée chez l'homme comme chez les modèles animaux (Langston et al., 1999). En effet, le radical libre 1-méthyl-4-phénylpyridinium ( $MPP^+$ ), produit par l'oxydation du MPTP par la monoamine oxydase-B (MAO-B) est capté par les sites de recapture de la dopamine et détruit les neurones en inhibant l'activité du complexe I de la mitochondrie (Przedborski et al., 2004) (Fig. 3). De façon surprenante, une grande hétérogénéité interindividuelle est apparue dans le groupe de jeunes intoxiqués au MPTP ; alors que certains patients développaient un syndrome parkinsonien immédiatement après l'exposition, pour d'autre la dégénérescence s'est poursuivie dans les mois et les années qui ont suivi l'injection avec une prolifération microgliale constante dans la SNpc (Orr et al., 2002). Le MPTP, en détruisant sélectivement et progressivement les neurones dopaminergiques reflétant la physiopathologie de la MP, est désormais largement utilisé pour générer des modèles animaux de la maladie. Néanmoins, contrairement à la souris et au singe, le rat a la particularité de posséder une grande quantité de MAO-B au niveau de ses vaisseaux sanguins aussi, le  $MPP^+$  est dégradé avant de traverser

la barrière hématoencéphalique (BHE). C'est pourquoi, ce modèle n'est réalisable chez le rat que suite à l'injection intra-cérébrale du composé par stéréotaxie.

### **I.3.1.2. Les infections précoces**

Comme nous venons de le voir, le syndrome parkinsonien peut apparaître de nombreuses années après l'exposition aux produits toxiques et résulte d'un processus de perte neuronale progressif accompagné d'une forte activation microgliale. Suite à cette observation, il a été proposé qu'une atteinte prénatale ou précoce du cerveau pouvait enclencher le processus neurodégénératif et la perte progressive des neurones dopaminergiques (Martyn and Osmond, 1995). Ainsi, une infection intra-utérine pourrait induire une perte cellulaire dans la substance noire (SN) du cerveau embryonnaire (ou mésencéphale ventral) prédisposant les individus affectés à développer la maladie en raison d'un faible nombre de neurones dopaminergiques inné (Landrigan et al., 2005; Logroscino, 2005). Cette prédisposition accompagnée des lésions inflammatoires secondaires liées au vieillissement normal ou à une infection, pourrait induire l'apparition du syndrome parkinsonien. Il a d'ailleurs été montré que les infections systémiques pouvaient jouer un rôle important dans la progression du processus neurodégénératif (Perry et al., 2003).

### **I.3.1.3. Les pesticides**

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 incluant notamment une perte des neurones dopaminergiques de la SNpc (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> (Brooks et al., 1999). Des études épidémiologiques ont révélé une relation dose-réponse positive entre les expositions cumulées au cours du temps et le risque de développer la MP (Liou et al., 1997). La **roténone**, un puissant insecticide, induit également les symptômes cliniques et pathologiques caractéristiques de la MP incluant la perte sélective des neurones dopaminergiques nigro-striés via l'inhibition de l'activité du complexe I des mitochondries (Liu et al., 2003) (Fig.3). De nombreux autres composés chimiques ont été décrits pour leurs effets neurotoxiques délétères tel que le **maneb** (fongicide) (Thiruchelvam et al., 2000), mais également les métaux lourds ( manganèse, fer, zinc, cuivre, mercure et magnésium).

#### **I.3.1.4. L'extasie**

L'extasie (ou 3,4-methylenedioxyamphétamine, MDMA), une drogue aux effets euphorisants très populaire chez certains jeunes adultes, a un effet désastreux sur les neurones dopaminergiques (Fig.3). Dans le cadre d'une étude réalisée chez des singes et reproduisant les taux moyens de consommation chez les jeunes, deux des primates sont rapidement morts et les autres présentaient une perte de 40% de leurs neurones dopaminergiques (Ricaurte et al., 2002). L'extasie semble donc cibler les neurones dopaminergiques et prédisposer les jeunes consommateurs à développer la MP.

#### **I.3.2. Les facteurs génétiques**

Même si la forme sporadique idiopathique de la MP semble être la plus répandue, un facteur génétique est impliqué dans 10 à 15% des cas (de Silva et al., 2000; Mouradian, 2002). Cette implication génétique a été suspectée lorsqu'un nombre important de personnes de la même famille, à Contursi en Italie, ont développé la MP. De façon plus générale, il semblerait que les syndromes parkinsoniens qui apparaissent après 50 ans mettent en jeu des facteurs étiologiques environnementaux alors qu'avant cet âge, une origine génétique serait davantage incriminée (Tanner et al., 1999). En effet, de nombreuses mutations génétiques ont été recensées comme étant associées à des formes familiales rares de la MP. Les gènes mis en cause ont été regroupés sous le terme de PARK. Ainsi, alors que certains de ces gènes PARK ont pu être identifiés, d'autres restent encore méconnus.

##### **I.3.2.1. PARK 1 : L' $\alpha$ -synucléine**

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 dès 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 est principalement localisée au niveau des terminaisons présynaptiques. 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 (Fig.3). La mutation de la protéine induirait alors un changement de conformation qui l'a rendrait incapable de

former les vésicules. Il en résulterait une accumulation intracytoplasmique de la dopamine et un stress oxydatif qui conduirait à la mort des neurones (Goedert, 2001; Lotharius and Brundin, 2002).

### **I.3.2.2. PARK 2 : La parkine**

De nombreuses mutations du gène PARK 2 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 correspond à une ubiquitine ligase, enzyme clé du catabolisme des protéines via le système du protéasome (Giasson and Lee, 2001). La mutation du gène conduit alors à la formation d'une protéine inefficace pour la protéolyse, ce qui entraîne une accumulation protéique anormale (Kitada et al., 2000).

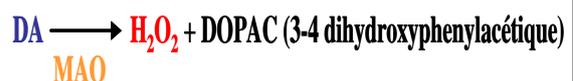
Il semblerait que d'autres gènes PARK, impliqués dans le processus d'ubiquitination / dégradation de protéines, provoquent une MP après mutation (Moore et al., 2003). C'est notamment le cas du gène PARK 5 codant pour l'ubiquitine-C-hydrolase (Lansbury and Brice, 2002).

## **I.4. Mécanismes de la mort neuronale**

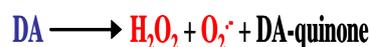
### **I.4.1. Théorie du stress oxydatif**

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 oxidases (MAO), l'autre non-enzymatique est provoquée par une auto-oxydation (Fig. 4). Par ailleurs, les neurones dopaminergiques

#### **• Dégradation oxydative enzymatique**



#### **• Dégradation auto-oxydative**



**Figure 4 : Les voies de dégradation de la dopamine.**

La dégradation oxydative utilise la MAO pour produire du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Maker et al., 1981). La dégradation auto-oxydative donne simultanément du peroxyde d'hydrogène ainsi que

contiennent d'importante quantité de mitochondries et la chaîne respiratoire localisée dans la membrane interne de ces dernières, est également génératrice de radicaux libres.

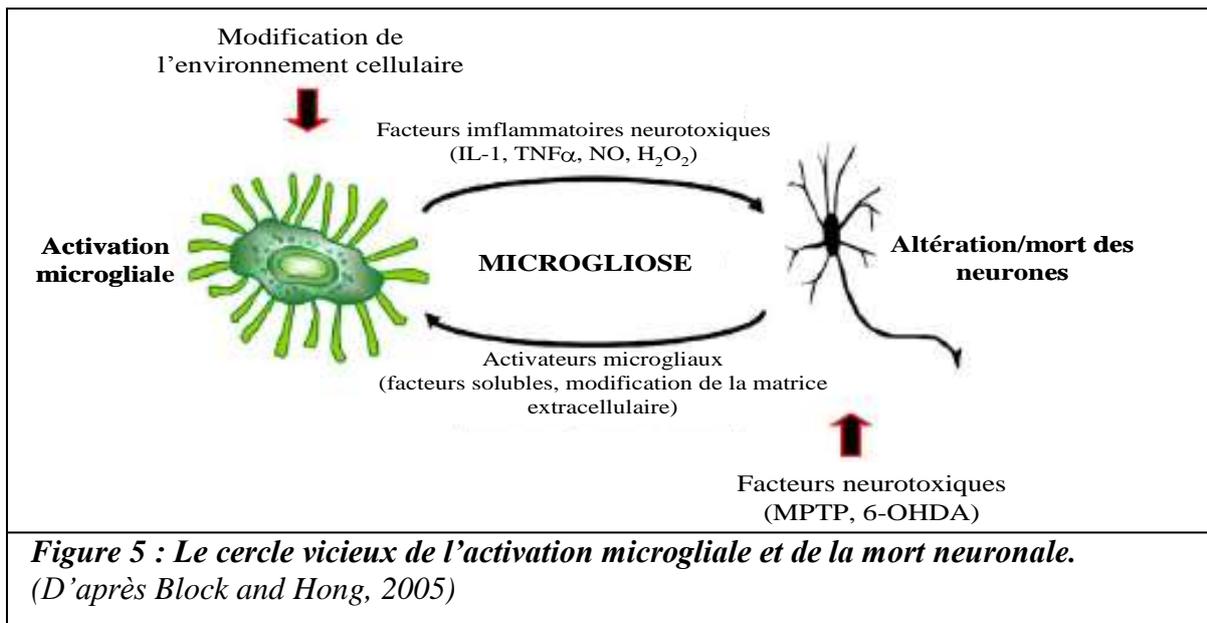
Aussi, chez les patients atteints de la MP, de nombreux indices de stress oxydatif sont observés dans la SNpc. Selon Jenner et son équipe, les cellules nigrales se retrouveraient en condition de stress oxydatif de façon 8 fois plus importante dans la SNpc de parkinsoniens par rapport à un individu sain (Jenner, 1998). Par ailleurs, les astrocytes qui sont les seules cellules à disposer de la glutathion peroxydase, enzyme clé pour la détoxification des radicaux libres, sont peu nombreux dans la SNpc (Damier et al., 1993). Plus particulièrement, la quantité de glutathion, co-substrat nécessaire à la détoxification des radicaux libres via la glutathion peroxydase, est significativement diminuée dans la SNpc au cours de la MP (Sian et al., 1994). Par ailleurs, un déficit en complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale a également été observé (Schapira, 1994).

Il existe des théories autres que le stress oxydatif pour expliquer l'initiation de 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 (pour revue : Fahn and Cohen, 1992). A ce sujet, l'analyse de l'implication des cellules microgliales dans le processus physiopathologique de la maladie renforce cette hypothèse comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

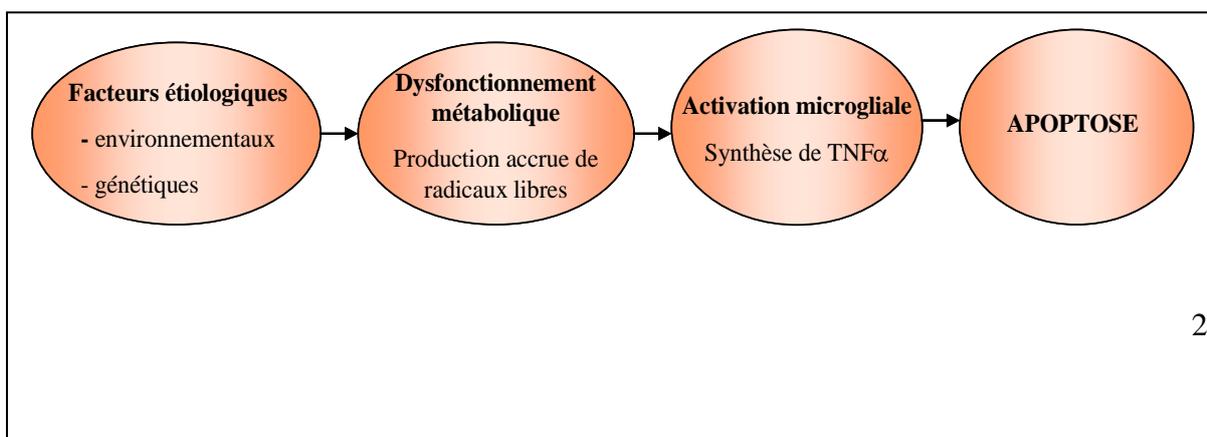
#### **I.4.2. Le rôle des cellules microgliales dans la MP**

L'étude de la composition cellulaire de la SN chez un individu sain révèle une quantité importante de cellules microgliales. Il a d'ailleurs été montré que l'injection intracérébrale de lipopolysaccharide (LPS) chez le rat, induit une forte activation microgliale qui se traduit par une perte sélective des neurones dopaminergiques de la SN (Arimoto and Bing, 2003). Cette observation suggère une implication de la microglie dans la pathologie. Cependant, on ne sait toujours pas à l'heure actuelle si l'activation de la microglie est une cause ou une conséquence de la perte neuronale. En fait, un cercle vicieux liant la mort des neurones et l'activation microgliale a été proposé (Fig. 5).

De nombreuses études, chez l'homme et l'animal, ont révélé que la proportion de cellules microgliales activées augmentait avec l'âge même chez des sujets sains (sans traumatisme ni désordre neurodégénératif préalable) (Mackenzie and 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.



Le rôle spécifique des cellules microgliales sur les neurones demeure toutefois contradictoire avec un côté « Dr Jekyll » via la libération de facteurs neurotrophiques (Mallat et al., 1989; Elkabes et al., 1996) et un côté « Mr Hyde » en raison de la synthèse de nombreuses espèces réactives (pour revue : Morale et al., 2006). Par ailleurs, des études ont révélé que les neurones dopaminergiques disposent de récepteurs au  $TNF\alpha$  (Boka et al., 1994). Or, la fixation du  $TNF\alpha$  sur son récepteur neuronal le p75 induirait un programme d'apoptose, mécanisme final responsable de la mort des neurones dans la MP (Fig. 6) (Damier, 1997; McGuire et al., 2001). Ainsi, la microglie activée en sécrétant le  $TNF\alpha$  pourrait avoir un rôle délétère pour les neurones dopaminergiques, particulièrement depuis que des études ont montré le rôle protecteur des inhibiteurs de l'activation microgliale dans la MP (Liu, 2006; McCarty, 2006).



---

**Figure 6: Hypothèse chronologique de la MP.**

*L'agent étiologique environnemental ou génétique pourrait entraîner un dysfonctionnement métabolique responsable d'une production accrue de radicaux libres oxygénés. Les conséquences de l'excès de radicaux libres seraient surtout marquées dans la population neuronale la plus vulnérable au stress oxydatif, les neurones dopaminergiques de la SNpc. Ces perturbations neuronales déclencheraient alors une activation microgliale, capable de produire des cytokines telles que le TNF $\alpha$  à l'origine de la mise en route du programme d'apoptose (D'après Damier, 1997).*

## **I.5. Interventions thérapeutiques**

La MP est caractérisée par une perte neuronale dopaminergique qui conduit à un déficit en dopamine dans le striatum. C'est pourquoi, les stratégies thérapeutiques se sont orientées vers une reconstitution de la concentration dopaminergique intracérébrale.

### **I.5.1. Les traitements pharmacologiques**

Indéniablement, les agents pharmacologiques jouent un rôle important dans le traitement symptomatique de la MP. Les améliorations comportementales observées suite à l'apport du précurseur dopaminergique, la lévodopa (L-DOPA), réserve à ce médicament la place de traitement de référence de la maladie. C'est en 1969 que Cotzias et son équipe ont observé qu'une administration orale de L-DOPA avait des effets spectaculaires, à court et à long terme sur la symptomatologie de la MP (Cotzias et al., 1969). En effet, la dopamine ne pouvant traverser la BHE, c'est la L-DOPA qui est largement utilisée. Une fois convertie en dopamine par la dopa-décarboxylase cérébrale, la L-DOPA permet une augmentation de la concentration de dopamine dans le striatum et provoque un soulagement des symptômes parkinsoniens. Toutefois, après une période nommée « lune de miel », durant laquelle le traitement demeure efficace, sur le long terme, la dopathérapie présente des fluctuations d'efficacité. Celles-ci se manifestent par une réapparition temporaire de la symptomatologie parkinsonienne, ou des dyskinésies c'est-à-dire des mouvements anormaux involontaires (Derkinderen and Vidailhet, 2002; Thobois et al., 2005). Ces complications apparaissent dans 60% des cas après 5 ans de traitement et dans 90% des cas après 10 ans de traitement. Dans le but de réduire ces complications motrices, 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). A l'inverse de la L-DOPA, leur activité pharmacologique est indépendante du stock de neurones dopaminergiques puisqu'ils agissent directement sur les récepteurs post-synaptiques qui sont en partie préservés au cours de la maladie (Playford and Brooks, 1992). Cependant, les

agonistes dopaminergiques semblent moins efficaces que la L-DOPA, si bien qu'une association avec cette dernière est nécessaire pour une optimisation du traitement.

Outre l'apport de dopamine ou l'administration d'agonistes dopaminergiques, des traitements pharmacologiques ciblent les enzymes participant 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).

### **I.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 les tremblements intenses observés chez des patients présentant des lésions cérébrales (Benabid et al., 1987). Puis, cette technique a rapidement été adaptée à la MP. La stimulation des noyaux subthalamiques améliore significativement la symptomatologie parkinsonienne, réduit les fluctuations motrices à l'origine des dyskinésies et permet la réduction voire l'arrêt de la prise de L-DOPA (Limousin et al., 1998). Néanmoins, le nombre des candidats potentiels à cette chirurgie demeure limité car seuls des patients relativement jeunes atteints de formes idiopathiques de la MP et répondant favorablement à la L-DOPA peuvent y prétendre. En outre, le coût de cette chirurgie demeure très élevé.

### **I.5.3. Les stratégies de protection et de réparation**

Outre les traitements pharmacologiques et chirurgicaux qui agissent davantage sur les symptômes de la MP dans le but d'améliorer le quotidien des patients, des stratégies parallèles se sont développées afin de stopper la progression de la maladie. Il s'agit d'une part de la neuroprotection qui vise à enrayer le processus neurodégénératif et d'autre part, de la transplantation intracérébrale visant à rétablir une transmission dopaminergique physiologique (pour revue : Bonuccelli and Del Dotto, 2006).

#### **I.5.3.1. La neuroprotection**

La protection des neurones dopaminergiques contre le processus dégénératif dans la MP peut être envisagée à différents niveaux d'évolution de la perte neuronale.

### **a. Les anti-oxydants**

La théorie du stress oxydatif étant à ce jour l'hypothèse étiologique la plus défendue, différents anti-oxydants ont été testés. Plus particulièrement, la selegiline, un puissant inhibiteur de la MAO-B, également connu pour ses propriétés anti-oxydantes permet de réduire le mécanisme apoptotique et peut présenter une action neurotrophique (Ebadi et al., 2002). Une étude clinique a été réalisée à la fin des années 80 et a révélé que la selegiline pouvait retarder la prise de L-DOPA et entraîner une légère amélioration symptomatique mais que ses effets bénéfiques étaient de courte durée (Shoulson, 1998).

### **b. Les anti-inflammatoires**

La plupart des études portant sur le processus neurodégénératif s'accordent pour attribuer un rôle important aux cellules microgliales dans la physiopathologie de la maladie. Aussi, des traitements par des agents anti-inflammatoires ont également été envisagés. Plus particulièrement, il a été montré que la minocycline, un antibiotique semi synthétique récemment décrit pour ses propriétés anti-inflammatoires (Yrjanheikki et al., 1998) pouvait induire une augmentation de la survie des neurones dopaminergiques dans des modèles animaux de la maladie (Du et al., 2001; He et al., 2001; Quintero et al., 2006).

### **c. Les anti-apoptotiques**

La mort des neurones dopaminergiques semblant être due à un processus apoptotique caspase-dépendant, les drogues à potentiel anti-apoptotique représentent une stratégie neuroprotectrice intéressante. Dès lors, les inhibiteurs de caspases (cyclosporine A) ainsi que les inhibiteurs de relargage du cytochrome C par les mitochondries (minocycline) sont potentiellement utilisables pour inhiber la mort des neurones. Cette possibilité est confortée par le fait que des souris transgéniques surexprimant le gène anti-apoptotique bcl-2 sont résistantes à la toxicité induite par le MPTP (Offen et al., 1998; Yang et al., 1998). Néanmoins, l'importance physiologique du processus de mort programmée dans les autres tissus, nécessite d'envisager l'utilisation de ces traitements anti-apoptotiques avec précautions.

### **d. Les facteurs neurotrophiques**

Une autre approche thérapeutique est basée sur la protection des neurones via l'apport de facteurs neurotrophiques, protéines connues pour empêcher la mort neuronale pendant le développement embryonnaire mais également chez l'adulte en cas de lésion. Certains de ces

facteurs ont été rapportés pour leur effet neuroprotecteur et leur utilisation potentielle dans le traitement de la MP. Le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor), le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Hoglinger et al., 1998; Erickson et al., 2001) sont les principaux facteurs neurotrophiques actifs sur les neurones dopaminergiques. En effet, la microinjection de GDNF dans le striatum ou la SNpc induit une protection des neurones dopaminergiques dans des modèles animaux de la MP (Tang et al., 1998; Bjorklund et al., 2000). Cependant, les études cliniques ont jusqu' alors donné des résultats mitigés et contradictoires (Gill et al., 2003; Nutt et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré que le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) pouvait avoir un effet protecteur via l' interruption de la cascade neurodégénérative (Guo et al., 1999). Plus récemment, Petrova et son équipe ont rapporté l' existence d' un facteur neurotrophique spécifique des neurones dopaminergiques, le MANF (Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor) sécrété par les astrocytes du mésencéphale (Petrova et al., 2004). Ce dernier, en combinaison avec d' autres facteurs pourrait permettre une protection significative des neurones dopaminergiques.

Bien que les facteurs neurotrophiques aient démontré leur efficacité dans des modèles animaux de la MP, leur incapacité à transiter à travers la BHE nécessite leur administration locale directe par injection intracérébrale. Expérimentalement, une libération locale du facteur neurotrophique peut être obtenue via l' utilisation de pompes osmotiques (Yurek, 1998) ou par l' implantation de microsphères biodégradables (Menei et al., 2000). Alternativement, des vecteurs viraux recombinants exprimant le GDNF, par exemple, ont démontré leur efficacité dans des modèles animaux de la MP (Bjorklund et al., 2000). Cependant, la symptomatologie parkinsonienne n' apparaissant qu' après une mort neuronale substantielle (60% des neurones dopaminergiques), il semble difficile de concevoir une récupération fonctionnelle en procédant à la neuroprotection des neurones restants. En revanche, cette chirurgie intracérébrale consistant à apporter des facteurs neurotrophiques prendrait tout son sens si le diagnostic de la maladie pouvait être établi plus précocément.

L' utilisation des facteurs neurotrophiques présente cependant un intérêt certain dans les thérapies par substitution cellulaire (*voir I.5.3.2*). En effet, il a été montré que le prétraitement par des facteurs neurotrophiques ou l' addition de ces facteurs à la suspension cellulaire permettrait une augmentation significative du taux de survie des neuroblastes transplantés (Mayer et al., 1993; Sauer et al., 1993; Yurek et al., 1996; Sullivan et al., 1998).

### **I.5.3.2. La substitution neuronale**

Le potentiel de régénération du système nerveux central (SNC) de l'adulte étant très limité, la transplantation neuronale a été rapidement proposée comme stratégie réparatrice dans les maladies neurodégénératives. Elle paraît particulièrement applicable lorsque la mort neuronale concerne des populations homogènes sur le plan neuroanatomique et neurochimique. La perte sélective des neurones dopaminergiques de la SNpc a fait de la MP un modèle de choix pour le développement de cette approche. En effet, les neurones atteints sont bien caractérisés et leur cible principale, le striatum correspond à une structure anatomique complexe mais bien définie et facilement accessible.

## **CONCLUSION I**

Au cours de la dernière décennie, des progrès remarquables ont été réalisés pour la compréhension de la biologie de la MP. Ces avancées ont permis d'envisager des thérapies nouvelles d'abord en ce qui concerne les améliorations symptomatiques de la maladie via le développement de nombreux médicaments pouvant notamment protéger les neurones dopaminergiques. Mais l'espoir thérapeutique majeur, réside dans le potentiel réparateur que représente la substitution neuronale. En effet, le remplacement des neurones perdus par des neurones sains pourrait déboucher sur une restauration fonctionnelle et donc, un arrêt des traitements pharmacologiques. Dans ce domaine de nombreuses études ont déjà été réalisées comme nous allons le détailler dans le paragraphe suivant.

## **II. LES DIFFERENTES STRATEGIES DE TRANSPLANTATION DANS LA MALADIE DE PARKINSON**

Face à l'enjeu que représente la substitution neuronale, de nombreuses équipes de recherche, y compris la nôtre, étudient qu'elles cellules seraient potentiellement les meilleures candidates pour induire une réparation fonctionnelle optimale après leur transplantation intracérébrale. C'est ainsi que de nombreuses voies de recherche se sont développées aussi bien dans le domaine de l'auto-, de l'allo- ou de la xénotransplantation.

### **II.1. L'autotransplantation**

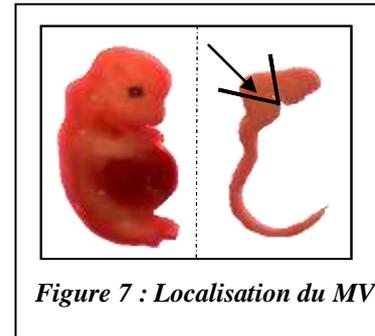
Les premières tentatives de transplantation chez l'homme ont été effectuées vers le milieu des années 80, à partir de fragments tissulaires issus d'une glande médullo-surrénale (Backlund et al., 1985; Madrazo et al., 1988). Cependant, la survie de ces cellules placées en conditions ectopiques dans le SNC étant de courte durée, leur intégration dans le réseau striatal était impossible. Ce type d'intervention provoquait, en outre, une importante morbidité liée à la double intervention chirurgicale (abdominale puis neurochirurgicale). Cette voie a donc été totalement abandonnée mais a conforté l'opinion scientifique dans l'intérêt de l'utilisation de cellules neurales fœtales (Dunnett et al., 2001).

L'implantation de cellules autologues génétiquement modifiées pour libérer de la dopamine correspond à une approche largement étudiée pour restaurer les taux dopaminergiques striaux. Ainsi, des fibroblastes isolés de la peau de rats et génétiquement modifiés pour exprimer le gène de la tyrosine hydroxylase (TH), première enzyme de synthèse des catécholamines, induisent la libération de L-DOPA après transplantation intrastriatale (Wolff et al., 1989; Fisher et al., 1991). Cependant, le devenir de telles cellules dans le SNC reste mal compris. L'utilisation de virus amenant le gène de la TH directement dans le striatum permet également d'augmenter les concentrations dopaminergiques. Toutefois, ces approches sont restées dans le domaine de l'expérimentation animale (During

et al., 1994; Horellou et al., 1994). La libération constitutive de dopamine ne semble pas aussi efficace pour améliorer les symptômes parkinsoniens que la transplantation de neurones dopaminergiques car ceux-ci régulent le métabolisme de la dopamine et sont susceptibles d'établir des synapses fonctionnelles (Bjorklund, 1992, 1993).

## **II.2. L'allotransplantation**

L'emploi des neuroblastes, neurones embryonnaires encore immatures, comme source de cellules implantables dans le cas de la MP est le plus étudié depuis une trentaine d'années. Les cellules destinées à être greffées sont obtenues à partir du mésencéphale ventral (MV) fœtal (Fig. 7), qui correspond à l'ébauche de la SN lors du développement embryonnaire.



*Figure 7 : Localisation du MV*

A ce stade du développement, les neurones dopaminergiques de la SN amorcent leur différenciation terminale. Les cellules sont donc prélevées, puis greffées dans le striatum hôte afin que leurs axones recolonisent en partie cette structure et rétablissent l'apport en dopamine pour une restauration fonctionnelle.

### **II.2.1. L'expérimentation animale**

Le remplacement des neurones dopaminergiques perdus au cours du processus physiopathologique de la MP est une stratégie largement explorée notamment via l'utilisation de tissus allogéniques. En effet, de nombreuses études d'allogreffes de neurones dopaminergiques immatures (ou neuroblastes) issus du MV embryonnaire ont été réalisées.

Bien qu'il ait été montré que des neurones embryonnaires pouvaient émettre des axones sur de longues distances après leur implantation dans le SNC adulte (Gaillard et al., 2004), la transplantation de neuroblastes dans la SN adulte, ne permet pas de réafférenter efficacement le striatum (Isacson and Deacon, 1997). En revanche, placés directement dans le striatum, ces neurones immatures émettent des axones qui colonisent en partie cette structure, synthétisent et libèrent de la dopamine et forment des synapses fonctionnelles avec les cellules de l'hôte. Réciproquement, les neurones transplantés sont susceptibles de recevoir des afférences du striatum lui-même et du cortex frontal. Ainsi, une fraction des neuroblastes mésencéphaliques implantés survivent de façon prolongée et reconstituent, bien qu'en situation ectopique, une cytoarchitecture proche de la normale (Doucet et al., 1989). La

confirmation de la formation de synapses fonctionnelles et d'une régulation dopaminergique appropriée par les cellules greffées vient de l'observation de la disparition des dyskinésies induites par les traitements prolongés à la L-DOPA, après la transplantation (Gaudin et al., 1990). D'autre part, des études ont révélé l'augmentation de l'activité métabolique du striatum de singes traités au MPTP après l'implantation de neuroblastes mésencéphaliques (Collier et al., 1997).

A travers plusieurs épreuves comportementales, le caractère fonctionnel des implants a été démontré. C'est le cas de l'activité rotatoire, induite par l'amphétamine chez le rat ayant subi une destruction unilatérale de la SN. Cette activité anormale, témoin de la dénervation dopaminergique, est supprimée voire même inversée quelques semaines après les greffes intrastriatales ipsilatérales de neuroblastes mésencéphaliques (Herman and Abrous, 1994). Ces expérimentations ont également montré que des neurones fœtaux allogéniques pouvaient survivre efficacement dans le striatum sans apport de traitement immunosuppresseur. Le greffon paraît alors immunologiquement inerte vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. Cependant, cet état apparent de tolérance peut être rompu par une réaction de rejet, induite dans un tissu périphérique. Duan et son équipe ont ainsi montré qu'une greffe de peau du donneur, consécutive à la transplantation intracérébrale, pouvait provoquer une réaction de rejet de la part du receveur, surtout lorsque les deux interventions étaient proches l'une de l'autre (Duan et al., 1997). 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.

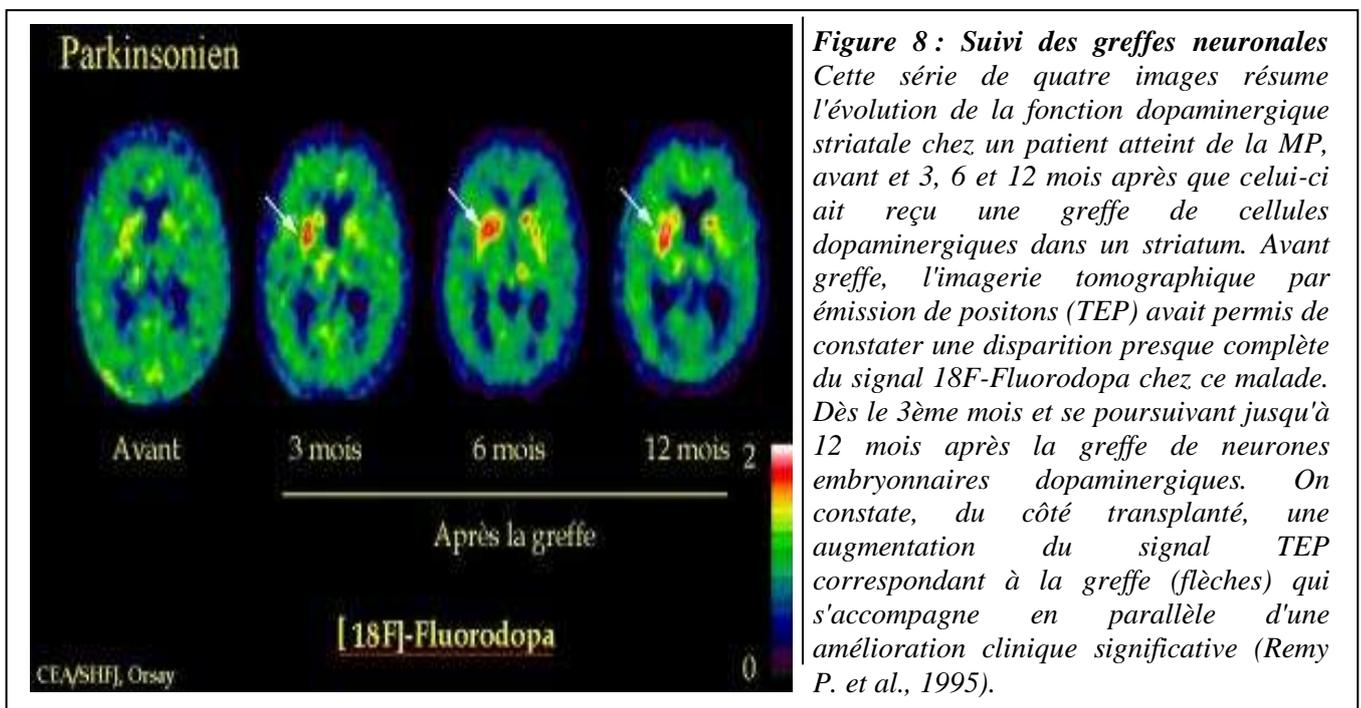
Bien que toutes ces études confirment un rôle bénéfique des cellules fœtales dopaminergiques implantées, il convient de préciser que dans les modèles animaux de la MP les syndromes parkinsoniens apparaissent suite à une destruction massive et sélective des neurones dopaminergiques via l'utilisation d'une substance neurotoxique. Cette dernière tend à éliminer rapidement la SN de tous ses neurones dopaminergiques alors que dans la forme humaine de la maladie, c'est une perte neuronale progressive et incomplète qui génère la symptomatologie.

### **II.2.2. Les applications cliniques**

Les données expérimentales encourageantes obtenues dans les modèles animaux, ont rapidement amené Lindvall et ses collaborateurs à procéder aux premiers essais cliniques en 1987 afin d'étudier la survie des neuroblastes dopaminergiques transplantés dans le cerveau de parkinsoniens (Lindvall et al., 1989). Pour des raisons de méthodologie, ces premières

données n'ont pas été concluantes quant à la survie du greffon, mais un an plus tard, la même équipe présentait la première preuve de la survie des neurones dopaminergiques associée à des bénéfices cliniques substantiels (Lindvall et al., 1990). Ainsi, il a été observé que l'amélioration clinique était graduelle entre 6 et 24 mois après la transplantation (Fig. 8) et était associée à la restitution de l'activation des mouvements liés au cortex moteur et prémoteur (Piccini et al., 2000).

D'autre part, sur les 30 patients Européens greffés, l'un a vu ses symptômes disparaître et a pu se passer totalement de médicaments et une dizaine d'entre eux ont vu certains de leurs symptômes moteurs s'atténuer, notamment la bradykinésie. En moyenne, l'augmentation de l'activité dopaminergique dans la zone malade est de 60%, deux ans après la transplantation. Dans tous les cas, la greffe a permis de réduire les doses du traitement médicamenteux par la L-DOPA et d'en éliminer ainsi les effets secondaires. Les neurones dopaminergiques fœtaux humains peuvent survivre de façon fonctionnelle pendant plus de 10 ans dans le striatum de patients parkinsoniens sans montrer de signes d'altération par le processus neurodégénératif. Les neuroblastes greffés semblent donc être thérapeutiquement efficaces (Freed et al., 1992; Freeman et al., 1995).



Des études ont par ailleurs montré le rôle prépondérant joué par les progéniteurs des cellules gliales transplantés simultanément avec les neuroblastes dans la suspension cellulaire. En effet, les facteurs sécrétés par les cellules gliales, importants pour la maturation et la connexion des neurones dopaminergiques au cours du développement, influencent également

le développement et l'intégration des tissus embryonnaires greffés dans un cerveau adulte. La glie en libérant des facteurs angiogéniques, fournit un milieu propice au développement autonome normal des cellules fœtales mésencéphaliques transplantées. Par ailleurs, il a été montré que les cellules allogéniques foetales implantées dans un cerveau hôte immature manifestaient une grande capacité de migration dans le cerveau de l'hôte associée à une croissance neuritique ciblée (Isacson and Deacon, 1997), c'est-à-dire dirigée vers les aires cérébrales qui constituent leurs cibles naturelles. En revanche, les cellules fœtales neurales transplantées dans un cerveau adulte demeurent à l'état d'agrégats au niveau du site d'implantation, avec une extension axonale moins importante qui met en évidence l'émergence de phénomènes inhibiteurs. Cependant, des cellules fœtales humaines implantées dans le cerveau de rat adulte émettent des axones dont la croissance est ciblée (Victorin et al., 1992). Il semble donc que la signalisation directionnelle fournie aux axones pour leur cheminement vers la région cible de l'hôte persiste, au moins en partie, dans le cerveau adulte.

### **II.2.3. Les limites de l'allotransplantation neuronale**

Outre les résultats bénéfiques observés sur le long terme pour certains patients, les analyses ont toutefois révélé une grande variabilité des améliorations entre les centres d'étude mais également parmi les patients d'un même centre. Par ailleurs, de nombreux patients transplantés ont développé des dyskinésies. La compréhension des mécanismes sous-jacents au développement de ces dyskinésies est essentielle et de nombreux auteurs postulent que la greffe, en produisant un excédent de dopamine par endroit, pourrait être responsable de l'apparition des mouvements involontaires. D'autre part, il a été observé que la plupart des patients qui présentaient des améliorations motrices suite à la transplantation étaient également ceux qui développaient des dyskinésies (Freed et al., 1990; Freed et al., 2001), suggérant une production de dopamine d'abord suffisante puis excédentaire. Cette émergence des dyskinésies chez les patients transplantés témoigne de la limite des modèles animaux chez lesquels ces effets secondaires n'ont pas été recensés. En effet, l'un des facteurs dont l'expérimentation animale ne tient pas compte sont les dyskinésies pré-opératoires dont souffrent les patients préalablement traités avec des anti-parkinsoniens. D'autre part, il a été suggéré que l'âge des patients pouvait jouer un rôle important dans la réussite de la transplantation. Freed et ses collaborateurs ont tout d'abord suggéré que les patients plus jeunes pourraient présenter davantage d'améliorations suite à la transplantation cellulaire (Freed et al., 2001). Puis, ils ont finalement pu mettre en évidence que le facteur déterminant

l'importance des bénéfices cliniques était la réponse préopératoire à la L-DOPA et non l'âge des individus.

Chaque patient parkinsonien présente un profil unique de dénervation, la localisation de la greffe est donc également un facteur crucial qui devrait être inhérent à chaque patient. Taylor et son équipe ont montré que l'emplacement de la greffe dans le striatum de singe influençait le niveau de réparation fonctionnelle observé (Taylor et al., 1995).

La préparation conditionne également la survie des cellules après leur transplantation et devrait suivre un protocole standard. Ainsi, la culture des cellules du donneur avant la transplantation augmente le risque de développer des dyskinésies (Hagell et al., 2002) et la cryopréservation préalable des tissus mésencéphaliques donne des résultats peu convaincants (Collier et al., 1987; Redmond et al., 1988; Sauer et al., 1992). Par ailleurs, il semble que l'âge du donneur joue un rôle important puisque des donneurs plus jeunes induisent davantage de cellules dopaminergiques après transplantation, mais sont également associés à une plus grande incidence d'apparition des dyskinésies en comparaison avec des donneurs plus âgés. La quantité de cellules implantées a également son importance puisque Sladek et ses collaborateurs ont montré que lorsque la quantité de cellules transplantées dans un modèle parkinsonien chez le singe est doublée, la survie cellulaire n'est pas pour autant prolongée. De plus, il semblerait que plusieurs petites greffes produiraient une meilleure augmentation de la dopamine striatale et induiraient une meilleure efficacité comportementale que les macrogreffes (Sladek et al., 1998). Cependant, le développement et la maturation du greffon sont parfois incertains car seul 5 à 10% des cellules dopaminergiques transplantées survivent, les autres meurent par apoptose dans les quelques jours qui suivent l'opération. Comme décrit précédemment, un prétraitement des tissus embryonnaires avec des facteurs neurotrophiques peut diminuer cette perte cellulaire.

Mais la limite la plus importante pour l'application généralisée de l'allotransplantation neuronale est la disponibilité restreinte des neuroblastes dopaminergiques humains ainsi que les problèmes éthiques liés à leur utilisation. Cette technique est également limitée par les problèmes logistiques liés à la collaboration étroite nécessaire entre obstétriciens qui procèdent à l'IVG (Interruption Volontaire de Grossesse), neurobiologistes capables de disséquer les régions cérébrales d'intérêt et les neurochirurgiens qui greffent par stéréotaxie. En effet, chaque implantation nécessite de l'ordre de 7 fœtus obtenus par IVG et le traitement complet requiert une transplantation dans chaque hémisphère (Isacson et al., 2001; Bjorklund et al., 2003; Soderstrom et al., 2006).

## **II.3. La xénotransplantation**

### **II.3.1. La xénotransplantation comme alternative aux limites de l'allotransplantation**

L'allotransplantation caractérisée par l'utilisation d'embryons humains, pose des problèmes éthiques dans de nombreux pays. C'est pourquoi, la recherche d'une nouvelle source cellulaire s'est imposée et a conduit à la transplantation de neurones de mammifères domestiques. L'espèce animale actuellement choisie comme donneur est le porc. Bien que l'on se soit tout d'abord intéressé aux primates non humains, comme les chimpanzés et les babouins, espèces plus proches de l'homme, des difficultés d'ordre éthique, économique et infectieuse sont apparues. Le porc s'est alors révélé comme le seul animal permettant une exploitation à long terme de la xénotransplantation, ce malgré la grande distance phylogénétique qui le sépare de l'homme. Un élevage facile, la consommation des animaux sacrifiés, la taille et le poids des organes proches de ceux de l'homme, sont autant d'atouts majeurs. De plus, le recours à des porcs domestiqués depuis longtemps et qui font l'objet d'un élevage industriel est certainement mieux accepté par le public que le recours à des babouins. Le choix du porc libère également des risques et contraintes liés à l'utilisation d'espèces animales protégées et peu prolifiques. En effet, le porc fœtal est une source neuronale particulièrement intéressante puisque chaque portée contient une quinzaine d'embryons. Il fournit ainsi un matériel abondant selon des temps relativement courts, puisque le porc est sexuellement mature à 9 mois et la période de gestation est de 3 mois, 3 semaines et 3 jours. Par ailleurs, le statut immunologique spécifique du SNC, l'utilisation de transplants issus de tissus nerveux immatures ainsi que la possibilité de moduler la réponse immunitaire mise en jeu via l'obtention de porcs transgéniques sont autant de perspectives immunologiques favorables à la xénotransplantation. De plus, ce type de greffe permet de planifier le prélèvement et l'acte chirurgical, de traiter le donneur et le receveur, si besoin avant la transplantation, pour prévenir le rejet ou induire la tolérance (Cascalho and Platt, 2001).

D'un point de vue psychosocial, la xénotransplantation représente là encore une approche thérapeutique intéressante puisqu'une étude suédoise (1999) a révélé que 66% des personnes en attente d'une greffe de rein se disaient prêtes à accepter une xénotransplantation si les risques étaient équivalents à ceux d'une allotransplantation, contre 60% de la population générale. En revanche, le pourcentage descend à 16% lorsque les risques sont plus importants.

### **II.3.2. Les risques sanitaires**

A la différence de l'allotransplantation et à condition de maintenir les animaux dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), il est possible d'éviter la transmission de la plupart des agents infectieux, dont 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, il a été montré que des PERV pouvaient être libérés de certaines lignées cellulaires porcines et infecter des cellules humaines in vitro (Patience et al., 1997; Weiss, 1999). Cependant, des analyses réalisées chez des patients ayant été en contact avec des tissus porcins n'ont révélé aucun signe d'infection dans les années qui ont suivi (Paradis et al., 1999) suggérant que cette transmission ne se produit pas in vivo. Certains auteurs suggèrent même que les PERV représenteraient davantage un risque théorique et politique qu'un risque réel. Néanmoins, la menace infectieuse pourrait augmenter avec l'utilisation de porcs transgéniques. Aussi, pour écarter tous risques de transmission il est envisagé de sélectionner des porcs dépourvus de PERV ou avec des PERV inactifs.

### **II.3.3. L'expérimentation animale**

Outre leur intérêt méthodologique, les cellules embryonnaires porcines se sont révélées comme étant des outils efficaces dans les modèles animaux de maladies neurodégénératives. En effet, après les premières études ayant mis en évidence que les xéno greffes de cellules dopaminergiques dérivant du MV d'embryons de porc âgés de 21 à 26 jours pouvaient survivre dans un cerveau de rat adulte parkinsonien immunodéprimé (Freeman et al., 1988; Huffaker et al., 1989), l'intérêt pour ces cellules s'est largement développé. Au-delà de cette survie à long terme, les xéno greffes de cellules neurales dans des modèles animaux de la MP présentent une capacité de croissance axonale sur de longues distances (Wictorin et al., 1990a; Wictorin et al., 1990b; Wictorin et al., 1992; Deacon et al., 1994; Thompson et al., 2005). Isacson et ses collaborateurs ont montré que cette croissance

était orientée vers les cibles cérébrales naturelles dans le cerveau adulte (Isacson et al., 1995). En effet, les cellules astrogliales en développement issues des 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 du cerveau de rat adulte, peuvent émettre des axones qui recolonisent les régions 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 dans le cerveau adulte pour atteindre sélectivement leurs cibles. Cette croissance axonale spécifique traverse donc la barrière inter-espèce suggérant que ce mécanisme de guidage est fortement conservé. La croissance axonale spécifiquement ciblée et inter-espèce permet donc aux neuroblastes dopaminergiques d'embryons de porc de reconstituer, en quelques mois, une innervation dopaminergique efficace dans des modèles de rats parkinsoniens immunodéprimés. En effet, une récupération fonctionnelle significative a été observée chez les rats transplantés et le degré de récupération a pu être corrélé au nombre de cellules TH<sup>+</sup> ainsi qu'à la taille du greffon (Galpern et al., 1996).

#### **II.3.4. Les essais cliniques**

Les résultats encourageants obtenus chez les modèles animaux de la MP ont conduit les chercheurs à procéder aux essais cliniques afin d'étudier la faisabilité et l'efficacité d'une implantation de cellules embryonnaires porcines dans le striatum dénervé de parkinsoniens (Pakzaban and Isacson, 1994).

La première étude a été réalisée sur 12 patients parkinsoniens greffés unilatéralement ; 6 ont reçu un traitement immunosuppresseur (ciclosporine A) et les 6 autres ont été transplantés avec des cellules préalablement traitées avec un anticorps anti-CMH I porcine. Les greffes ont été bien tolérées avec une amélioration des scores moteurs de 30% pour certains patients 1 an après l'opération. De plus, aucun PERV n'a été détecté dans la suspension cellulaire avant la greffe ni après la transplantation chez le patient. Cependant, l'amélioration motrice observée n'a pu être corrélée à une activité dopaminergique restaurée (Schumacher et al., 2000). L'analyse post-mortem d'un patient décédé 7 mois après l'opération d'une embolie pulmonaire, a révélé la présence de quelques neurones dopaminergiques porcins dans le greffon mais en nombre restreint (Deacon et al., 1997; Fink et al., 2000). Ceux-ci étaient

toutefois capables d'émettre des axones localisés à l'intérieur du greffon, mais susceptibles de coloniser également le parenchyme striatal de l'hôte. Ces résultats ont montré qu'une fraction minime des neurones xénogéniques transplantés unilatéralement pouvait survivre et se différencier dans le striatum de patients parkinsoniens soumis à un traitement immunosuppresseur. On pense de nos jours que celui-ci était insuffisant.

La seconde étude a consisté en l'analyse de l'effet des greffes xénogéniques bilatérales pour 10 patients parkinsoniens soumis à un traitement immunosuppresseur par la ciclosporine A versus 8 patients placebo (opération sans injection de cellules). De façon surprenante, les deux groupes de patients ont présenté des améliorations significatives de leurs symptômes moteurs. D'autre part, la moitié des patients transplantés ont développé des dyskinésies (Olanow et al., 2003).

## **CONCLUSION II**

Malgré ces résultats décevants, la xénotransplantation intracérébrale ne doit pas être remise en question. Les paramètres expérimentaux tels que la quantité de cellules transplantées, l'utilisation d'une suspension cellulaire ou de pièces de MV, l'implantation unilatérale ou bilatérale et enfin l'application ou non de traitements immunosuppresseurs sont autant de questions qui doivent faire l'objet d'études approfondies puisque l'intérêt de cette thérapie a été largement démontré dans les modèles animaux de la maladie. Par ailleurs, outre les nombreux avantages logistiques, éthiques et de disponibilité que représentent les cellules xénogéniques, la xénotransplantation intracérébrale correspond à une stratégie de substitution de premier choix puisque l'intégration des cellules greffées est optimisée par les caractéristiques immunologiques particulières du SNC. En effet, celui-ci offre un terrain favorable à la xénotransplantation cellulaire en raison de sa spécificité immunologique qui lui a valu d'être longtemps considéré comme un site immunologiquement privilégié. Les bases de ce privilège immun seront détaillées dans le paragraphe suivant de ce manuscrit.

### **III. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DU CERVEAU**

C'est en 1953 que le terme de site immunologique privilégié a été proposé pour qualifier les régions anatomiques dans lesquelles une greffe pouvait survivre plus longtemps que dans les autres régions (Billingham and Boswell, 1953). Le cerveau à longterm a été considéré comme l'un de ces sites (Barker and Billingham, 1977) en raison d'une anatomie locale particulière. De ce fait, il était supposé qu'il était « plus bénéfique pour l'organisme de ne pas transformer le cerveau en un champ de bataille dans lequel la réponse immunitaire pouvait être plus endommageante que l'antigène qui l'a provoquée » (Leslie Brent, 1990).

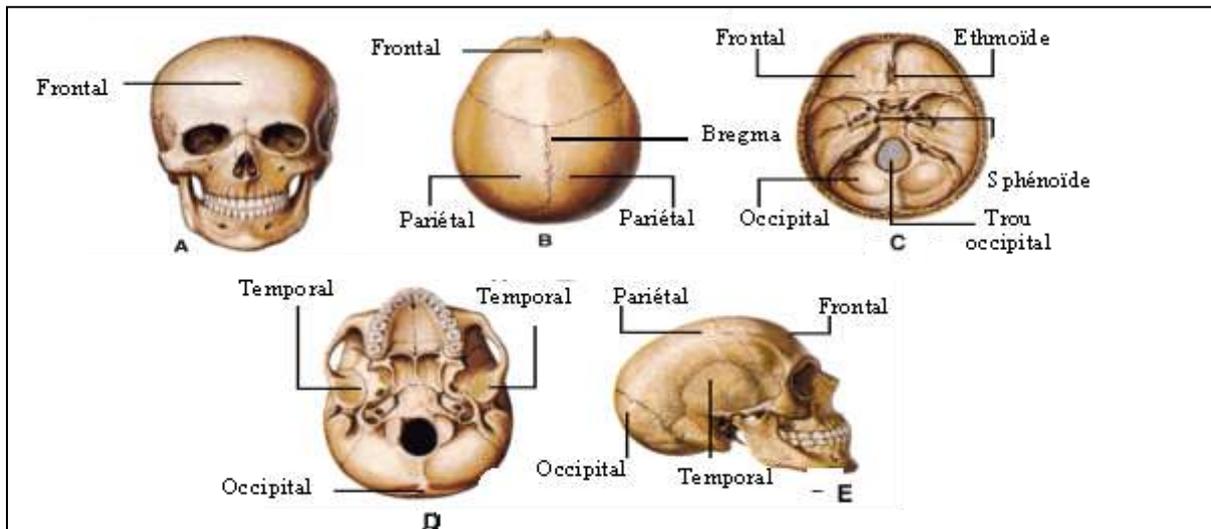
#### **III.1. Caractéristiques anatomiques uniques du SNC**

Notre cerveau, comme pour témoigner de sa préciosité, est strictement délimité par des barrières qui l'isolent et le protègent. En effet, l'organe est protégé d'un point de vue anatomique par une barrière osseuse et une barrière conjonctive, mais il est également isolé d'un point de vue cellulaire et moléculaire par la barrière hématoencéphalique.

#### **III.1.1. Isolement de l'environnement extérieur**

##### **III.1.1.1 La boîte crânienne**

Le crâne constitue une boîte osseuse ovoïde avec une importante extrémité postérieure destinée à renfermer l'encéphale. La structure du crâne s'articule en huit plaques osseuses qui s'emboîtent les unes dans les autres à la façon d'un puzzle en trois dimensions pour constituer une véritable armure (Fig. 9). Ces plaques osseuses sont réunies par des sutures qui ne sont pas encore fermées après la naissance pour permettre la croissance du cerveau. En revanche, chez l'adulte, les plaques osseuses sont presque complètement soudées, seul persiste un espace quasi virtuel à la jonction inter plaque. L'intersection entre l'os frontal et les os pariétaux correspond à un point nommé bregma que l'on utilise en stéréotaxie pour calculer les coordonnées des sites d'injection dans le parenchyme cérébral.

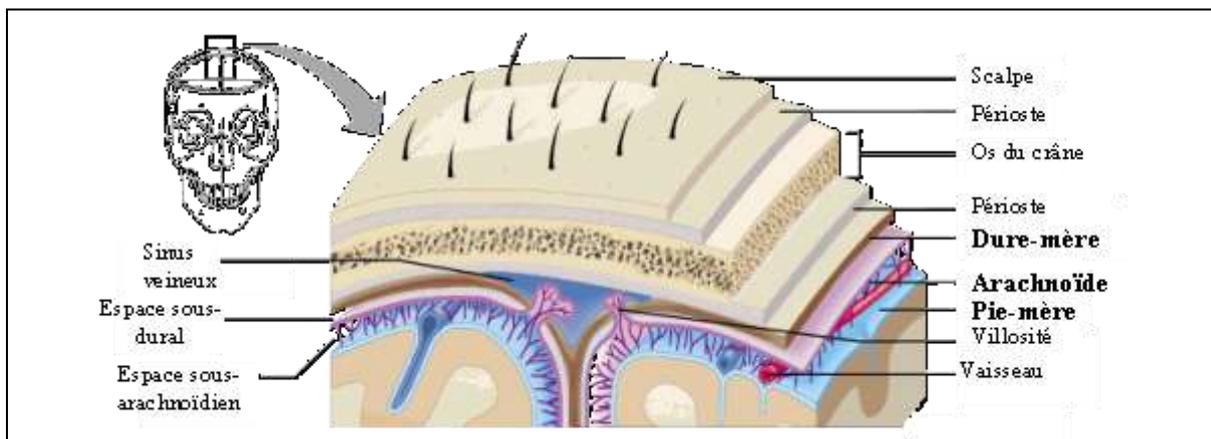


**Figure 9 : Organisation de la boîte crânienne.**

La boîte crânienne s'organise en huit plaques osseuses qui constituent une armure autour du cerveau. Il s'agit de l'os frontal qui constitue le front et la voûte orbitaire, de l'os occipital qui forme l'arrière et la base du crâne, des deux os pariétaux qui constituent la calotte crânienne et les parties latérales du haut du crâne, des deux os temporaux situés sous les pariétaux et qui sont les os les plus fragiles du crâne car les plus minces. (A) vue de face ; (B) vue de dessus ; (C) vue de dessus en section transversale ; (D) vue de dessous ; (E) vue de profil.

### III.1.1.2. Les méninges

Le cerveau n'est pas en contact direct avec la calotte osseuse du crâne, puisque trois couches de tissu protecteur recouvrent l'étendue du SNC. Ils sont regroupés sous le terme méninges (Fig. 10).



**Figure 10 : Les méninges.**

*Sous le terme de méninges sont regroupées trois couches de tissu conjonctif : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère.*

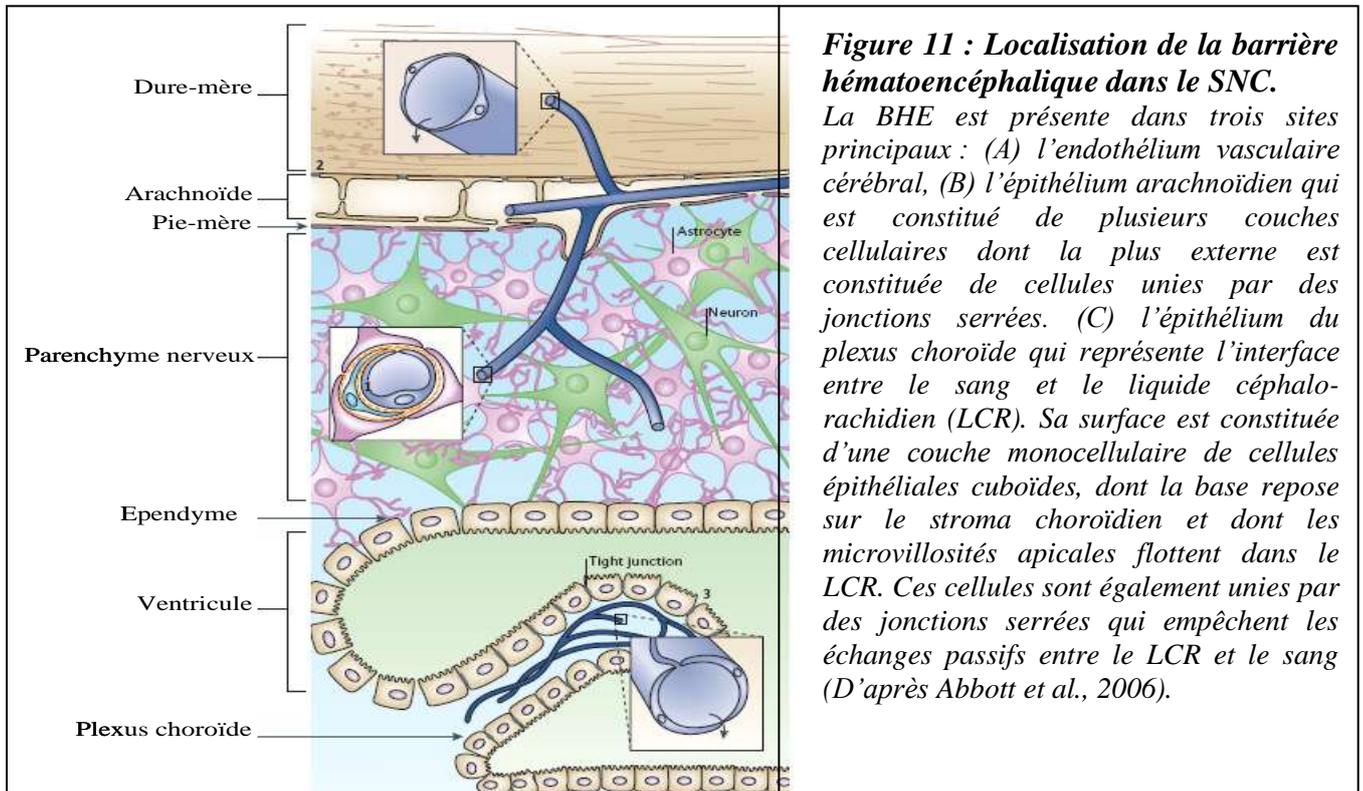
La couche la plus externe est la dure-mère, ainsi appelée en raison de son épaisseur et de sa solidité. La méninge du milieu est l'arachnoïde, qui doit son nom aux filaments aussi fins que des toiles d'araignée qu'elle émet en direction de la troisième méninge, la pie-mère, couche fine de cellules étroitement appliquées à la surface du cerveau. L'espace compris entre l'arachnoïde et la pie-mère est appelé l'espace sous-arachnoïdien, rempli par le liquide céphalo-rachidien (LCR), qui contribue notamment à protéger l'encéphale contre les chocs qu'il pourrait subir à l'intérieur de la boîte crânienne. Parfois, ces gardiens peuvent faire l'objet de pathologies très graves parmi lesquelles les méningites ou atteintes inflammatoires des méninges. Elles sont le plus souvent d'origine infectieuse, bénignes lorsqu'elles sont virales (80% des cas) ou fongiques (rares cas), particulièrement graves et pouvant être fatales lorsqu'elles sont bactériennes (20-25% des cas).

### **III.1.2. Isolement de l'environnement intérieur : la Barrière Hémato-encéphalique (BHE)**

Le concept de barrière intracérébrale a été évoqué pour la première fois au début du XX<sup>ème</sup> siècle par les expériences de Paul Ehrlich (1885 -1906) et d'Edwin Goldman (1909-1913). Ces auteurs ont constaté que l'injection intraveineuse de bleu Trypan colorait tous les organes à l'exception du SNC, et inversement, seul le SNC était coloré lors d'une application sous-arachnoïdienne du colorant (Gregoire, 1990).

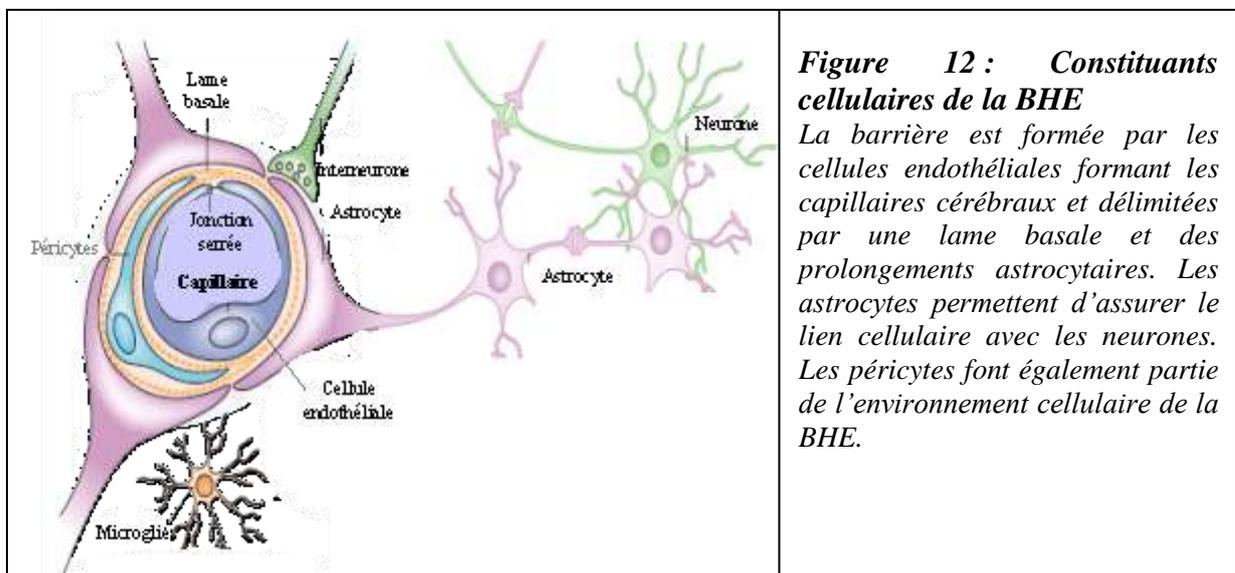
Le SNC est divisé en trois compartiments : le sang, le LCR et le tissu cérébral. Ils sont isolés les uns des autres par des barrières spécifiques. L'épendyme et la pie-mère (Fig. 11) constituent la barrière liquido-tissulaire, entre le LCR et le tissu nerveux. Les interfaces qui séparent le sang des deux autres compartiments sont regroupées sous le terme de barrière hémato-encéphalique (BHE). Il s'agit de la barrière hémato-liquidienne, constituée par le plexus choroïde et l'arachnoïde, entre le sang et le LCR et de la barrière hémato-tissulaire entre le sang et le tissu nerveux (Fig.11).

Le terme de BHE est plus couramment appliqué à la barrière hémato-tissulaire constituée par les cellules endothéliales vasculaires du SNC qui délimitent le sang du parenchyme nerveux.

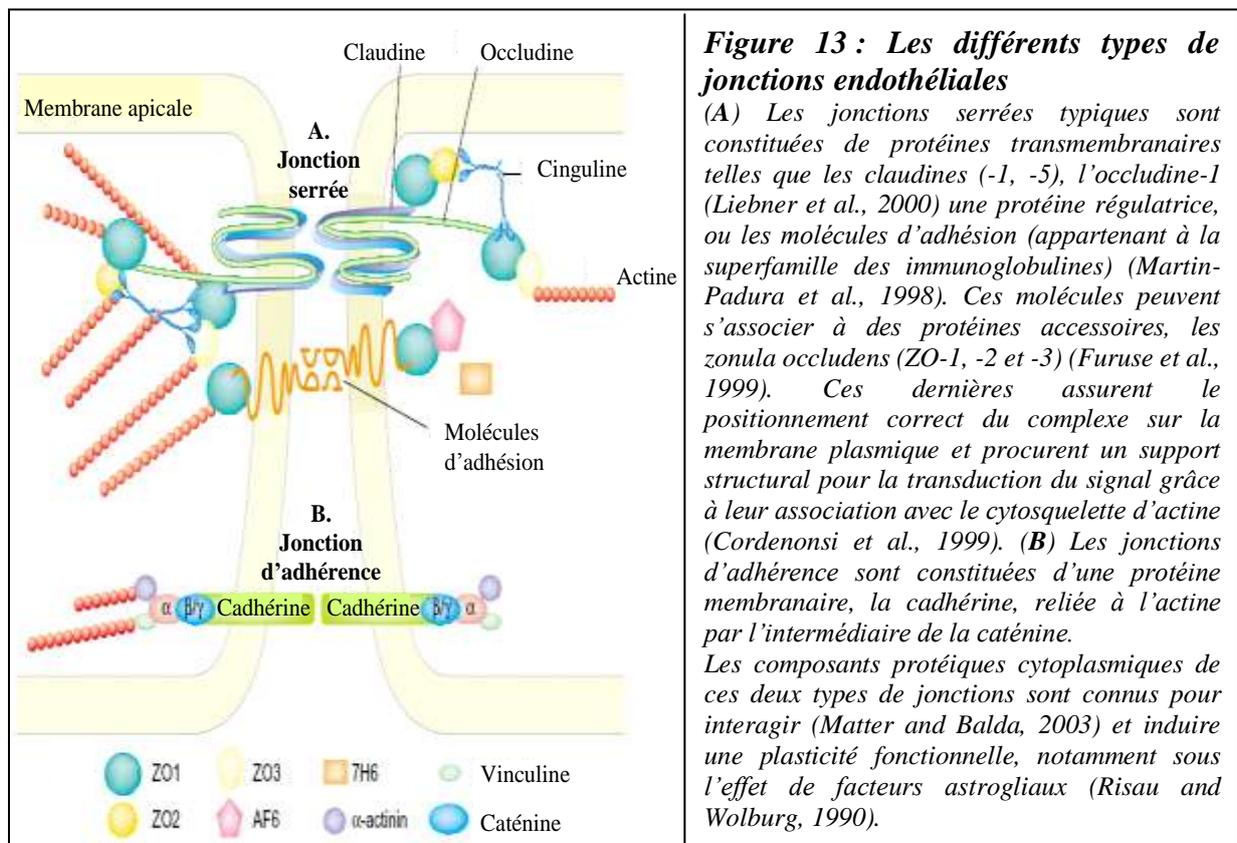


### III.1.2.1 Organisation de la BHE

La BHE est constituée de trois éléments cellulaires : les cellules endothéliales, les astrocytes et les péricytes (Ballabh et al., 2004) (Fig.12).



Sur le plan structural, les cellules endothéliales de la BHE diffèrent des cellules des vaisseaux extracérébraux par l'absence de pores (fenestrations), un nombre réduit de vésicules de pinocytose (7 fois moins nombreuses que dans les capillaires musculaires) (Coomber and Stewart, 1985) et par la présence de jonctions intercellulaires serrées. Leur assemblage permet de maintenir les cellules étroitement connectées en formant une couche cellulaire continue qui limite les échanges. Les jonctions endothéliales sont constituées de multiples composants qui permettent de les classer en différentes catégories résumées figure 13.



La monocouche jointive de cellules endothéliales repose sur une membrane basale recouverte presque entièrement de pieds astrocytaires qui s'étalent approximativement sur 85% de la surface du capillaire. Ce manchon d'origine gliale joue un rôle important dans l'induction (Rubin et al., 1991; Ramsauer et al., 2002) et dans le maintien des jonctions serrées (Davson and Oldendorf, 1967). Retenues dans l'espace périvasculaire par la membrane basale, les péricytes sont des cellules largement associées aux cellules endothéliales de la BHE. Leurs propriétés proches de celles des cellules musculaires lisses, leur confèrent un rôle important dans la croissance et la différenciation des cellules

endothéliales (Hirschi and D'Amore, 1996) ainsi que dans la stabilité structurale de la barrière (Ramsauer et al., 2002).

### **III.1.2.2 Fonction**

Le rôle de la BHE est essentiellement centré sur la régulation du milieu environnant le cerveau, car son homéostasie est capitale pour le fonctionnement normal du tissu cérébral. Rapoport postulat en 1976 que « les cellules endothéliales unies par des jonctions serrées qui composent la BHE, forment une couche cellulaire continue qui possède les propriétés d'une membrane plasmique étendue ». Il s'est avéré, en effet, que le passage des molécules à travers les capillaires cérébraux, de la même façon que les échanges à travers la bicouche phospholipidique des membranes cellulaires, est un passage transcellulaire. Par conséquent, les échanges dépendent de l'hydro- ou de la liposolubilité des substances. Ainsi, les molécules liposolubles peuvent passer par diffusion passive alors que d'autres substances diffusent de façon facilitée par l'intermédiaire de transporteurs membranaires. C'est le cas du glucose, principale source d'énergie pour le cerveau, dont le passage est assuré par des transporteurs appelés GLUT-1 (Cremer et al., 1983; Gerhart et al., 1989; Bell et al., 1993) qui présentent une distribution asymétrique en fonction des régions du cerveau (Farrell and Pardridge, 1991; Dobrogowska and Vorbrot, 1999). 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 joue également le rôle de barrière enzymatique car les cellules endothéliales sont dotées d'enzymes capables de métaboliser des drogues et des nutriments permettant la régulation du transport vitaminique, hormonal et protéique. Par exemple, la présence de P-gp MDR (multidrug-resistance P-glycoprotein) assure une détoxification du SNC en contrôlant le transport de molécules thérapeutiques (ciclosporine), de certaines drogues (vinblastine) et pesticides (ivermectine) (Schinkel et al., 1994). Cette sélectivité est une caractéristique fâcheuse pour le traitement de la MP, puisque l'activité enzymatique de la DOPA-décarboxylase empêche les traitements systémiques visant à acheminer directement la dopamine dans le cerveau et rend nécessaire son apport sous forme du précurseur, la L-DOPA (*voir I.5.1*). C'est également cette sélectivité de la BHE qui limite l'administration systémique des facteurs neurotrophiques dans la MP.

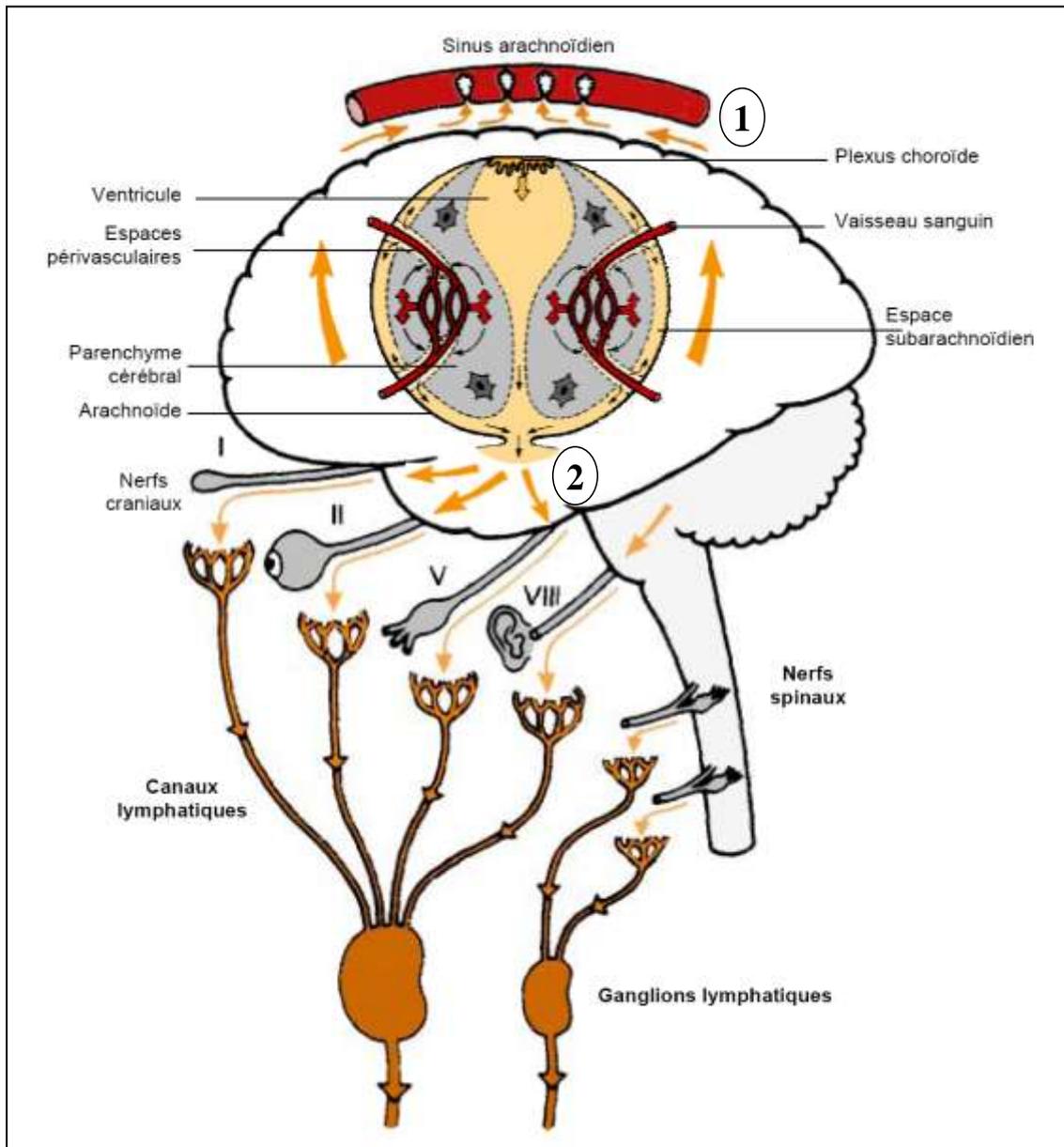
Les capillaires du SNC ne sont pas constitués partout par des cellules endothéliales unies par des jonctions serrées. On retrouve en effet des capillaires fenêtrés dans certaines régions qui ne partagent pas les fonctions inhérentes à la plus grande partie du cerveau. Ces régions nécessitent un contact direct avec le courant sanguin puisqu'elles secrètent des hormones dans le sang ou contiennent des hormones.

En revanche, des modifications anormales ou pathologiques de l'étanchéité de la BHE peuvent jouer un rôle important dans la progression de certaines maladies du SNC (Andjelkovic and Pachter, 1998). En effet, des réactions inflammatoires dans le cerveau peuvent entraîner une rupture précoce de la BHE. Les caractéristiques histologiques des cellules endothéliales les rapprochent alors de celles des tissus extracérébraux : présence d'un plus grand nombre de vésicules de pinocytose, apparition de pores intercellulaires, diminution du métabolisme énergétique mitochondrial et perte d'expression des protéines constitutives des jonctions serrées (Jolliet, 2000). Certains médicaments sont connus pour atténuer les conséquences liées à une rupture de barrière. C'est notamment le cas de la minocycline, qui outre ses propriétés anti-inflammatoires précédemment décrites (*voir I.5.3.1.b*), est une petite molécule lipophile capable de franchir la BHE (Tomas-Camardiel et al., 2004; Yenari et al., 2006).

### **III.2. Un drainage lymphatique particulier**

Dans les organes périphériques, la détoxification et la surveillance immunologique sont assurées par le drainage de la lymphe qui transite par les ganglions lymphatiques. Ces canaux lymphatiques sont absents dans le cerveau du rat ou de l'homme. Néanmoins, il existe des connections afférentes avec le système immunitaire qui lui permet d'assurer une surveillance partielle du SNC. En effet, la mise en évidence du drainage des ganglions lymphatiques cervicaux par le LCR (Widner et al., 1988; Cserr and Knopf, 1992) a permis d'attribuer à ce dernier un rôle fonctionnel dans le cerveau équivalent à la lymphe en périphérie (Weller et al., 1996). Le LCR est sécrété selon un mécanisme actif, par l'épithélium du plexus choroïde (Strazielle and Ghersi-Egea, 2000), logé dans les cavités individuelles que forment les ventricules. Le LCR circule du système ventriculaire vers l'espace sous-arachnoïdien (Fig. 14), puis soit il pénètre dans le sinus veineux via les villosités arachnoïdiennes et gagne la circulation sanguine et la rate (Fig. 14 (1)), soit il passe par l'espace tissulaire extracrânien via les prolongements de l'espace sous-arachnoïdien le

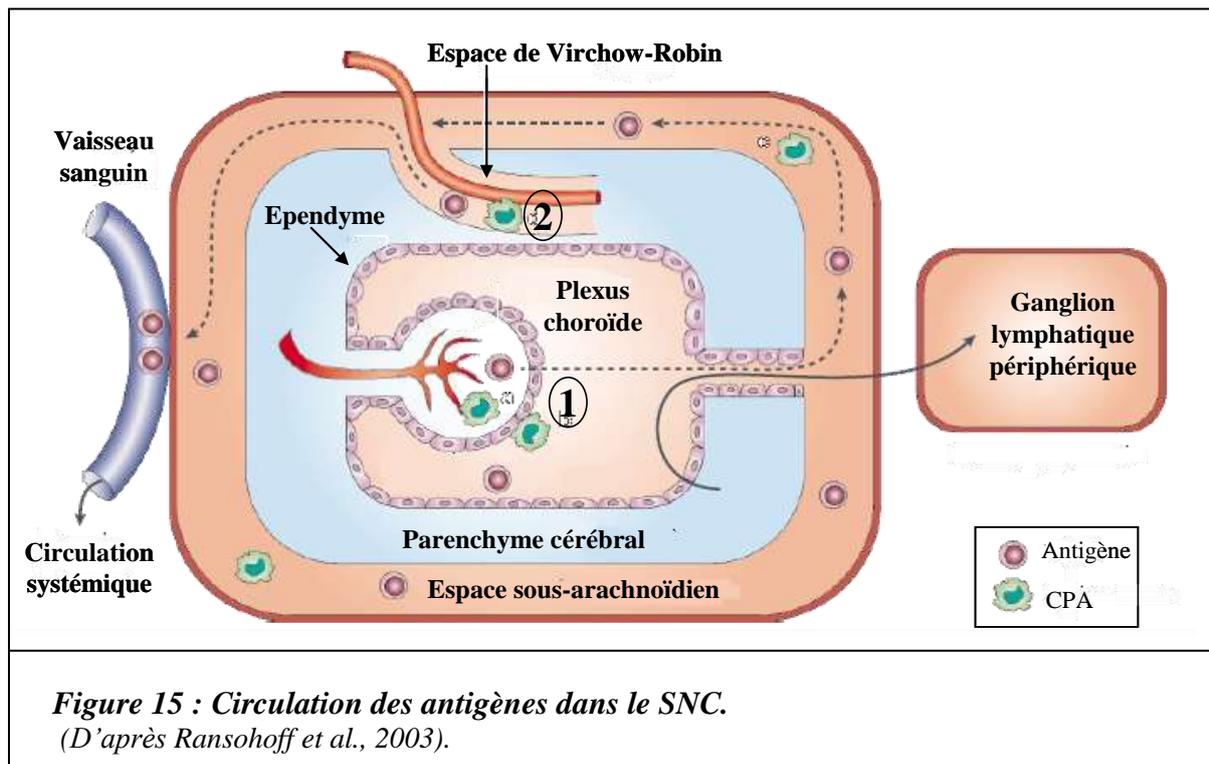
long des nerfs craniaux (olfactif, optique, trigéminale et acoustique) pour atteindre les ganglions lymphatiques (Fig. 14 (2)) (Cserr and Knopf, 1992).



**Figure 14 : Le drainage lymphatique dans le SNC.**  
(D'après Cserr et Knopf, 1992)

Les macromolécules antigéniques solubles présentes dans le liquide interstitiel du parenchyme peuvent transiter vers le LCR via la substance blanche, grâce à des zones où les cellules épendymaires qui bordent les ventricules, sont dépourvues de jonctions serrées (Fig. 15 (1)). Alternativement, elles peuvent transiter à partir de la substance grise le long des

espaces péri-vasculaires (espaces de Virchow-Robin) (Fig. 15 (2)). Les antigènes sont alors drainés jusqu'aux tissus lymphoïdes où ils peuvent stimuler une réponse spécifique. Il a été montré que selon le site d'injection, 14 à 47% des protéines injectées dans le cerveau de lapin se retrouvent dans les ganglions cervicaux dans les vingt heures qui suivent l'injection (Yamada et al., 1991).



Ce mode de diffusion antigénique, s'il est significatif, n'est pourtant pas comparable au réseau lymphatique conventionnel. En effet, de nombreux facteurs physiques et géométriques, dus à l'architecture du parenchyme cérébral, freinent le drainage des molécules dans les espaces extracellulaires. Certains antigènes de taille importante peuvent ainsi persister dans le cerveau jusqu'à deux ans après leur injection (Zhang et al., 1992).

### **III.3. Les cellules à potentiel immunologique du SNC**

#### **III.3.1. La microglie**

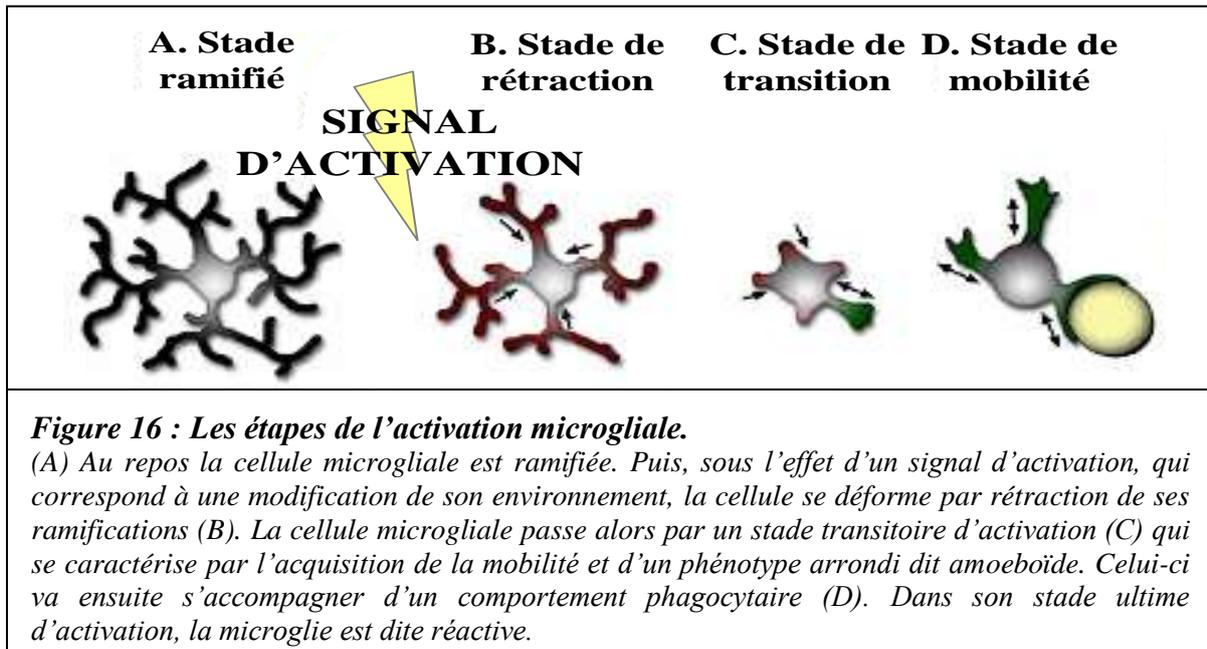
##### **III.3.1.1. Caractéristiques générales**

Les cellules microgliales sont de petites cellules, relativement peu nombreuses (environ 10% des cellules gliales totales). C'est Nissl en 1899 qui suggéra que les cellules gliales pouvaient avoir des fonctions similaires aux macrophages présents dans les autres tissus. Mais c'est del Rio-Hortega qui en 1932 fut le premier à démontrer que la microglie pouvait avoir une origine mésenchymateuse. En effet, il a pu mettre en évidence la pénétration des monocytes dans le cerveau au cours de l'embryogénèse ainsi que leur migration post-natale dans tout le SNC (del Rio-Hortega et al., 1932). Par la suite, l'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis à l'équipe de Perry de montrer leur appartenance au système immunitaire (Perry et al., 1985). Les cellules microgliales sont donc aujourd'hui définies 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. D'un point de vue immunologique, il apparaît que les différents marqueurs leucocytaires ainsi que ceux restreints aux macrophages, ne sont pas ou peu retrouvés sur la microglie ramifiée (Matyszak et al., 1992). C'est le cas des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines (Ig), des marqueurs CD4 murins, ou d'une tyrosine phosphatase CD45 caractéristique de la lignée mésenchymateuse qui colonise le cerveau (Sedgwick et al., 1991). Il semblerait même que cette population microgliale ramifiée secrète des cytokines immunosuppressives telle que le TGF $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1) (Kiefer et al., 1995).

### **III.3.1.2. Microgliose**

Les cellules microgliales sont considérées comme de véritables sentinelles du tissu nerveux. Cette sensibilité accrue est notamment due à la présence, au niveau de leur membrane, de récepteurs à l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) (Langosch et al., 1994) et de canaux potassiques qui leur permettent de réagir rapidement aux variations de leur environnement. Dès lors, les cellules microgliales s'activent induisant de profondes modifications morphologiques incluant la taille (hypertrophie) et la forme des cellules qui adoptent un phénotype macrophagique dit amoéboïde. Ce processus d'activation résumé figure 16 est rigoureusement orchestré selon une cinétique précise. Ainsi, il a été montré que simultanément à l'hypertrophie cellulaire, on observe une augmentation de l'expression de certains récepteurs. Ces évènements apparaissent dans les vingt-quatre heures qui suivent l'inflammation. Deux à trois jours après, la microglie commence à proliférer et les cellules atteignent leur nombre maximal après quatre à sept jours. Les changements immunophénotypiques concernant le motif d'expression des molécules de surface ainsi que

les cytokines et les facteurs de croissance synthétisés, débutent aux environs du septième jour post-lésion (Streit et al., 1999).



De la même façon que des phagocytes professionnels, les cellules microgliales activées sont capables de détruire les micro-organismes, de supprimer les débris potentiellement délétères, de promouvoir la réparation tissulaire puis de faciliter le retour à l'homéostasie. Deux principales voies permettent à la microglie activée d'être cytotoxique : 1) par phagocytose grâce à un contact direct de cellule à cellule via l'expression des récepteurs à la fraction Fc des immunoglobulines ou du récepteur du complément (CR3 ou encore appelé CD11b) (Graeber et al., 1988). 2) Par la libération de substances cytotoxiques telles que les radicaux libres oxygénés, l'oxyde nitrique (NO), produit de synthèse d'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (Tab.2), qui peuvent causer des dommages irréversibles sur les neurones avoisinants. Ces facteurs favorisent également le rôle pro-inflammatoire des cellules microgliales en induisant leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$  et l'INF $\gamma$  et en inhibant leur production de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF $\beta$  et d'IL-10 (Xiao et al., 1996) (Tab.2).

Abbreviation	Full length name	Function/effect	Reference
IL-1 $\alpha/\beta$	Interleukin-1 $\alpha/\beta$	Pro-inflammatory	Liu et al. (2005a)
IL-6	Interleukin-6	Pro-inflammatory	Laurenzi et al. (2001)
IL-18	Interleukin-18	Pro-inflammatory	Suk et al. (2001)
IP-10	Gamma interferon inducible protein 1	Pro-inflammatory	Kremlev et al. (2004)
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha	Pro-inflammatory	Si et al. (2004)
IL-16	Interleukin-16	T cell chemotaxis	Zhao et al. (2004)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1	Chemotaxis	Nagai et al. (2001)
IL-8	Interleukin-8	Chemokine	Nagai et al. (2001)
MDC	Macrophage-derived chemokine/CCL22	Chemotaxis	Columba-Cabezas et al. (2002)
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$	Chemotaxis	Nagai et al. (2001)
MIP-1 $\beta$	Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$	Chemotaxis	Nagai et al. (2001)
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2	Chemotaxis	Nagai et al. (2001)
MIP-3 $\beta$	Macrophage inflammatory protein 3 $\beta$	Chemotaxis	Nagai et al. (2001)
$\beta$ -Chemokine	Beta chemokine	Chemotaxis	Si et al. (2002)
Gro- $\alpha$	Growth regulated oncogene	Chemotaxis	Popivanova et al. (2003)
IL-3	Interleukin-3	Proliferation	Laurenzi et al., 2001)
IL-15	Interleukin-15	T-cell regulation/proliferation	Lee et al. (1996)
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor	Proliferation	Takeuchi et al. (2001)
IL-2	Interleukin-2	Growth factor/proliferation	Kowalski et al. (2004)
IL-12	Interleukin-12	Proliferation/T-cell differentiation	Nagai et al. (2001)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2	Pro-inflammatory, proliferation	Rasley et al. (2004)
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta	Anti-inflammatory	Hurley et al. (1999)
IL-13	Interleukin-13	Immunosuppressive	Shin et al. (2004)
IL-10	Interleukin-10	Immunosuppressive	Seo et al. (2004)
NGF	Nerve growth factor	Neurotrophic	Elkabes et al. (1996)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	Neurotrophic	Elkabes et al. (1996)
NT-3	Neurotrophin-3	Neurotrophic	Elkabes et al. (1996)
NT-4	Neurotrophin-4	Neurotrophic	Elkabes et al. (1996)
NO	Nitric oxide	Neurotoxic	Chao et al. (1992)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxide	Neurotoxic	Colton and Gilbert (1987)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide	Neurotoxic	Twig et al. (2001)
OH <sup>-</sup>	Hydroxyl radical	Neurotoxic	Chang et al. (2000b)
NOO <sup>-</sup>	Peroxynitrite	Neurotoxic	Possel et al. (2002)

**Tableau 2 : Les facteurs sécrétés par les cellules microgliales activées.**

*Les facteurs sécrétés par la microglie activée sont regroupés en famille en fonction de leur spécificité. Ainsi, les cytokines sont les principales molécules de contrôle de la réponse immune et incluent les interleukines (IL); les chimiokines (cytokines chimiotactiques); les facteurs neurotrophiques qui protègent les neurones et les radicaux libres qui sont cytotoxiques. (Block and Hong, 2005)*

Les cellules microgliales apparaissent comme la principale source de cytokines dans le SNC (Hanisch, 2002). Ces dernières favorisent ainsi l'entretien des réactions inflammatoires en induisant notamment l'augmentation de la perméabilité et du pool des molécules d'adhésion sur la surface endothéliale pour favoriser une adhésion renforcée des monocytes et

leucocytes circulants (Poher et al., 1986; Brett et al., 1989). Mais également en stimulant 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).

De plus, la migration intracérébrale des leucocytes via le BHE, nécessite la présence d'enzymes, les métalloprotéinases matricielles (MMP). Or, il a été rapporté que les cellules microgliales activées pouvaient également sécréter ces enzymes (Anthony et al., 1997; Cross and Woodroffe, 1999). Celles-ci sont notamment capables d'inhiber la protéine de défense  $\alpha$ -1 antitrypsine (ou inhibiteur de la protéase  $\alpha$ -1) dont la fonction dans le cerveau sain est d'empêcher l'entrée des leucocytes activés en paralysant l'activité des leucocytes élastases (Ryan and Ashley, 1998). En synthétisant des MMP, les cellules microgliales activées favorisent donc la rupture de la BHE et l'invasion leucocytaire du SNC.

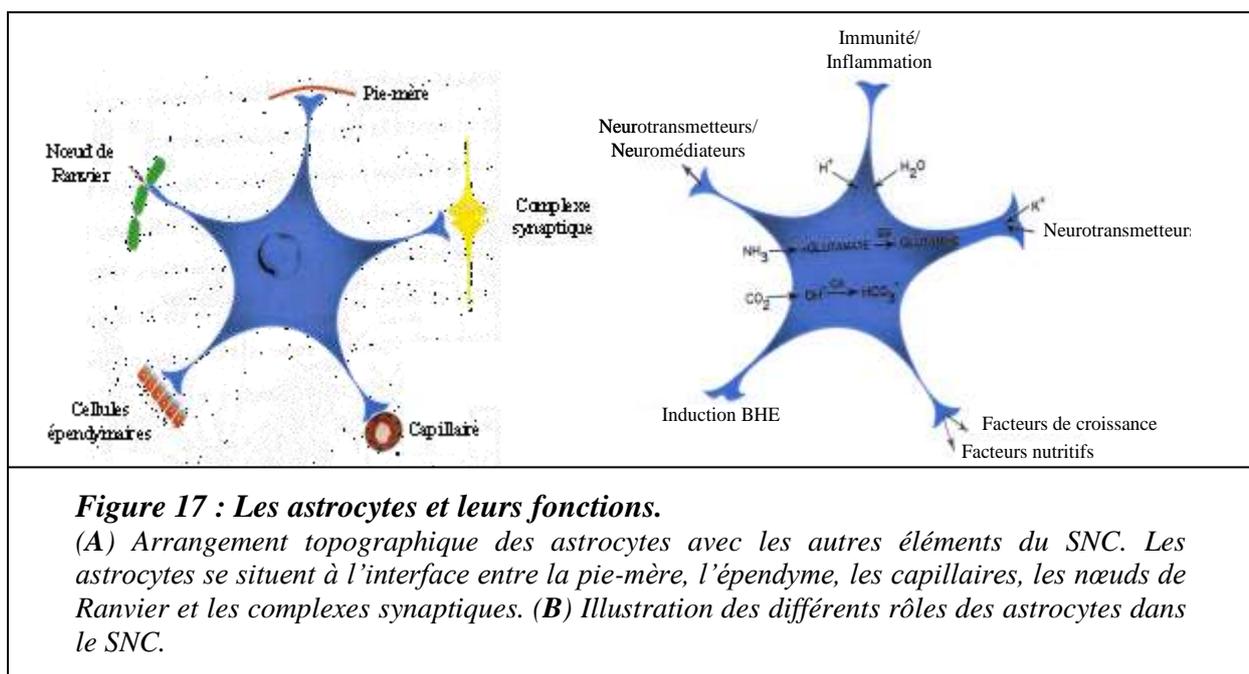
Outre ses fonctions cytotoxiques et pro-inflammatoire, la microglie peut exercer un rôle protecteur via la synthèse de facteurs neurotrophiques variés tels que le NGF (Nerve Growth Factor), le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), le NT-3 et NT-4 (Neurotrophine-3 et -4) in vitro et in vivo (Mallat et al., 1989). La microglie de rat peut également produire du bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) in vitro, ouvrant la possibilité d'une contribution microgliale dans la régulation et le développement neuronal ainsi que dans la neurorégénération (Shimojo et al., 1991).

Après avoir longtemps considéré la microglie activée comme ayant un phénotype unique, on l'observe désormais comme une cellule capable de présenter une étonnante plasticité. En effet, il semblerait qu'il existe un continuum dans l'activation microgliale avec d'une part, une réponse phagocytaire attribuée à l'immunité innée, c'est-à-dire une réponse aiguë non spécifique d'un agent infectieux et d'autre part, une fonction de présentation de l'antigène caractéristique de l'immunité adaptative, c'est-à-dire d'une réponse spécifique adaptée à l'agent pathogène. La voie d'activation dépendrait donc du type de stimulation perçue (Town et al., 2005). Ainsi, l'origine du stimulus déterminerait la synthèse d'un cocktail de facteurs spécifiques (cytokines, chimiokines, radicaux libres, MMP et facteurs de croissances) pour optimiser la réponse induite.

### **III.3.2. Les astrocytes**

### III.3.2.1. Caractéristiques générales

Les astrocytes représentent le compartiment cellulaire le plus important du cerveau, puisqu'ils sont environ dix fois plus nombreux que les neurones et qu'ils occupent le tiers du volume du cortex cérébral. La forme étoilée caractéristique de ces cellules gliales a été décrite dès 1865 par Dieters qui leur donna le nom de *Sterzellen* (cellules étoilées). Cette morphologie atypique et le réseau tridimensionnel qu'ils forment entre les neurones, leur ont valu d'être longtemps assimilé à des cellules passives, dont la fonction était restreinte à un support physique. Cette conception des astrocytes a fortement évolué puisqu'il est désormais admis que ces cellules sont impliquées dans de nombreux aspects du fonctionnement du SNC (Fig.17). Outre leur rôle reconnu dans le soutien neuronal et dans le guidage axonal au cours du développement, il semblerait que le réseau astrocytaire puisse se superposer au système neuronal pour jouer un rôle majeur dans la modulation de l'activité neuronale (Alvarez-Maubecin et al., 2000; Rouach et al., 2000). De plus, par leur activité métabolique élevée, les astrocytes ont des fonctions neuroprotectrices via la recapture et le métabolisme du glutamate par la glutamine synthétase qui assurent la détoxification du milieu. Les astrocytes exercent donc un rôle essentiel dans l'homéostasie des neurones.



Les astrocytes contribuent également à l'intégrité structurale et fonctionnelle de la BHE. Observant les effets d'une lésion du parenchyme cérébral chez des souris déplétées en astrocytes, Bush et son équipe ont démontré que ces cellules étaient notamment impliquées dans la régulation du trafic leucocytaire à travers la BHE ainsi que dans la réparation de celle-

ci. En effet, le tissu cérébral lésé déplété en astrocytes présente une infiltration des leucocytes circulants fortement augmentée ainsi qu'une absence de réparation de la BHE avec formation d'œdème (Bush et al., 1999).

### **III.3.2.2. Astrogliose**

Les astrocytes en raison de leur position stratégique à l'interface sang/parenchyme nerveux et de leurs interactions avec les neurones, peuvent très rapidement répondre aux variations de l'environnement. Cette réponse se traduit par une activation de la cellule également appelée astrogliose caractérisée par une hypertrophie cellulaire et, dans une moindre mesure, une prolifération. L'astrogliose se distingue également par l'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 par l'induction d'un autre filament intermédiaire souvent exprimé par les cellules immatures en cours de prolifération, la vimentine (Schiffer et al., 1986; Petit et al., 1990). Outre ces modifications phénotypiques, les astrocytes activés vont exprimer de nombreuses molécules membranaires et sécréter divers facteurs pro-inflammatoires tels que le G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) (Malipiero et al., 1990), le M-CSF (Macrophages-CSF) qui attire les cellules microgliales/macrophages (Calvo et al., 1998) et le GM-CSF (Granulocyte/Macrophages-CSF) qui induit notamment l'activation et la prolifération des cellules microgliales/macrophages (Lee et al., 1994).

Par la sécrétion des cytokines proinflammatoires, les astrocytes activés participent à l'entretien de la réponse inflammatoire. Mais par de nombreux autres aspects ces cellules gliales se caractérisent davantage comme des régulateurs de l'inflammation. En effet, elles peuvent sécréter de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) et participer aux mécanismes de neuroprotection. Il a été montré que les astrocytes activés pouvaient produire des facteurs neurotrophiques tels que le NGF (Neveu et al., 1992) et le GDNF. Plus récemment, Petrova et ses collaborateurs ont montré in vitro que les astrocytes pouvaient sécréter un facteur trophique spécifique des neurones dopaminergiques, le MANF (Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor) (Petrova et al., 2004).

Ainsi, les propriétés neurotrophiques des astrocytes associées à leur capacité d'élimination des substances neurotoxiques telles que les radicaux libres ou le glutamate, de même que leur sécrétion de substrats nécessaires pour la croissance axonale, donnent à ces

cellules un rôle plus bénéfique que délétère. Dès lors, les astrocytes sont devenus une cible thérapeutique privilégiée pour le traitement préventif de la MP (pour revue : Chen et al., 2005).

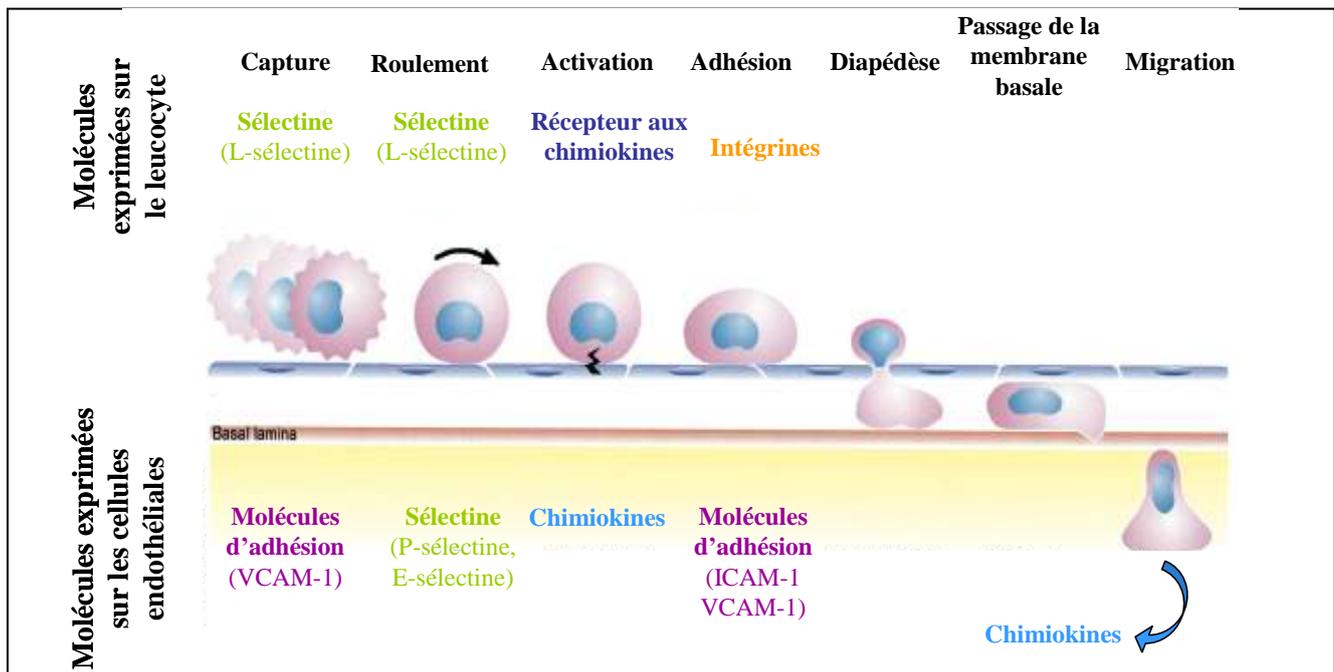
### **III.4. Le trafic leucocytaire**

Dans un cerveau sain, les cellules endothéliales de la BHE expriment très faiblement les molécules d'adhésion nécessaires à la migration des leucocytes dans le parenchyme. En dépit de ce bouclier hostile, il semblerait que certains lymphocytes T (LT) soient capables de pénétrer dans le SNC selon un mécanisme largement contrôlé. Ce mécanisme peut être divisé en différentes étapes qui sont décrites figure.18 (pour revue : Engelhardt, 2006).

Ce processus permet l'entrée des LT mais en nombre très limité dans le parenchyme d'animaux sains (Hickey, 1999). La plupart des recherches réalisées sur cette surveillance immunologique du SNC révèlent que si l'entrée des LT nécessite une activation préalable de la cellule, la nature de l'antigène, le type de CMH utilisé et le phénotype de la cellule T ne semblent pas être déterminants pour l'accès au parenchyme. Une stimulation antigénique récente semble suffisante (Fritz et al., 2000). Les travaux réalisés par Hickey indiquent que des LT activés *in vitro* de façon non spécifique par la concavaline A peuvent pénétrer efficacement dans le SNC 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'ont été identifiés pour un ciblage spécifique des leucocytes aux cellules endothéliales du SNC. Il semblerait au contraire, que les LT pénètrent de façon aléatoire dans le parenchyme. Toutefois, il existerait des disparités dans leur capacité à pénétrer le tissu nerveux, puisque les cellules T bénéficieraient d'une entrée facilitée au niveau de la moelle épinière alors que leur passage au niveau du cerveau serait plus difficile (Yeager et al., 2000).

L'homme et l'animal possèdent naturellement des cellules T capables de reconnaître des antigènes cérébraux. On peut toutefois noter que les LT activés ayant pénétré le SNC sain sont généralement incapables de provoquer une réaction immune, ce qui suggère l'existence de mécanismes d'entretien de l'homéostasie cérébrale. En effet, les LT entrant dans le parenchyme nerveux se retrouvent dans un environnement non favorable à leur survie et à leur action. D'une part, 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, reconnaîtrait le ligand Fas Ligand (CD95L) présent sur 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, favoriserait l'environnement immunosuppresseur en empêchant notamment la prolifération des LT (Taylor and Streilein, 1996).



**Figure 18 : La migration des leucocytes à travers la BHE.**

**La capture et le roulement.** 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 sur-expression 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 apparaît dans les minutes et la E-sélectine dans les heures qui suivent une exposition aux cytokines (Granger and Kubes, 1994). Leur disposition permet aux molécules de sélectines d'établir le premier contact avec les cellules endothéliales, puis 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 du 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 favorisent l'interaction entre les intégrines du leucocyte et les molécules d'adhésion de l'endothélium.

**La diapédèse.** La diapédèse correspond au point de non retour. Le passage du leucocyte à travers l'endothélium est permis grâce à la dégradation locale de la membrane basale. Le leucocyte, par des modifications morphologiques via le remodelage de son cytosquelette, 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, à travers la BHE ce phénomène 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 qui lui permet de migrer jusqu'au site de production. Il semblerait que les chimiokines présentent une certaine spécificité d'action en fonction du type cellulaire.

### CONCLUSION III

Comme nous venons de le détailler, le SNC représente un site immunologique particulier, isolé du reste de l'organisme par des barrières spécialisées qui favorisent le maintien d'un environnement immunosuppresseur. Toutefois, la présence constitutive de la microglie, une population cellulaire très réactive ainsi que l'adaptation du drainage lymphatique à l'anatomie locale, sont autant de témoignages du potentiel cérébral à répondre à des agressions ou des modifications de l'environnement comme la transplantation cellulaire. Ainsi, la greffe de neurones d'espèce différente de l'hôte se conclut par un rejet quasi systématique du greffon. Cette réponse immunitaire est médiée par des agents immunologiques spécifiques tels que les lymphocytes témoignant de la capacité du SNC à développer une réponse immunitaire adaptative. Les paramètres immunologiques de la transplantation, l'immunosuppression ainsi que la distance phylogénétique entre l'hôte et le donneur, sont les principaux déterminants pour la survie des xéno greffes neuronales. La caractérisation de ce rejet et la compréhension de la neuroimmunologie du SNC sont autant d'étapes nécessaires pour concrétiser l'espoir thérapeutique que représente la xénotransplantation.

## **IV. CARACTERISATION DU 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 nôtres, indiquent que les xénogreffes neuronales provoquent, dans une très grande majorité des cas et en quelques semaines, une réaction immune de l'hôte menant à la destruction du greffon (Finsen et al., 1991; Duan et al., 1995; Wood et al., 1996; Larsson et al., 2000; Larsson et al., 2001 (Remy et al., 2001)). Cette réaction immune est résumée à la fin de ce paragraphe (Fig. 21).

### **IV.1. Absence de rejet hyper aigu**

La xénotransplantation, définie comme la greffe de cellules entre espèces différentes peut être divisée en deux types. Les transplantations où le donneur et le receveur sont deux espèces relativement proches sont appelées xénogreffes concordantes et les transplantations entre espèces plus éloignées sont qualifiées de discordantes. Ces différences phylogéniques peuvent entraîner des variations immunologiques, notamment au niveau de la réponse innée. Ainsi, dans le cas des xénogreffes discordantes, on observe 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 singes les plus proches de l'homme, 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. Par exemple, la greffe de tissu porcine chez l'homme est considérée comme discordante.

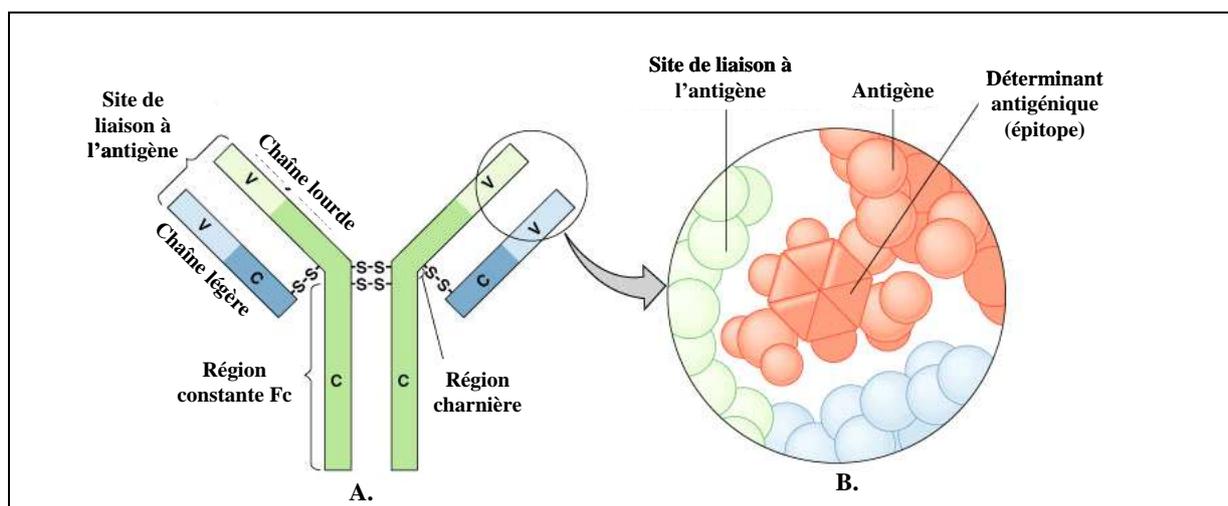
Pourtant, les xénogreffes neuronales intracérébrales même discordantes ne paraissent pas provoquer de rejet hyper aigu (Mason et al., 1986; Wood et al., 1996; Larsson et al., 1999). Ceci serait dû au fait que les cellules placées dans le parenchyme cérébral seraient isolées des facteurs humoraux de l'immunité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

## IV.2. Le rejet humoral

Le rejet humoral constitue la réponse immunitaire innée médiée par des effecteurs humorales correspondant à des molécules solubles. 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. Qu'en est-il de cette réponse dans la xénotransplantation intracérébrale ?

### IV.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 sécrétée. Les Ig ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines extrêmement variables à leurs extrémités (Fig.19).



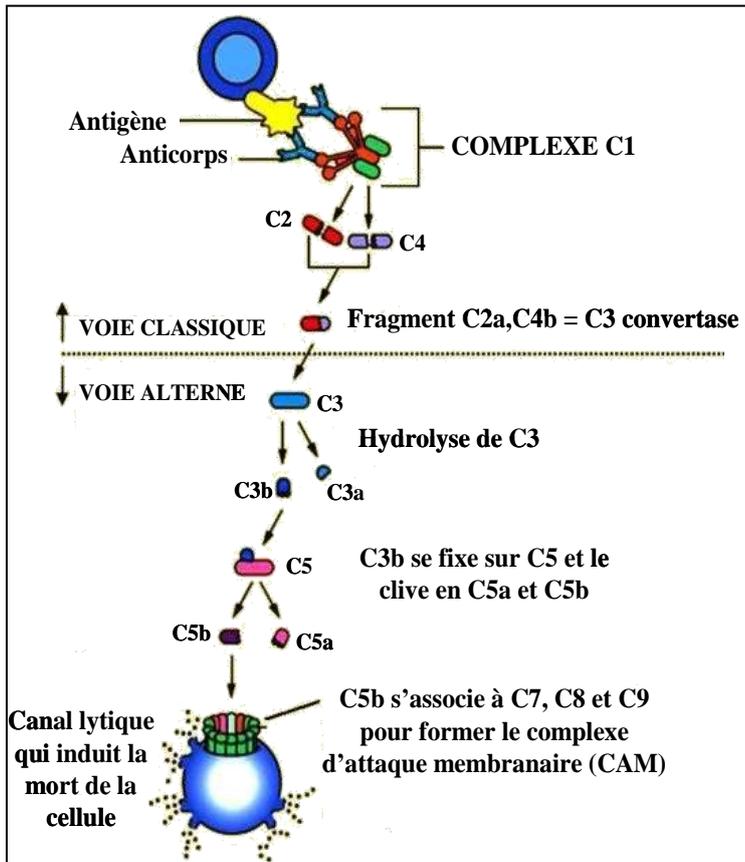
**Figure 19 : Structure des immunoglobulines (Ig).**

(A) Les Ig présentent une structure de base de 4 chaînes polypeptidiques qui forment une structure en Y. Deux chaînes légères (bleues) identiques et deux chaînes lourdes (vertes) identiques stabilisées et liées par des ponts disulfures intra et interchaînes qui assurent la flexibilité de la molécule. Les régions constantes Fc sont caractérisées par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre. Une Ig possède 4 domaines variables situés aux extrémités des 2 « bras ». L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde ( $V_H$ ) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère ( $V_L$ ) constitue le site de reconnaissance de l'antigène (B). Les Ig sont subdivisées en classes ou isotypes, selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes : il s'agit des immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Au cours de la réponse immunitaire, les anticorps ont trois fonctions principales : se lier à l'antigène, activer le système ~~de~~ complément et recruter des cellules immunocompétentes.

Dans les premiers jours qui suivent la transplantation, les Ig secrétées peuvent librement pénétrer le parenchyme cérébral en raison de la rupture de la BHE occasionnée lors 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 dans une combinaison discordante puisque Harrower et ses collaborateurs ont 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 anticorps naturels capables d'activer la cascade du complément et une implication des Ig dans la 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.

#### **IV.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 and Fries, 1991). Le système du complément est impliqué dans l'activité cytotoxique et cytolytique via la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) également appelé C5b-9, sur les membranes des cellules cibles (Fig. 20). L'une des hypothèses avancées serait que les débris cellulaires ou les cellules apoptotiques possédant une molécule du système du complément (par exemple, C3) à leur surface pourraient être reconnus et éliminés par les cellules microgliales activées ou les macrophages exprimant des récepteurs du complément tels que CR3 (Gasque et al., 2000).



**Figure 20 : Le système du complément.**

La voie classique est activée par la liaison entre le complexe C1 et le complexe antigène-anticorps. Cette interaction induit la dégradation de C1 en C1r et C1s. Puis, le C1s permet la lyse des complexes C2 et C4 en C2a/C2b et C4a/C4b. Les fragments C2a et C4b s'associent pour former la C3 convertase qui dégrade le complexe C3.

Dans la voie alterne, des particules microbiennes peuvent directement induire la formation de la C3 convertase.

Le complexe C3 est hydrolysé en C3a et C3b par la C3 convertase issue de la voie classique ou alterne. Le fragment C3b se fixe sur le complexe C5 qu'il clive. Enfin, le fragment C5b s'associe aux complexes C7, C8 et C9 pour former le complexe d'attaque membranaire. Ce dernier traverse la membrane de la cellule cible pour former un canal lytique qui provoque la mort de la cellule.

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 xéno greffe 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 xéno greffes 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 l'infiltration leucocytaire (Pratt et al., 1996) et accroître l'immunogénéicité du greffon (Dempsey et al., 1996).

### **IV.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 à la réponse immune adaptative nécessitant l'intervention de cellules spécialisées qui vont permettre de répondre spécifiquement et de garder la mémoire de l'antigène.

#### **IV.3.1. Le rôle des macrophages périvasculaires**

Les macrophages périvasculaires (MPV) n'appartiennent pas au parenchyme nerveux mais sont très largement associés au réseau vasculaire du SNC puisqu'ils sont insérés dans la membrane basale qui entoure les vaisseaux et sont adjacents à l'endothélium. Ainsi, ils peuvent 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, comme cela a été montré dans des expériences basées sur des moelles osseuses chimériques (Hickey and 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 and 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 xéno greffes.

#### **IV.3.2. Le rôle des cellules microgliales**

La transplantation cellulaire dans le SNC induit des bouleversements environnementaux favorisant l'activation rapide des cellules microgliales du striatum. Ainsi, dans les quelques jours qui suivent l'opération, elles adoptent leur phénotype macrophagique (*voir III.3.1.2*) et vont sécréter 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). Il a en effet

été démontré que le trafic leucocytaire à travers le parenchyme dépendait de la cinétique d'expression de ces molécules chimioattractantes (Asensio and Campbell, 1999). Néanmoins, malgré cette synthèse précoce de chimiokines, les leucocytes ne sont pas détectés 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).

Entre 5 à 7 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 pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$  et l'INF $\gamma$ , ainsi que les chimiokines MCP-1 et 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 et le choix d'une réponse Th1 ou Th2 (voir *IV.4.1.1*), 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 $\gamma$  (voir *IV.4.1.1*).

Ainsi, les cellules microgliales/macrophages sont caractérisées par une double intervention dans la réponse immunitaire occasionnée lors de xénotransplantation intracérébrale. En effet, après une activation précoce consécutive au traumatisme chirurgical dont l'implication dans la réaction immunitaire est encore mal comprise, les cellules microgliales activées/macrophages réapparaissent massivement au moment du rejet. A ce stade, il est probable que leurs sécrétions de cytokines, de chimiokines, de radicaux libres mais également de métalloprotéinases matricielles (MMP) favorisent l'entretien de la réponse inflammatoire ainsi que l'activation lymphocytaire (voir *IV.4.3.1*).

### **IV.3.2. 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 entretenir 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.

Par leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires d'une part et par leurs divers effets neuroprotecteurs d'autre part (*voir III.3.2.2*), le rôle précis des astrocytes dans la réponse immune induite lors de transplantation intracérébrale reste difficile à établir. Néanmoins, il est possible que par leur double propriété, ils jouent le rôle de régulateurs de la réponse inflammatoire.

### **IV.3.3. Le rôle des cellules Natural Killer (NK)**

Les cellules NK peuvent infiltrer le parenchyme cérébral sans maturation préalable. Cette infiltration se fait sous l'action de l'INF $\gamma$  mais surtout de l'IL-2 synthétisée par les lymphocytes T ce qui en font des cellules très souvent liées à l'immunité spécifique. Elles permettent une réponse rapide, et précèdent souvent de plusieurs jours la réponse cellulaire adaptative. Les cellules NK disposent de récepteurs qui leur permettent de reconnaître le fragment Fc des Ig. Ainsi l'interaction entre la cellule NK et le complexe immunitaire (complexe antigène-anticorps) induit une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC : Antibody-Dependant Cell mediated Cytotoxicity) qui passe par la sécrétion de perforines, molécules qui se polymérisent dans la membrane de la cellule cible pour former un canal lytique (Fig.23). Par ailleurs, les cellules NK peuvent également induire l'apoptose via la liaison Fas/Fas Ligand.

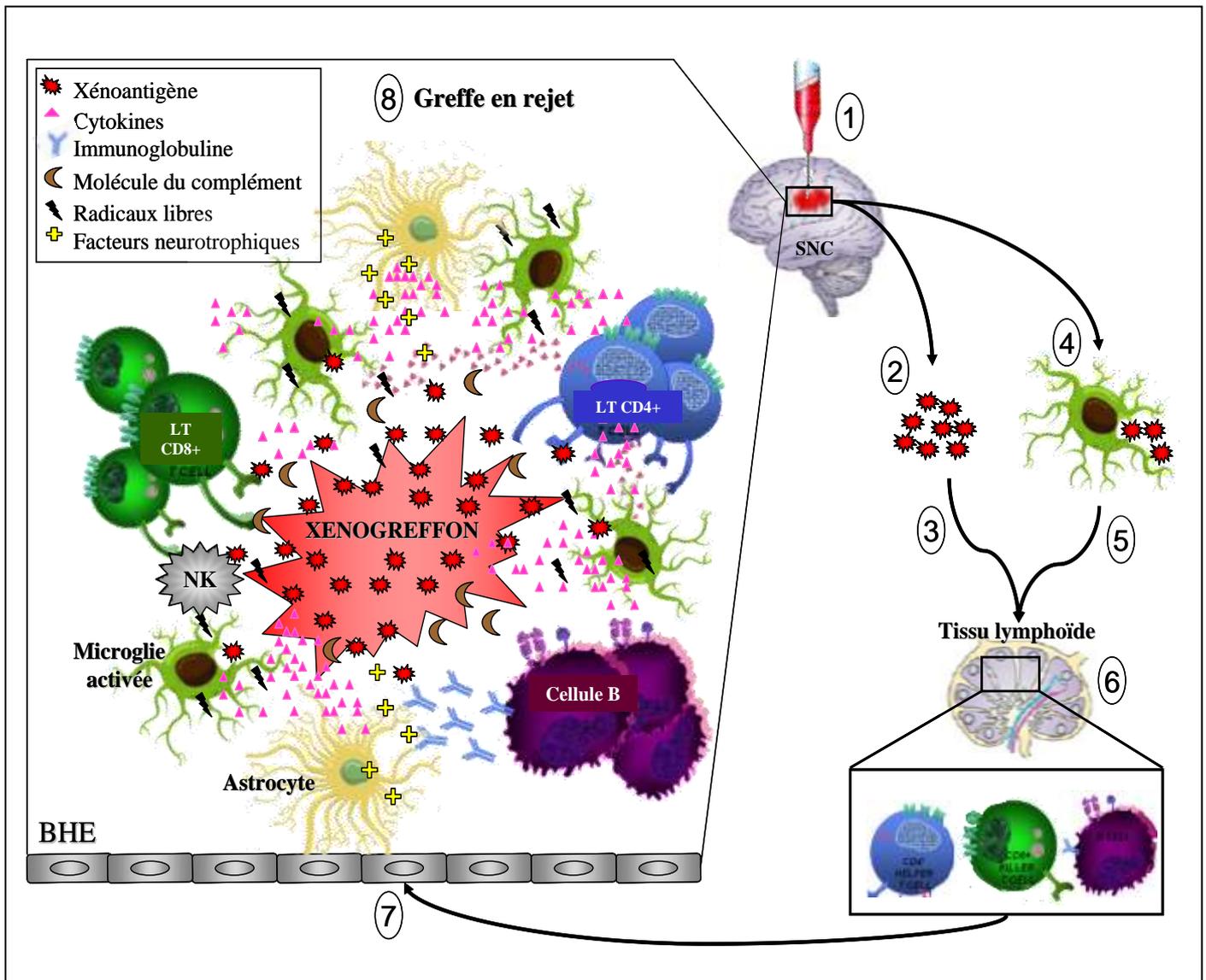
Leur rôle dans le rejet des xénogreffes intracérébrales est encore mal défini. In vitro, les cellules NK sont capables de lyser les cellules issues du mésencéphale ventral fœtal porcin mais uniquement en présence d'IL2 (Sumitran et al., 1999a). Bien que présentes dans la plupart des rejets de xénogreffes neuronales, le rôle des cellules NK ne semble pas essentiel puisque leur déplétion n'affecte pas significativement la survie des greffons porcins (Larsson

et al., 2001a). Toutefois, Sumitran et ses collaborateurs ayant montré une activité lytique des cellules NK vis à vis des neurones fœtaux porcins en présence d'anticorps naturels humains in vitro (Sumitran et al., 1999a), il est envisageable que leur rôle soit essentiellement lié à la présence des immunoglobulines.

#### **IV.3.4. Le rôle des lymphocytes T**

Malgré une intervention limitée de la réponse humorale et des cellules NK, les xénogreffes de neurones n'en restent pas moins rejetées, 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 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 ciclosporine 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 transplantation (Duan et al., 1995; Larsson et al., 2001b; Remy et al., 2001; Michel et al., 2006).

Les cellules T semblent donc avoir un rôle essentiel dans le processus de rejet des xénogreffes intracérébrales. Aussi, le développement de la transplantation neuronale comme stratégie thérapeutique nécessite une meilleure compréhension des mécanismes immuns inhérents au SNC et plus particulièrement ceux responsables de l'apparition soudaine et massive des cellules T dans le parenchyme.



### Figure 21 : Schéma récapitulatif sur le mécanisme de rejet des xéogreffes intracérébrales

La transplantation de la suspension cellulaire de neuroblastes porcins (1) induit la libération de xénoantigènes (2) dans le striatum de l'hôte. Puis, ces xénoantigènes peuvent soit migrer directement dans les ganglions cervicaux via le LCR (3), soit ils sont repérés par des CPA locales (4) qui peuvent les phagocyter ou les transporter dans les ganglions (5). Dans les ganglions il y a activation des cellules B par les xénoantigènes et activation des cellules T par les complexes CPA-xénoantigène (6). Les lymphocytes activés vont alors pouvoir franchir la BHE (7) et coopérer avec les autres médiateurs de la réponse immunitaire pour rejeter les cellules greffées (8).

**LT helpers** ( $CD4^+$ ) : produisent des cytokines qui favorisent l'activation des cellules microgliales/macrophages, l'activité cytotoxique des LTc ( $CD8^+$ ) ainsi que la production d'anticorps par les cellules B plasmacytoïdes.

**LT cytotoxiques** ( $CD8^+$ ) : lysent les cellules cibles  $CMHI^+$ .

**Cellules microgliales/macrophages** : phagocytent, synthétisent des cytokines libèrent des radicaux libres et restimulent les LT.

**Astrocytes** : sécrètent des cytokines et des facteurs neurotrophiques- **Cellules NK** : tuent les cellules cibles présentant des fragments Fc des Ig à leur surface.

**Molécules du complément** : favorisent la réponse cellulaire en permettant la reconnaissance des cellules cibles par les cellules microgliales/macrophages.

**Cellules B plasmacytoïdes** : sécrètent des Ig.

## **IV.4. La réponse cellulaire T en xénotransplantation**

### **IV.4.1. Les différents types de cellules T en périphérie**

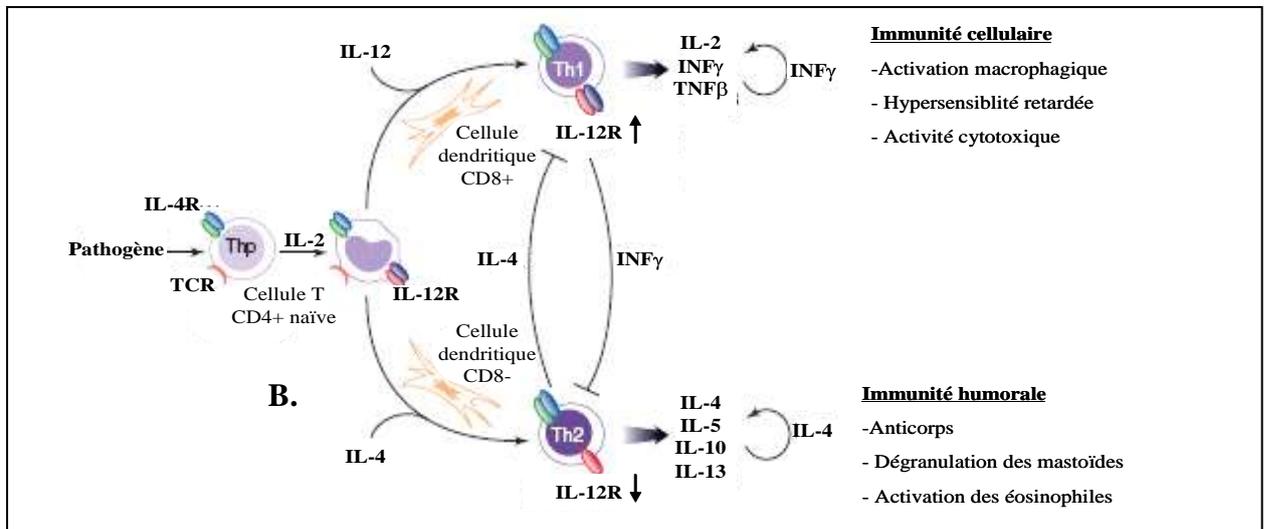
Les lymphocytes T sont divisés en deux sous populations majeures fonctionnellement différentes selon qu'elles expriment à leur surface et de façon mutuellement exclusive, les glycoprotéines CD4 ou CD8, appelées co-récepteurs. L'importance de ces deux populations de cellules T dans le rejet de greffe a été démontrée dans différents modèles expérimentaux.

#### **IV.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) ». En effet, elles sont responsables de la production de la plupart des cytokines stimulant la réponse immune. Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont les premières à reconnaître l'intrus et via les signaux chimiques que sont les cytokines, elles donnent l'ordre aux cellules T CD8<sup>+</sup> de tuer les cellules infectées, aux cellules B de produire des anticorps (ou immunoglobulines, Ig), exercent des effets paracrines sur les cellules microgliales/macrophages et des effets autocrines sur les cellules CD4<sup>+</sup>. 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. Effectivement, il a été montré que l'inactivation fonctionnelle (Okura et al., 1997) ou la déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> chez l'animal receveur (Wood et al., 1996), induisait la survie prolongée d'une xéngreffe intracérébrale.

Lorsqu'elles sont activées, 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 résumé figure. 22 (Mosmann et al., 1986). Activées lors de la reconnaissance antigénique, les cellules Th « naïves ou précurseurs » prolifèrent, secrètent de l'IL-12, expriment le récepteur IL-12Rβ1 (sous unité β1 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 intrastriatale chez le rat, semble révéler une contribution majeure des cellules Th1 (Melchior et al., 2002).

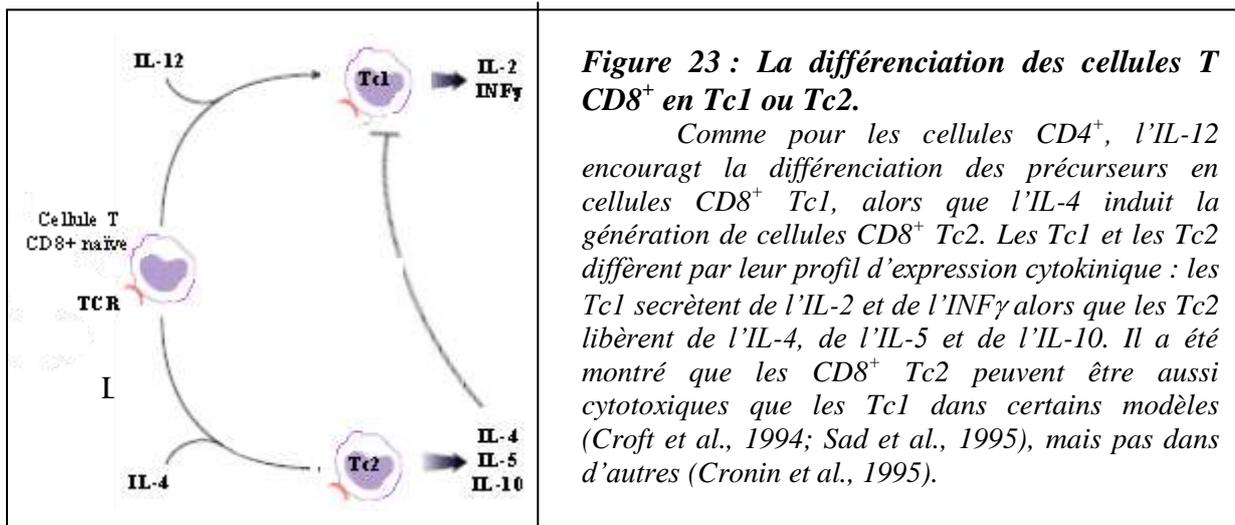


**Figure 22 : La différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th1 ou Th2.**

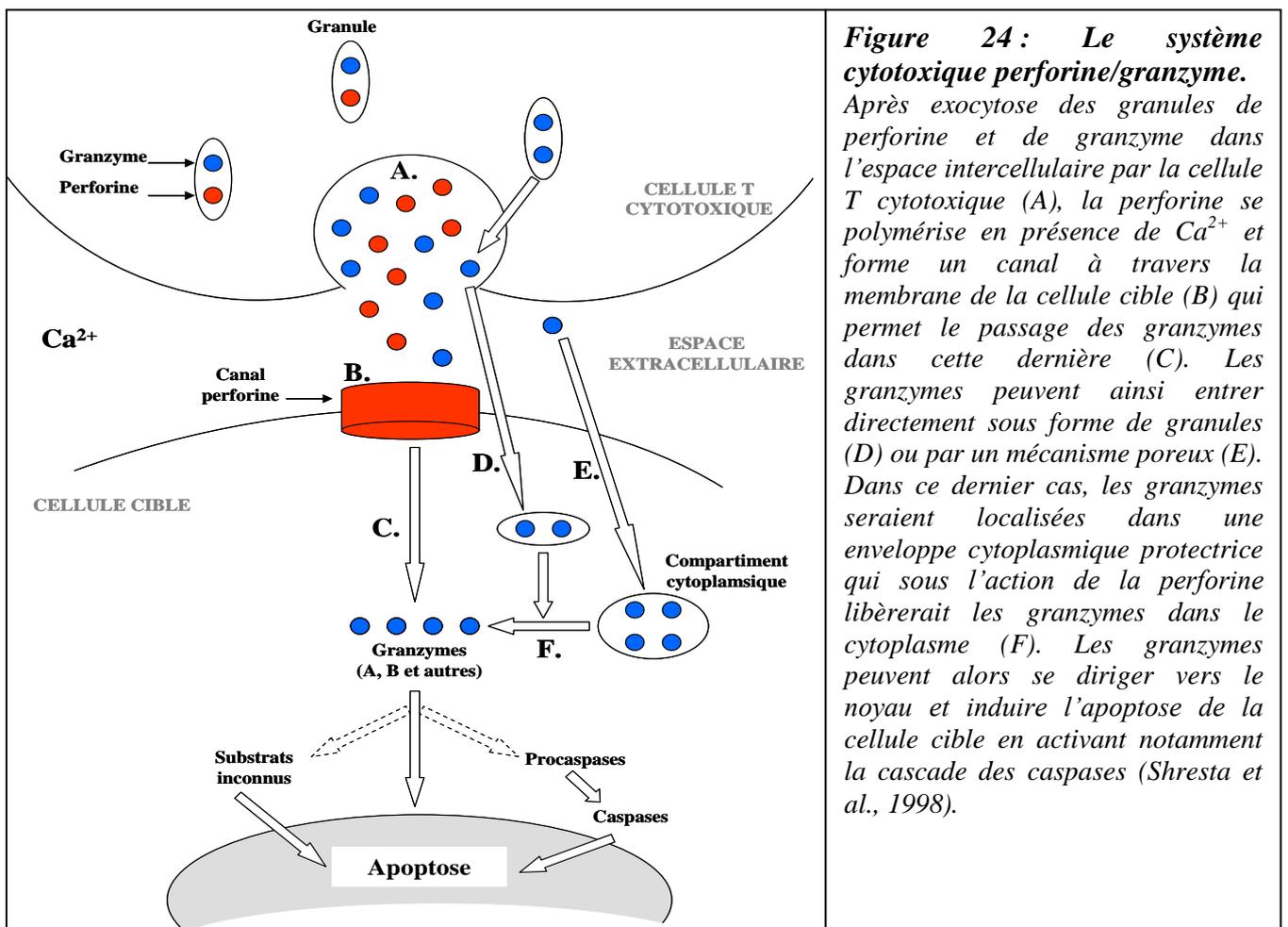
La cellule T CD4<sup>+</sup> est activée via le TCR lors de la rencontre avec un antigène présenté par une CPA. Une fois activée, la cellule Th commence à proliférer, à sécréter de l'IL-2 et à exprimer le récepteur à l'IL-12 (IL12R). (A) La rencontre avec l'IL-12 et le contact avec une cellule dendritique CD8<sup>+</sup>, initie le programme de différenciation Th1. En règle générale, l'activation Th1 stimule une réponse immune de type cellulaire. Les cellules Th1 sont ainsi impliquées dans les réactions inflammatoires de type hypersensibilité retardée médiées par les macrophages, avec libération par ces derniers, d'agents cytotoxiques tels que le monoxyde d'azote (NO), le TNFα ou de radicaux libres oxygénés (Tsicopoulos et al., 1992) (B) En revanche, l'IL-4 et le contact avec une cellule dendritique CD8<sup>-</sup> induit la différenciation Th2 (Rengarajan et al., 2000). Cette réponse induit la production de nombreuses cytokines proinflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13 (Rengarajan et al., 2000; Murphy and Reiner, 2002). D'autre part, les cytokines synthétisées sont associées à une réponse de type humorale (Mosmann et al., 1986; Gibb et al., 1991). Elles interviennent dans la réponse allergique en favorisant la prolifération et l'activation des éosinophiles.

**IV.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) ». Les cellules CD8<sup>+</sup> peuvent également être divisées en deux sous populations, les Tc1 et les Tc2 qui dépendent du microenvironnement cytokinique (Fig. 23).



La fonction cytotoxique des LTc est principalement caractérisée par la synthèse, calcium-dépendante, de granules de perforine et de granzymes (A et B) qui induisent la mort de la cellule cible par apoptose (Shresta et al., 1998) (Fig.24). Les LTc peuvent également induire le mécanisme d'apoptose via l'interaction Fas/Fas Ligand (Mosmann and Sad, 1996).



L'expression des molécules de CMH I dans le cerveau sain étant quasi inexistante, il y a 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 tétrodothine restaure la possibilité d'induction de l'expression de CMH I via l'INF $\gamma$  sur les neurones (Neumann et al., 1995; 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 and Lassmann, 1990).

Il est à noter que bien qu'elles soient présentes au moment du rejet (Michel et al., 2006), la déplétion des animaux receveurs en cellules CD8<sup>+</sup> n'induit pas de survie prolongée d'une xélogreffe intracérébrale (Wood et al., 1996), indiquant un rôle mineur de cette population cellulaire dans le rejet de telles greffes.

#### **IV.4.2. Le mécanisme d'activation des cellules T**

L'activation des cellules T nécessite l'interaction avec une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Le contact initial entre la CPA et la cellule T correspond à la liaison transitoire entre la molécule d'adhésion ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) exprimée sur les CPA et l'intégrine LFA-1 (Leucocyte Function associated Antigen-1) des cellules T. Ce rapprochement initie la formation d'une synapse immunologique entre les deux types cellulaires au sein de laquelle le mécanisme d'activation de la cellule T va se mettre en place.

##### **IV.4.2.1. La reconnaissance antigénique**

###### **a. Les différents types d'antigènes**

La conséquence de la transplantation intracérébrale est l'apparition de deux types d'antigènes au sein du SNC: les antigènes mineurs et majeurs.

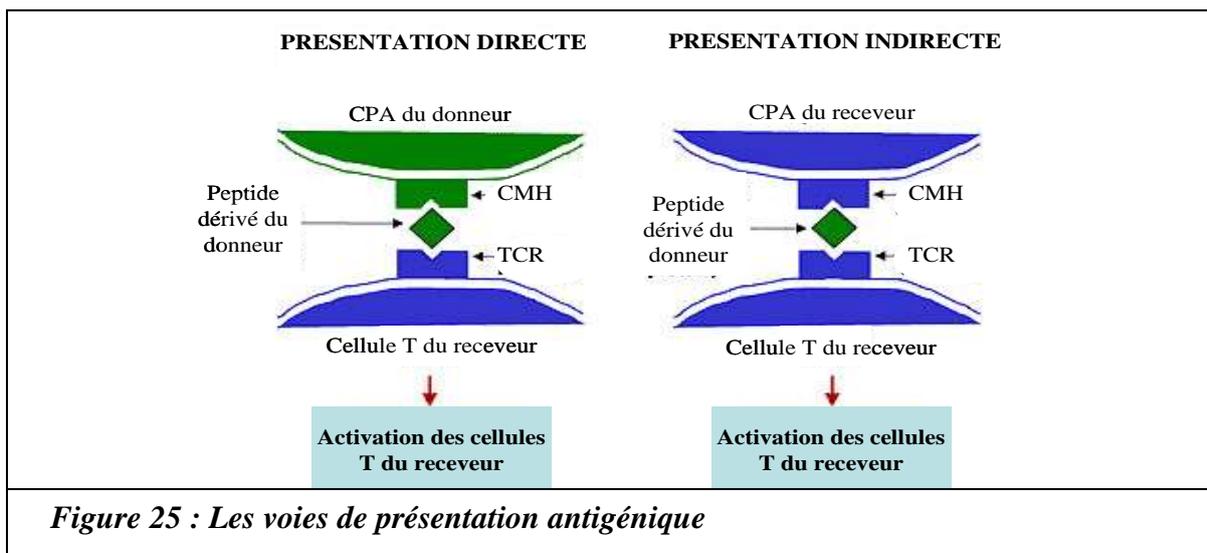
Les antigènes majeurs correspondent aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMHI et CMHII) qui sont essentielles dans la reconnaissance par les cellules T (du même individu) des antigènes qu'elles leur présentent.

Le polymorphisme de ces molécules induit une grande disparité entre les molécules du CMH de deux individus étrangers puisque chacun dispose d'une molécule qui lui est spécifique. Les cellules T sont cependant capables de reconnaître chaque disparité de CMH et d'induire le rejet de cellules porteuses d'un CMH qui lui est étranger. Cette caractéristique du système immunitaire correspond à un obstacle majeur à la transplantation pour l'acceptation du greffon (Dausset, 1981; Sherman and Chattopadhyay, 1993).

Les antigènes mineurs regroupent des peptides dérivant de la dégradation des protéines ou de glycoprotéines issues des cellules greffées telles que les neurones, les astrocytes, la microglie ou encore les cellules endothéliales. Ils sont présentés par les molécules de CMH localisées sur les CPA du receveur.

### b. Les voies de reconnaissances

Il existe deux voies de reconnaissance des antigènes en transplantation: la voie directe et la voie indirecte résumées figure 25.



Dans la voie directe, la suspension cellulaire transplantée peut renfermer des CPA qui, sous l'effet du traumatisme chirurgical s'activent et expriment les molécules de CMH spécifiques du donneur. Ces CPA peuvent alors migrer dans les organes lymphoïdes du receveur où les molécules du CMH de classe I et II qu'elles expriment seront reconnues respectivement par les cellules T  $CD8^+$  et  $CD4^+$  du receveur comme des antigènes majeurs.

Dans la voie indirecte, ce sont les CPA locales du receveur qui digèrent les molécules antigéniques issues de la transplantation. Après migration de ces CPA vers les organes lymphoïdes, les antigènes (mineurs) sont alors présentés via le CMH aux cellules T (Gould and Auchincloss, 1999; Le Moine et al., 2002; Tambur and Roitberg, 2005).

La reconnaissance directe, faisant intervenir des CPA étrangères, est une voie de reconnaissance spécifique à la transplantation. La voie normale de reconnaissance des microorganismes par le système immunitaire correspond à la voie indirecte. Cette dernière voie de reconnaissance semble d'ailleurs majoritaire dans le processus de rejet des xéno greffes intracérébrales.

#### **IV.4.2.2. L'interaction TCR/CMH peptide**

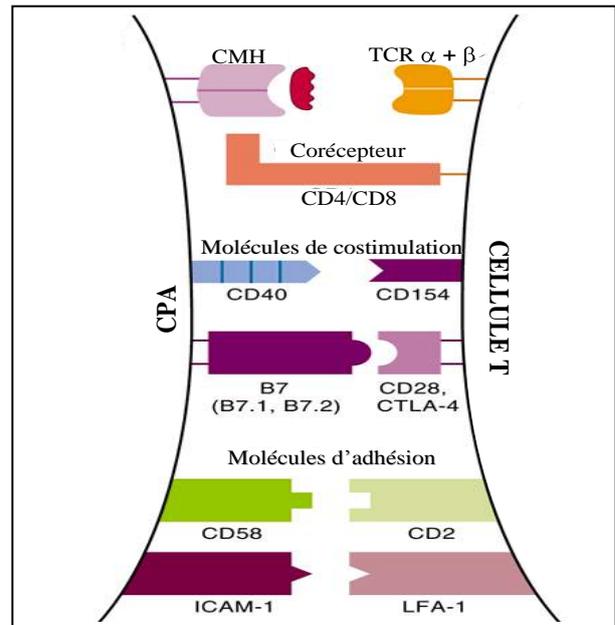
Les LT interagissent avec les molécules du CMH de classe I ou II et leurs peptides antigéniques grâce à un récepteur hautement polymorphe, le TCR (T-Cell Receptor). Il s'agit d'un complexe multi-protéique composé d'un hétérodimère clonotypique non covalent formé des deux chaînes  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Les  $LT\gamma\delta$  constituent une population mineure (<5%) des cellules T qui sont spécialisés dans la reconnaissance de macromolécules telles que les hydrates de carbone. Dans le processus de rejet d'une xéno greffe, les  $LT\gamma\delta$  restent très minoritaires (Michel et al., 2006) et l'essentiel de la population infiltrant appartient à la classe des  $LT\alpha\beta$  dont le TCR permet la reconnaissance d'antigènes peptidiques présentés par une molécule de CMH. L'interaction de haute affinité entre le TCR et le complexe CMH-peptide (CMHp) se produit en coordination avec les molécules accessoires CD4 ou CD8 des cellules T pour établir une région appelée la « synapse immunologique » (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999). Le TCR est responsable de la spécificité de reconnaissance de l'antigène.

Dépourvu de domaine intracellulaire, la transduction du signal est médiée par le complexe CD3, associé au TCR et constitué de plusieurs chaînes polypeptidiques (hétérodimères  $\gamma\delta$ ,  $\delta\epsilon$  et homodimère  $\zeta\zeta$ ). L'interaction TCR-CMHp stimule CD3 qui en réponse provoque l'activation de nombreuses voies de signalisation notamment via diverses protéines kinases. L'interaction TCR-CMHp est cependant insuffisante à elle seule pour induire l'activation des gènes spécifiques nécessaires à l'activation et à la prolifération des LT.

#### **III.4.2.3. La costimulation**

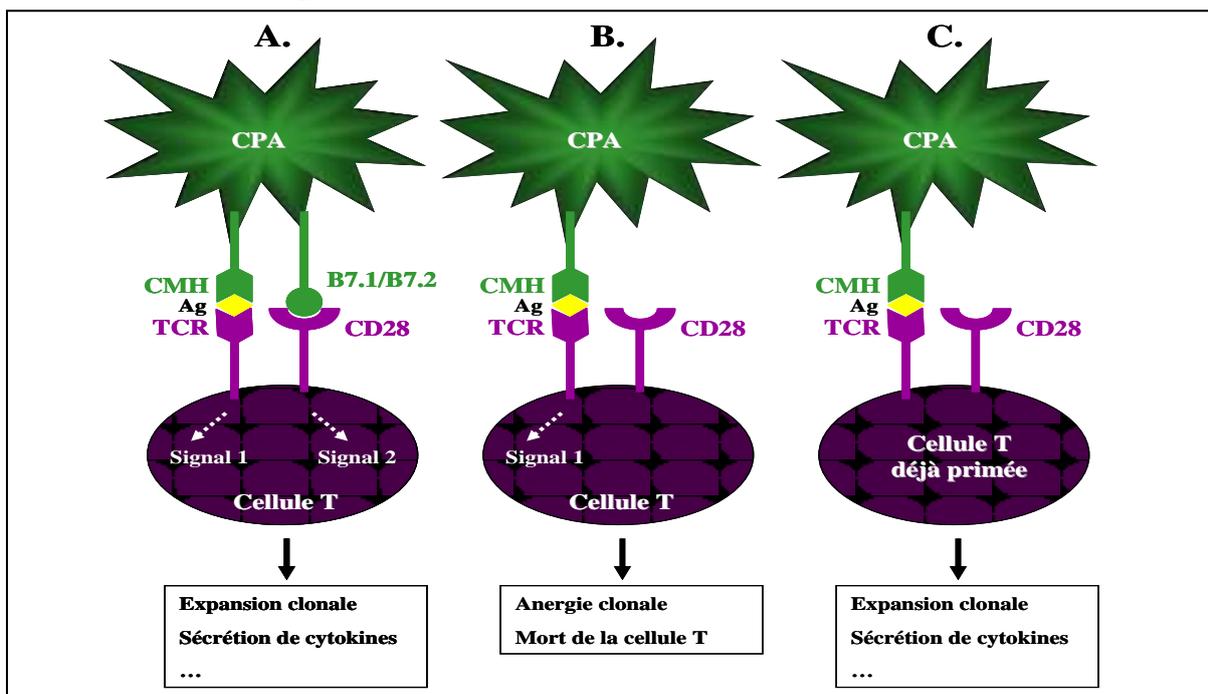
Alors que la liaison TCR-CMHp dicte la spécificité antigénique de la réponse et joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'activation des LT, un autre signal est indispensable pour compléter l'activation. Le modèle du « second signal », développé dans les années 70, postulait qu'une costimulation non spécifique de l'antigène devait être additionnée au signal initial généré par le couple TCR-CMHp, pour induire l'activation des cellules T naïves.

En effet, la liaison TCR-CMHp engendre l'expression de CD40 sur les CPA et de CD40 Ligand (CD154) sur les cellules T (Castle et al., 1993; Leveille et al., 1999). L'interaction CD40/CD40 Ligand induit la synthèse et l'expression par les CPA d'un récepteur de type B7 (B7.1 et B7.2), présent à leur surface et qui interagit avec la molécule CD28 exprimée de façon constitutive sur les cellules T (Fig. 26). Cette interaction délivre un second signal qui complète le processus de présentation antigénique (Lenschow et al., 1996; Lanzavecchia, 1997).



**Figure 26 : Les molécules de costimulation**

En accord avec le modèle du second signal, plusieurs réponses distinctes résumées dans la figure 27 peuvent se produire suite à l'interaction entre la CPA et la cellule T. A) En présence des signaux de costimulation, l'activation du TCR résulte en une expansion clonale des cellules T. B) En l'absence des signaux de costimulation, l'interaction de la cellule T avec le même antigène conduit à une anergie clonale. C) En l'absence des signaux de costimulation, la réactivation des cellules T déjà primées peut se produire par la simple interaction TCR-CMHp (June et al., 1994; Schwartz, 1996).



**Figure 27 : Les voies de costimulation**

### **IV.4.3. Les CPA potentielles dans le SNC**

Pour pouvoir présenter l'antigène efficacement de façon à induire une réponse T spécifique, les cellules candidates au rôle de CPA doivent disposer de toute la machinerie nécessaire (CMH, molécules de costimulation...). Il est également important de différencier les CPA capables d'initier une réponse primaire par la présentation antigénique à des cellules T naïves, et les CPA ne permettant qu'une réponse secondaire, par la présentation d'antigène à des cellules T qui ont déjà été exposées à des antigènes.

#### **IV.4.3.2. La microglie**

L'expression des molécules du CMH II à la surface des cellules microgliales correspond à l'un des premiers signes de leur activation. Mais outre l'apparition de ces molécules, la microgliose se caractérise également par l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) qui rend le contact initial entre LT et CPA possible. Ainsi, de nombreuses études ont cherché à déterminer si les cellules microgliales pouvaient se comporter comme des CPA.

Des analyses *in vitro* ont été réalisées sur des cellules microgliales humaines et murines stimulées par l'INF $\gamma$ . Elles ont révélé que ces cellules étaient capables de présenter des molécules d'adhésion et de costimulation à leur surface, de préparer l'antigène, d'activer des cellules T naïves (Aloisi et al., 1999) et plus particulièrement une réponse T CD4<sup>+</sup> et de restimuler la réponse T (Ford et al., 1996). En revanche, il semble que les cellules microgliales de rat n'expriment que très faiblement les molécules d'adhésion et de costimulation (B7.1 et B7.2). Ce niveau basal d'expression induirait une présentation antigénique incomplète qui permettrait uniquement de maintenir les cellules T effectrices fonctionnelles (production des cytokines) mais sans engendrer d'expansion clonale (Ford et al., 1995; Ford et al., 1996; Sedgwick et al., 1998). Par ailleurs, il a été rapporté que les cellules microgliales activées, par leur capacité à sécréter la chimiokine MIP-1 $\alpha$ , qui stimule les cellules Th1, ainsi que par leur sécrétion d'IL-12, pourraient favoriser la polarisation Th1 des cellules T CD4<sup>+</sup> ayant franchi la BHE et atteint le parenchyme nerveux. Dès lors, il y aurait une intensification de la réaction inflammatoire (Aloisi et al., 2000).

En ce qui concerne les études *in vivo*, les résultats restent également controversés. Il a été montré que suite à l'injection intraparenchymale de l'antigène BCG (Bacille de Calmette et Guérin), les cellules microgliales étaient incapables d'initier une réponse cellulaire T (Perry, 1998). Cependant, une injection secondaire périphérique du BCG induisait une

réponse inflammatoire dans le SNC (Perry, 2000). Ces résultats suggèrent la possibilité d'une stimulation secondaire des LT activés ayant pénétré le SNC ainsi que l'intensification de la réaction inflammatoire par les cellules microgliales du SNC.

#### **IV.4.3.1. Les astrocytes**

Les astrocytes activés expriment les molécules du CMH de classe II in vitro (Wong et al., 1984) ainsi que la molécule d'adhésion ICAM-1, in vitro et in vivo (Shrikant et al., 1994; Shrikant et al., 1995; Aloisi et al., 1998). Ces molécules sont des atouts essentiels pour un rôle des astrocytes en tant que CPA puisqu'elles sont nécessaires à l'établissement du contact initial avec la cellule T.

Cependant, in vivo les résultats sont contradictoires. En effet, alors que l'expression de la molécule du CMH II sur les astrocytes avait été observée par Traugott et Lebon (Traugott and Lebon, 1988), celle-ci n'a pas été retrouvée par d'autres auteurs dans des contextes inflammatoires tels que l'injection intracérébrale de LPS ou de sclérose en plaque (Bo et al., 1994; Montero-Menei et al., 1994). L'expression des molécules de costimulation B7 et CD40 in vivo font également l'objet de nombreuses divergences. Ainsi, Soos et son équipe ont montré que les astrocytes de souris activés par l'INF $\gamma$  exprimaient B7.2 (Soos et al., 1999), mais ces résultats n'ont pas été retrouvés par Aloisi chez la souris (Aloisi et al., 1998) ni par Satoh chez l'homme (Satoh et al., 1995). Les données concernant l'expression de CD40 sur les astrocytes sont également contradictoires (Tan et al., 1998 ; Aloisi et al., 1998; Nguyen and Benveniste, 2000).

Il existe donc encore de nombreuses divergences dans la littérature concernant la capacité des astrocytes à exprimer les molécules de CMH II et de costimulation B7.1, B7.2 et CD40 in vivo. Cependant, il paraît peu probable qu'ils puissent initier une réponse proliférative de cellules T naïves, mais pourraient plutôt favoriser une réponse secondaire via leur sécrétion de cytokines proinflammatoires (Sedgwick et al., 1991; Matsumoto et al., 1992; Weber et al., 1994). Néanmoins, outre leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, les astrocytes produisent également des cytokines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ ) qui peuvent s'opposer à l'activation des LT. Le rôle précis des astrocytes reste encore une fois difficile à établir.

#### **IV.4.3.3. Les cellules endothéliales**

Résidant à l'interface entre la circulation sanguine et le parenchyme cérébral, les cellules endothéliales microvasculaires de la BHE ont longtemps été considérées comme des

CPA potentielles en raison de leur position anatomique unique entre les cellules T circulantes et les antigènes présents dans le SNC. Les cellules endothéliales expriment de façon constitutive la molécule du CMH I (Hoftberger et al., 2004). L'expression de la molécule du CMH II est uniquement induite (Jemison et al., 1993) et l'augmentation de leur quantité juste avant l'infiltration des cellules immunitaires dans le cerveau, suggère un rôle important des cellules endothéliales activées dans les réactions inflammatoires au sein du SNC (Sobel et al., 1984). Par ailleurs, les cellules endothéliales humaines ou murines expriment in vitro la molécule de costimulation B7 suite à une stimulation à l'INF $\gamma$  (Prat et al., 2000). Ces observations suggèrent que les cellules endothéliales pourraient présenter des antigènes aux cellules T, dans un contexte pro-inflammatoire favorable. Cependant, des études de présentation antigénique effectuées sur des cellules endothéliales de souris (Risau et al., 1990) ou d'homme (Prat et al., 2000) n'ont montré aucune réponse proliférative des cellules T alors que CMH II et B7 étaient bien exprimés. Les cellules endothéliales de la BHE ne seraient donc pas des CPA efficaces. Elles pourraient en revanche intervenir dans la réaction inflammatoire en produisant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 (Fabry et al., 1993). Suite à une activation, les cellules endothéliales microvasculaires reviennent à leur état quiescent, mais une activation retardée/décalée est observée sur les cellules du SNC adjacentes à la BHE (astrocytes et cellules microgliales). Cette observation suggère que les cellules endothéliales pourraient correspondre à un point relais à partir duquel un second messager, modulateur de l'activation cellulaire intracérébrale, serait libéré. La sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-8 par les cellules endothéliales, renforce cette hypothèse du fait de la capacité de ces cytokines à activer les cellules gliales (Lou et al., 1996). Il semble donc que la participation des cellules endothéliales à la réponse immune reste principalement caractérisée par leur rôle dans la perméabilité de la BHE, dans le trafic des lymphocytes dans le parenchyme cérébral et probablement par une sécrétion de cytokines.

#### **IV.4.3.4. Les macrophages périvasculaires**

Contrairement à la microglie au repos, les MPV ont une activité phagocytaire (Mato et al., 1996) et expriment de nombreux marqueurs de type macrophagique tels que ED-2 (Graeber et al., 1989), CMH II (Streit et al., 1989), le co-récepteur CD4.

Ces MPV ont fait l'objet de multiples études in vitro et in vivo qui ont permis de conclure que ces cellules sont des CPA compétentes. Chez le rat, par exemple, les macrophages périvasculaires ont la capacité d'induire une réponse proliférative des cellules T CD4<sup>+</sup> significativement plus importante que la réponse induite par la population microgliale

résidente du parenchyme (Ford et al., 1995). En effet, à l'inverse de la microglie résidente qui n'est pas ou peu renouvelée, les cellules périvasculaires sont rapidement remplacées par des cellules circulantes. Les macrophages périvasculaires expriment des taux élevés de CMH II dans le SNC sain chez l'homme (Bo et al., 1994; Ulvestad et al., 1994) ainsi que les molécules de costimulation. Ces cellules sont également connues pour leur capacité à phagocyter, une propriété nécessaire pour la préparation de l'antigène. La capacité de migration de ces cellules, le long de l'espace périvasculaire, pour atteindre les ganglions lymphatiques et initier une réponse T spécifique reste encore à mettre en évidence. Toutefois, en raison de leur position stratégique entre l'endothélium et le parenchyme nerveux, les macrophages périvasculaires correspondent à des candidats idéaux pour la restimulation des cellules T préalablement activées en périphérie (Hickey and Kimura, 1988)

#### **CONCLUSION IV**

Les xéno greffes de neurones embryonnaires induisent une réponse immunologique dont certaines caractéristiques restent encore à mettre en évidence. En effet, alors qu'une forte activation microgliale et astrocytaire se met en place dès les premiers jours qui suivent l'opération favorisant la sécrétion de nombreuses cytokines, la greffe semble ensuite tolérée. Cependant, autour de la sixième semaine post-transplantation une infiltration massive de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> apparaît dans le striatum associée au transplant. Or, ces cellules sont normalement absentes du parenchyme nerveux et les mécanismes responsables du recrutement des LT périphériques restent flous. La recherche de cellules pouvant jouer le rôle d'initiatrice de la réponse T fera l'objet des deux premières parties de mon travail de thèse.

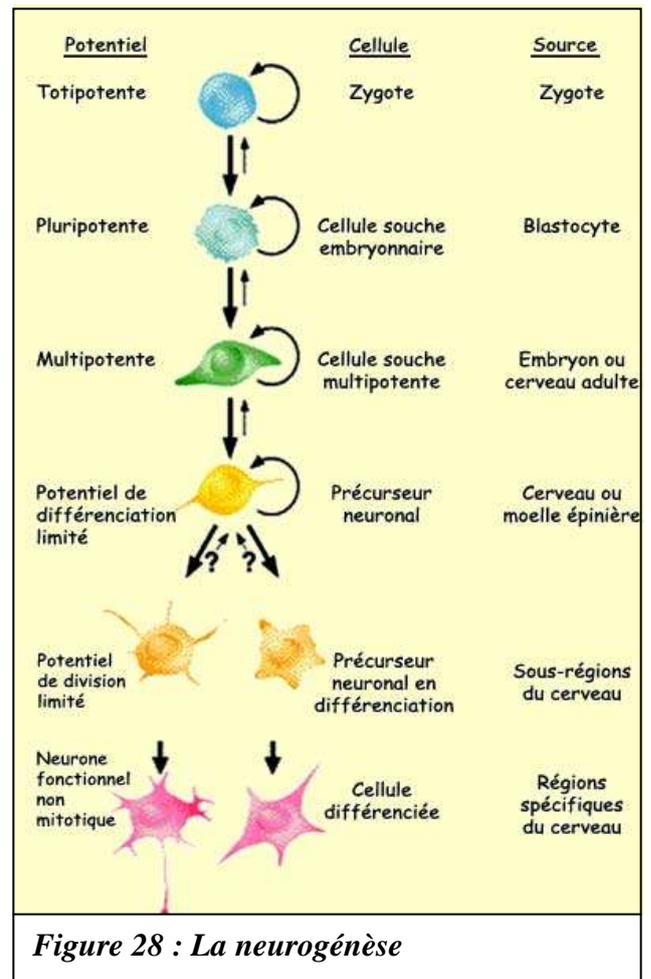
L'obstacle majeur à la xénotransplantation de neurones embryonnaires est de nature immunologique. Or, divers travaux indiquent que les cellules souches neurales (CSN) seraient moins immunogènes et donc moins susceptibles d'être rejetées que des neurones embryonnaires. La troisième partie de mon travail de thèse a donc consisté à étudier l'intérêt d'utiliser des CSN en tant que source cellulaire pour des xénotransplantations dans le SNC. La dernière partie de mon introduction décrit les caractéristiques majeures de ces CSN.

## V. LES CELLULES SOUCHES NEURALES

La caractérisation des cellules souches neurales a fait naître beaucoup d'espoir pour une utilisation thérapeutique dans les maladies neurodégénératives telle que la MP. En effet, cette source alternative de cellules, aux capacités de prolifération et de différenciation sans précédent, a ouvert de nouvelles voies de recherche concernant principalement la stratégie thérapeutique de substitution neuronale.

### V.1. Définition

Les cellules souches se caractérisent par leur caractère indifférencié et leur capacité à s'auto-renouveler (Hall and Watt, 1989). Toutefois, on distingue différentes catégories de cellules souches selon leur potentiel de différenciation (Fig. 28): 1) les cellules souches totipotentes sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme et peuvent conduire au développement d'un individu complet. 2) Les cellules souches pluripotentes offrent une spécialisation plus restreinte ; elles correspondent aux cellules de l'embryon pendant les premières divisions de l'ovule fécondé (cellules ES). 3) Les cellules souches multipotentes, résident dans les tissus différenciés et peuvent générer les différents types cellulaires de leur tissu originel.



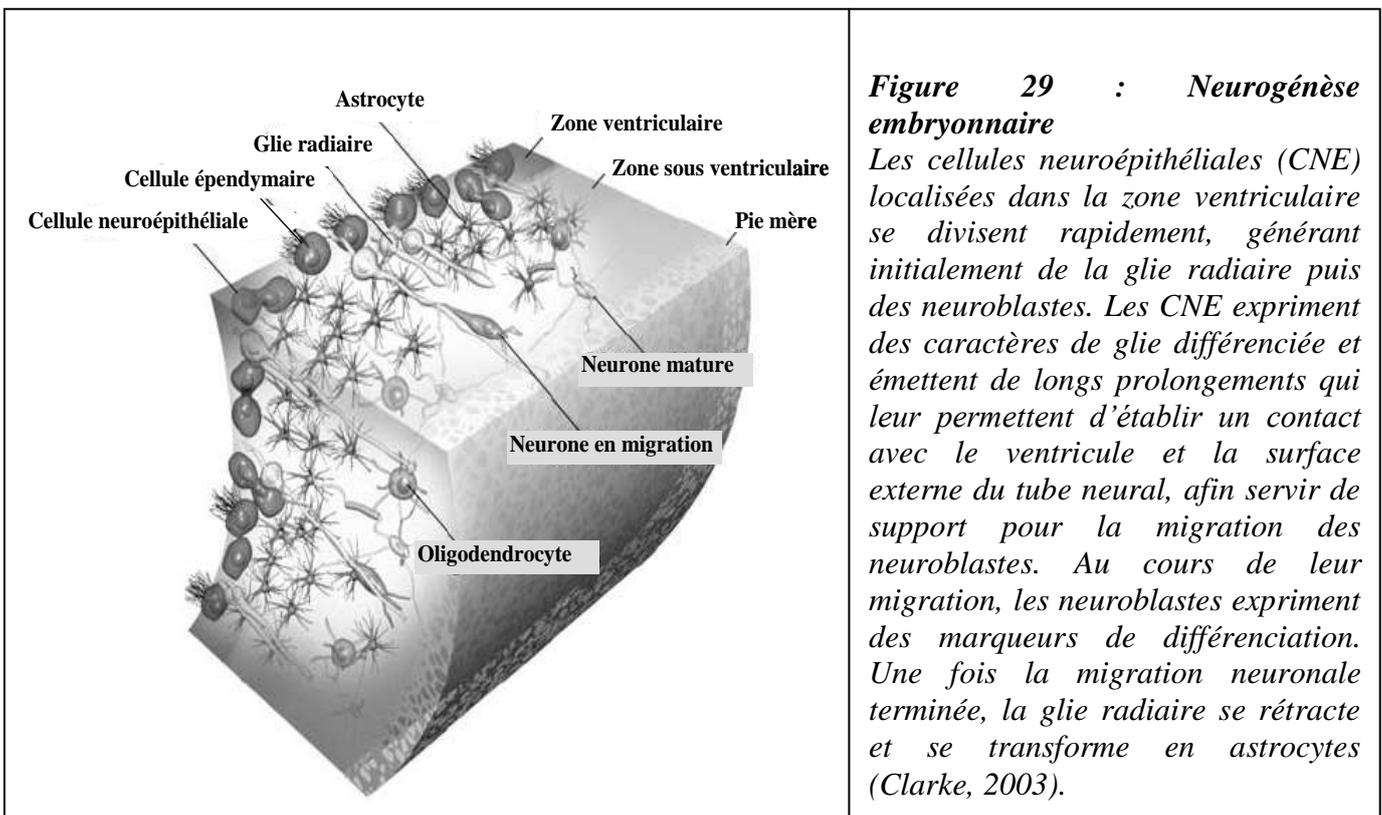
Dans le SNC, les cellules souches multipotentes correspondent aux cellules souches neurales (CSN). Elles sont définies sur la base de deux propriétés fonctionnelles : une capacité d'auto-renouvellement et la possibilité de générer les différents types cellulaires du SNC à savoir les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Cette différenciation se fait par l'intermédiaire de progéniteurs neuronaux ou gliaux (Seaberg and 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). 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).

### **V.1.1. Les cellules souches neurales chez l'embryon**

Au cours du développement embryonnaire, le tube neural est constitué par une population cellulaire homogène appelée les cellules souches neuroépithéliales (Fig. 29) (Kalyani et al., 1997). Ces cellules prolifèrent et correspondent à la première population identifiable de CSN. Puis, elles se concentrent dans une zone de prolifération appelée la zone ventriculaire formée par une simple couche d'épithélium pseudostratifié. Cependant, la prolifération des cellules s'accompagne d'un phénomène d'apoptose qui maintient constant le pool de CSN (Li et al., 2002; Sommer and 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 elles sont à l'origine des neurones et des cellules gliales du SNC par l'intermédiaire de progéniteurs neuronaux et gliaux (Morrison et al., 1997; Gage, 2000).

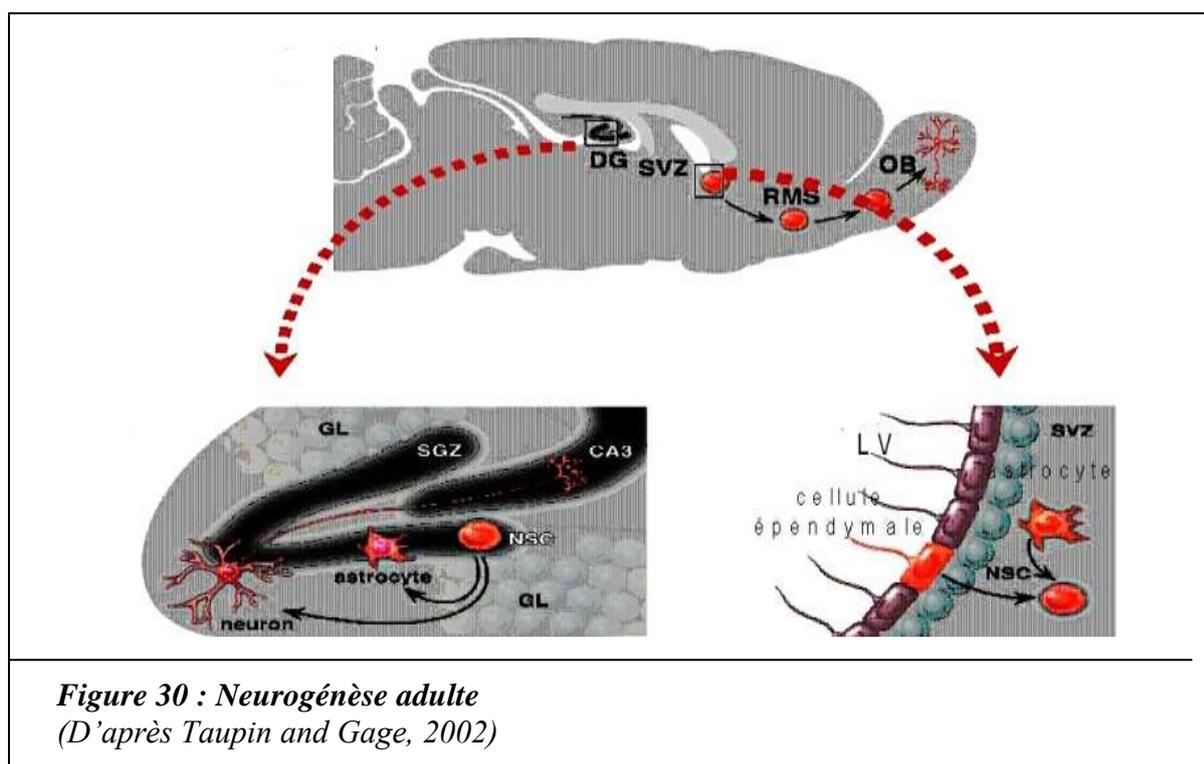


**Figure 29 : Neurogénèse embryonnaire**

*Les cellules neuroépithéliales (CNE) localisées dans la zone ventriculaire se divisent rapidement, générant initialement de la glie radiaire puis des neuroblastes. Les CNE expriment des caractères de glie différenciée et émettent de longs prolongements qui leur permettent d'établir un contact avec le ventricule et la surface externe du tube neural, afin servir de support pour la migration des neuroblastes. Au cours de leur migration, les neuroblastes expriment des marqueurs de différenciation. Une fois la migration neuronale terminée, la glie radiaire se rétracte et se transforme en astrocytes (Clarke, 2003).*

### V.1.2. Les cellules souches neurales chez l'adulte

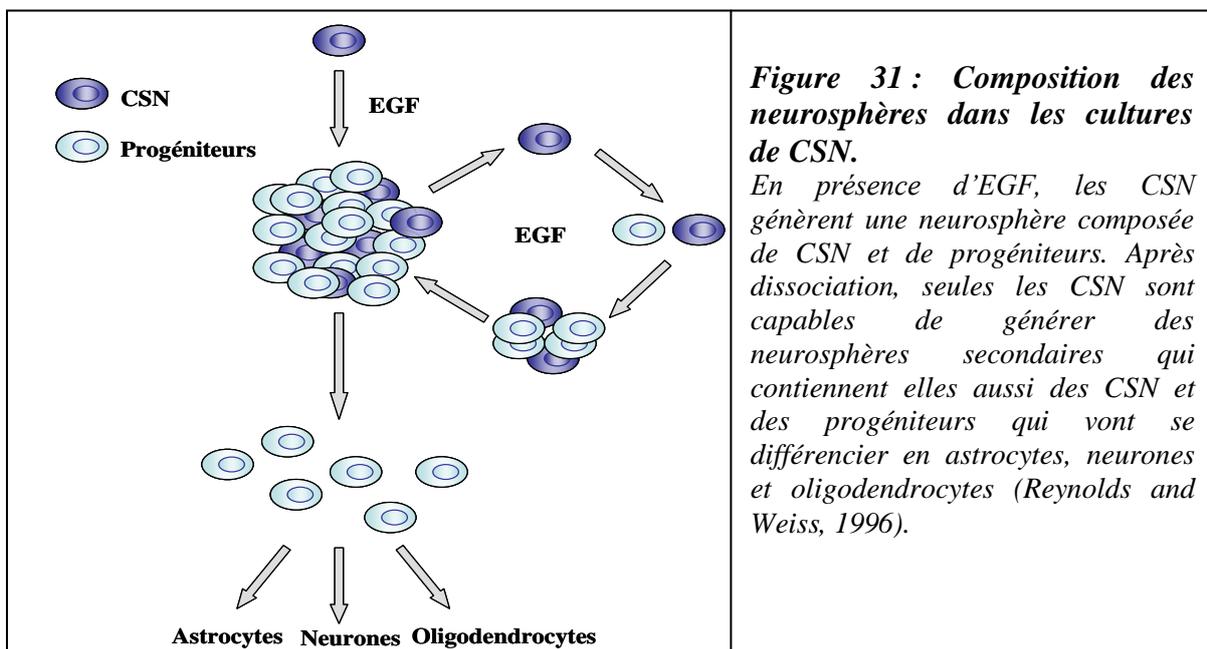
La neurogénèse dans le SNC des mammifères adultes a longtemps été considérée comme improbable. Pourtant, dès 1965 Altman et Das avaient montré une synthèse active d'ADN dans des cellules présentant une morphologie neuronale, grâce à l'incorporation de thymidine tritiée (Altman and Das, 1965). L'utilisation plus récente de la bromodéoxyuridine (BrdU) dans les années 90 a confirmé l'existence d'une neurogénèse active dans certaines régions du SNC (Corotto et al., 1993; Seki and Arai, 1993). Le renouvellement neuronal chez l'adulte suppose que de nouvelles cellules sont produites à partir d'une zone germinative, puis acheminées et induites à se différencier en véritables neurones. Deux principales zones neurogéniques ont été mises en évidence (Fig. 30) : 1) la zone sous-ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral (Morshead et al., 1994; Craig et al., 1996; Chiasson et al., 1999) qui donne naissance aux neurones du bulbe olfactif (BO) (Johansson et al., 1999) et 2) la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus dentelé de l'hippocampe (Bayer et al., 1982; Kuhn et al., 1996; Gould et al., 1998).



Différentes observations suggèrent que la neurogénèse endogène adulte participe à certains processus dans le SNC, mais dans de nombreux cas, ce phénomène semble insuffisant pour promouvoir une réparation complète et efficace.

## V.2. Isolement et prolifération des CSN in vitro

C'est la mise en évidence d'une forte immunoréactivité pour l'EGF (Epidermal Growth Factor) et de son récepteur dans certaines régions du cerveau adulte, qui a permis à Reynolds et à son équipe d'isoler une population de cellules spécifiques répondantes à l'EGF. Ils ont montré que des cellules isolées du striatum de souris adultes et cultivées in vitro en présence d'EGF continuaient à se diviser sous forme de clusters. Par la suite, ces derniers se détachaient pour constituer des sphères de cellules prolifératives qui ont alors été appelées des neurosphères (Reynolds and Weiss, 1992). La caractérisation de ces neurosphères a révélé qu'elles étaient immunoréactives pour la nestine, un filament intermédiaire exprimé par les CSN (Lendahl et al., 1990) et qu'une cellule isolée de ces sphères était capable de reconstituer à elle seule une sphère secondaire également nestine positive. A cette caractéristique d'autorenouvellement est venue s'ajouter la multipotence puisqu'après transfert sur une surface d'adhésion et éviction de l'EGF, des cellules migraient en-dehors de la sphère et adoptaient des phénotypes gliaux ou neuronaux. Des études similaires réalisées à partir de cellules isolées du striatum de souris embryonnaires (E14) indiquent que ces cellules murines, en présence d'EGF, peuvent proliférer sous forme de neurosphères jusqu'à 10 passages (Reynolds and Weiss, 1996). Toutefois, 80 à 90% des cellules constituant les neurosphères primaires, secondaires et même après 10 passages, sont capables de générer les différents types cellulaires du SNC, mais seul 20% des cellules s'avèrent capables de former de nouvelles neurosphères. Il semble donc que les neurosphères soient constituées d'une population cellulaire hétérogène dans laquelle 20% des cellules auraient la capacité de reformer des sphères alors que les autres cellules présenteraient une capacité de prolifération limitée (Fig. 31).



Par la suite, il a été montré que le FGF-2 possédait également des effets mitogéniques sur les CSN embryonnaires et adultes (Vescovi et al., 1993). En effet, les CSN issues du striatum de souris adultes sont capables de proliférer in vitro sous forme de neurosphères en présence de FGF-2 et de se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et neurones (Gritti et al., 1996). Par ailleurs, il a été observé que la présence des deux facteurs, EGF et FGF-2, avait un effet additif sur la prolifération des CSN puisque le FGF-2 stimule l'expression du récepteur à l'EGF dans une culture de cellules corticales d'embryons de rats (E12) (Lillien and Raphael, 2000).

### **V.3. Les cellules souches dans la MP**

#### **V.3.1. L'autotransplantation**

Il existe à l'heure actuelle peu de données concernant des essais précliniques d'autotransplantation sur des modèles animaux de la MP. Néanmoins, la transplantation autologue de CSN adultes a été réalisée sur un patient parkinsonien. Les CSN ont été isolées à partir d'une biopsie de tissus corticaux puis cultivées in vitro durant plusieurs mois en présence de facteurs épigéniques. Au final, 15% des neurones présentaient un phénotype dopaminergique. Après transplantation unilatérale, le patient a vu ses symptômes moteurs améliorés de 88% avec une augmentation de l'incorporation dopaminergique de plus de 55% un an après l'opération. Malgré des résultats encourageants, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'étudier les effets de telles greffes sur le long terme.

Des expériences ont pu montrer que la transfection de cellules souches mésenchymateuses, issues de la moelle osseuse adulte, avec le domaine intracellulaire du gène Notch favoriserait leur différenciation vers un phénotype neuronal et des traitements par du GDNF in vitro permettrait une apparition du phénotype dopaminergique (Dezawa et al., 2004). Ces cellules souches mésenchymateuses semblent donc offrir une source potentielle de cellules autologues transplantables. Néanmoins, la différenciation neuronale et plus particulièrement la différenciation en neurones dopaminergiques de ces cellules n'est pas suffisante à l'heure actuelle pour envisager de telles auto-transplantations dans le cas de la MP.

### **V.3.2. L'allotransplantation**

Malgré le potentiel régénérateur intéressant des CSN adultes, les CSN prélevées chez l'embryon constituent, à l'heure actuelle, les meilleures candidates pour la transplantation dans la MP (Snyder and Olanow, 2005). En effet, ces dernières sont douées d'une grande capacité de prolifération et de longévité *in vitro*. Dans une série d'études, Svendsen et ses collaborateurs ont transplanté des précurseurs neuronaux embryonnaires (PNE) humains dans le striatum de rats lésés avec de la 6-OHDA (Svendsen et al., 1996; Svendsen et al., 1997; Svendsen and Caldwell, 2000). Les résultats ont révélé une différenciation des PNE en neurones et en cellules gliales. Des neurones dopaminergiques fonctionnels ont également été mis en évidence et une amélioration motrice a été observée chez quelques animaux. Les PNE auraient donc la capacité de se différencier en neurones dopaminergiques *in vivo*. Néanmoins, il semblerait que cette différenciation soit largement influencée par l'environnement dans lequel ces derniers sont placés. En effet, la transplantation de PNE dans le bulbe olfactif, une des régions neurogéniques du cerveau adulte où les neurones dopaminergiques sont abondants, favorise une différenciation dopaminergique des cellules implantées (Suhonen et al., 1996; Fricker et al., 1999). Les PNE isolés du MV perdent rapidement leur capacité à se différencier spontanément en cellules dopaminergiques puisqu'un signal extrinsèque est nécessaire pour induire ce phénotype (Bouvier and Mytilineou, 1995; Hynes and Rosenthal, 2000; Jain et al., 2003) et le striatum adulte ne produit pas ce signal (Sinclair et al., 1999). C'est pourquoi, de nombreuses études visent désormais à induire une pré-différenciation des PNE avant leur transplantation. Studer et son équipe ont ainsi cultivé pendant 8 jours des PNE en présence de FGF-2 et ils ont observé une amélioration de la différenciation dopaminergique après l'implantation (Studer et al., 1998).

Outre les résultats très encourageants que les recherches sur l'efficacité des CSN en transplantation ont apportés, l'avancement des études demeure, ici encore, contrarié par les problèmes éthiques liés à l'utilisation des embryons humains. En effet, l'utilisation des cellules souches embryonnaires suscite des débats éthiques, notamment pour certains groupes, religieux ou non, qui considèrent l'extraction de ces cellules comme une atteinte à l'intégrité de l'embryon. Cependant, des études récentes réalisées par l'équipe du Pr Lanza, semblent montrer que l'extraction de cellules souches embryonnaires sans destruction de l'embryon ni perturbation de son développement serait possible (Chung et al., 2006; Klimanskaya et al., 2006). Cette nouvelle approche, si elle se confirme, permettrait effectivement de s'affranchir des problèmes éthiques, obstacles actuels majeurs pour la thérapie cellulaire via les cellules souches embryonnaires.

### **V.3.3. La xénotransplantation**

L'utilisation de CSN embryonnaires d'une autre espèce telle que le porc, permettrait de s'affranchir à la fois des problèmes éthiques liés à l'utilisation des embryons humains et de la réponse immunologique induite par l'individu hôte suite à la xéno greffe de tissus primaires. Différentes études suggèrent que ces cellules auraient une immunogénicité réduite (Armstrong et al., 2001). Par ailleurs, les CSN produisent des facteurs neurotrophiques tels que le NGF, le BDNF, le CNTF et le GDNF (Ourednik et al., 2002; Ryu et al., 2004; Richardson et al., 2005) qui pourraient être fort utiles pour favoriser leur survie et leur différenciation in vivo.

## **CONCLUSION V**

De part leur capacité de prolifération et leur multipotence, les CSN sont devenues un centre d'intérêt majeur pour les stratégies thérapeutiques restauratrices. Par ailleurs, la faible immunogénicité que leur prêtent certains auteurs, indique que ces cellules pourraient être plus facilement acceptées par les cellules de l'hôte en cas de xéno greffes intracérébrales. C'est pour cela que dans la troisième partie de ce manuscrit, nous avons étudié via une étude comparative, la réponse immune générée dans le cas d'une xéno greffe de neuroblastes ou de précurseurs neuronaux porcins.

*OBJECTIFS DU TRAVAIL DE*  
*THESE*

Des études cliniques ont montré que les troubles induits par les pertes neuronales survenant notamment chez des patients atteints de la MP pouvaient être atténués suite à la transplantation de neurones fœtaux (Lindvall et al., 1990; Freed et al., 1992; Freeman et al., 1995). Cependant, les contraintes liées à l'utilisation des neurones embryonnaires d'origine humaine, et plus particulièrement, les considérations éthiques liées à leur utilisation ont conduit à la recherche de sources cellulaires alternatives comme les neurones embryonnaires porcins. Ces derniers ont montré leur capacité à se développer et à émettre des extensions axonales lorsqu'ils sont transplantés tant chez le rat (Freeman et al., 1988; Wictorin et al., 1990; Wictorin et al., 1992; Deacon et al., 1994; Galpern et al., 1996; Isacson and Deacon, 1996) que chez des patients parkinsoniens (Pakzaban and Isacson, 1994; Deacon et al., 1997; Fink et al., 2000). Néanmoins, bien que le SNC présente un statut immunologique particulier, les xéno greffes sont rejetées en l'absence de traitement immunosuppresseur.

Ainsi, depuis plusieurs années, notre laboratoire a entrepris d'étudier et de contrôler les mécanismes responsables du rejet d'une xéno greffe intracérébrale. Pour ce faire, nous avons choisi comme modèle la xéno greffe de neuroblastes porcins dans le striatum de rat. La réponse immunitaire responsable du rejet de telles greffes survient dans les 5 à 7 semaines et implique une composante humorale (Larsson et al., 1999; Barker et al., 2000) et cellulaire (Wood et al., 1996; Okura et al., 1997; Larsson et al., 2001a; Remy et al., 2001; Melchior et al., 2002). Plus particulièrement, notre laboratoire ainsi que d'autres ont montré que la réaction de rejet s'accompagne d'une infiltration dans le greffon de cellules microgliales activées/macrophages et d'une apparition soudaine et massive de lymphocytes T (LT) (Wood et al., 1996; Okura et al., 1997; Larsson et al., 2001a; Remy et al., 2001; Melchior et al., 2002). Alors que de nombreuses études ont révélé le rôle critique des LT dans le rejet des xéno greffes via l'utilisation d'inhibiteurs de la fonction lymphocytaire, la vocation des cellules microgliales/macrophages dans le processus de rejet reste confuse. C'est la raison pour laquelle, dans un premier travail, nous avons voulu préciser le rôle de ces cellules présente de façon récurrente dans notre modèle d'étude. A cet effet, nous avons étudié les conséquences d'un traitement anti-inflammatoire, couramment utilisé en clinique et capable de franchir la BHE, sur la survie des xéno greffes intracérébrales.

Les cellules microgliales activées/macrophages exprimant les molécules du CMH de classe II, sont susceptibles de jouer un rôle dans la présentation des antigènes des cellules du donneur aux LT de l'hôte. Toutefois, même si ces cellules sont effectivement capables d'induire une réponse immune secondaire en activant des LT déjà primés, elles sont

incompétentes pour initier une réponse primaire en primant des lymphocytes naïfs dans des tissus lymphoïdes. Pourtant, une étude réalisée dans notre laboratoire a récemment mis en évidence des modifications du répertoire des LT dans les ganglions cervicaux profonds suite à une greffe de neuroblastes porcins dans le striatum de rat (Melchior et al., 2005). De telles modifications sont normalement dues à la mise en place d'une réponse immune spécifique dirigée contre certains antigènes. Elles sont donc caractéristiques d'une activation de LT naïfs.

La seconde partie de mon travail de thèse avait donc pour objectif de rechercher les cellules susceptibles d'initier une telle réponse en cas de xéno greffe intracérébrale.

Un autre point soulevé par les résultats de notre équipe concerne le phénotype des cellules greffées et le type de rejet observé. En effet, des cellules endothéliales issues d'aorte de porc sont rejetées dès la première semaine après leur greffe dans un striatum de rat, et ce, sans l'intervention de LT (Rémy, et al., 2001). La réaction est donc fort différente de la réponse observée après la greffe de neuroblastes porcins qui intervient après plusieurs semaines selon un mécanisme dépendant des LT. Il est donc parfaitement envisageable que l'utilisation d'une source cellulaire encore moins immunogène que les neuroblastes permette de prolonger la survie d'une xéno greffe dans le cerveau. Certains travaux suggèrent que les cellules souches ou les précurseurs neuraux seraient moins immunogènes que les neuroblastes (Armstrong et al., 2001; Harrower et al., 2006).

La troisième partie de mon travail a consisté à étudier et à comparer les réponses immunes développées suite à la greffe de neuroblastes ou de précurseurs neuraux porcins dans le striatum de rats non lésés et non immunosupprimés.

*TRAVAIL DE THESE :*

*Première partie*

La xénotransplantation intracérébrale, malgré les nombreux avantages thérapeutiques qu'elle peut représenter, fait l'objet d'une réponse immunitaire développée par le SNC hôte qui conduit au rejet des cellules transplantées. Cette riposte immunologique est principalement médiée par l'apparition soudaine dans le striatum greffé de cellules microgliales/macrophages et de LT dans les semaines qui suivent la transplantation. L'administration de drogues immunosuppressives agissant sur les LT permet une amélioration considérable des taux de survie des greffons. C'est notamment le cas de la ciclosporine A qui empêche les cellules T de produire des cytokines indispensables à leur prolifération (Brundin et al., 1989; Pedersen et al., 1995; Wennberg et al., 2001). Mais c'est également vrai lors de l'inactivation du TCR, du récepteur à l'IL-2, du co-récepteur CD4 et des molécules de costimulation via l'utilisation d'anticorps spécifiques (Wood et al., 1996; Okura et al., 1997; Honey and Shen, 1999; Larsson et al., 2002; Larsson et al., 2003). En revanche, le rôle des cellules microgliales/macrophages dans le processus de rejet demeure plus ambigu. Afin de comprendre la responsabilité de ce phénomène dans la réponse immune nous avons entrepris d'étudier quelles pouvaient être les conséquences d'une inhibition de l'inflammation via l'utilisation de la minocycline.

La minocycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines et connu depuis trente ans pour son application dans le traitement de l'acné juvénile. En plus de son action antimicrobienne, la minocycline a été récemment décrite pour ses propriétés anti-inflammatoires (Yrjanheikki et al., 1998; Tikka et al., 2001; Kim et al., 2004). De plus, cette petite molécule de 495 kDa, très lipophile, peut aisément passer la BHE. Les conséquences d'un traitement minocycline sur des xéno greffes de neurones embryonnaires porcins dans le striatum de rat fait donc l'objet de cette première partie.

## PREMIERE PUBLICATION

*“Minocycline delays the rejection of xenogeneic neurons following their grafting into the rat brain”*

*Delphine Michel, Véronique Nerrière-Daguin, Philippe Brachet, Isabelle Neveu and Philippe Naveilhan.*

*(En préparation)*

**Minocycline delays the rejection of xenogeneic neurons following  
their grafting into the rat brain**

Delphine Michel, Véronique Nerrière-Daguin, Philippe Brachet, Isabelle Neveu and Philippe Naveilhan.

INSERM U643, Nantes, France.

ITERT, Nantes, France.

University of Nantes, UFR of Medicine, Nantes, France.

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

## ***Abstract***

Intracerebral xenotransplantation of porcine fetal neurons (pNBs) is an interesting alternative to the use of human neurons for the treatment of neurodegenerative diseases. However, this restorative approach is limited by the requirement of high doses of immunosuppressors such as cyclosporine A that have harmful secondary effects, and often, grafted cells are finally rejected. So, alternative treatments that replace or allow a reduction in the doses of classic immunosuppressors have to be found. To this regard, minocycline appears as a promising drug. Indeed, this second-generation tetracycline derivative crosses the blood-brain barrier and has good safety records. In addition, this molecule exhibits strong anti-inflammatory properties and inhibit microglial activation in the CNS. These properties are all the more interesting since microglial activation is clearly observed in case of intracerebral xenotransplantation and since most treatments are directed against T cells. To study the effects of minocycline on xenograft survival, porcine fetal neurons were grafted in untreated and in minocycline-treated rats. Graft survival was evaluated at 3, 8, 28, 42 and 63 days post-surgery. Interestingly, porcine NF70<sup>+</sup> grafts were observed in 40% of the treated-rats at day 63 whereas at this stage, all the grafts were rejected in untreated animals. Further analyses using ED1 antibody indicate that minocycline does not prevent the chronic activation of microglial cells currently observed at early time points following intracerebral xenografting. However, the number of ED1<sup>+</sup> cells was significantly lower at day 42 and 63 in untreated rats as compared to control group. We also observed a lower number of R7.3<sup>+</sup> cells in the striatum of treated rats as compared to treated one. Taken together, these results suggest that minocycline delays the rejection of porcine fetal neurons grafted into rat striatum by inhibiting microglia activation and T cell infiltration.

***Keywords:*** Xenotransplantation, Microglial activation, Minocycline, T cells, Immune Response

## ***Introduction***

Transplantation of human foetal neurons is an attractive restorative approach for the treatment of focal central nervous system disorders such as Parkinson's disease (Lindvall et al., 1990; Bjorklund et al., 2003). Indeed, in 1990, Lindvall and al, observed restoration of dopamine synthesis and functional improvements following the transplantation of mesencephalic allogeneic neurons into the putamen of patients affected by Parkinson's disease (Lindvall et al., 1990; Bjorklund et al., 2003). Such an observation is encouraging, however, the limited availability of human fetuses and the ethical problems concerning their use indicate a need for alternative source of donor cells. To this regard, foetal neurons isolated from animals' species such as pig offer several advantages, including availability in large quantities and ability to extend long neurites like human neurons. Studies performed on immunosuppressed animals confirmed the restorative potentials of porcine foetal neurons. Indeed, porcine ventral mesencephalic neural cells derived from 21 or 28-days-old embryos and transplanted into the striatum of immunosuppressed rat models of Parkinson's disease differentiate, exhibit dopaminergic phenotype and promote behavioural improvements (Huffaker et al., 1989; Isacson et al., 1995; Galpern et al., 1996; Isacson and Deacon, 1996).

One of the major problems concerning the use of xenogeneic neurons is the requirement of immunosuppressive treatment to prevent cell rejection even though the brain displays a special immune status, which is largely ascribed to the blood-brain barrier, to a scarce expression of major histocompatibility antigens (MHC) and to anti-inflammatory potential. In absence of immunosuppressive treatment, rejection occurs several weeks after the implantation of xenogeneic neurons and a large body of evidence points towards a cumulative involvement of both humoral factors (Larsson et al., 1999; Barker et al., 2000) and cell-mediated mechanisms, with a prominent role for T lymphocytes (Wood et al., 1996; Okura et al., 1997; Larsson et al., 2001; Remy et al., 2001; Melchior et al., 2002; Melchior et

al., 2005). Indeed, T cells strongly infiltrate the graft at the time of rejection and immunosuppressive treatment that inhibit critical functions of T lymphocytes do prolong graft survival. These immunosuppressive treatments included the use of cyclosporine A (Brundin et al., 1989; Duan et al., 1995; Galpern et al., 1996), as well as the employment of antibodies directed against the TCR, the IL-2 receptor, the CD4 co-receptor and the costimulatory molecules (Wood et al., 1996; Okura et al., 1997; Honey and Shen, 1999; Larsson et al., 2002; Larsson et al., 2003). The rejection process is also accompanied by a massive infiltration of the graft by activated microglial cells/macrophages. Surprisingly, little is known about the impact of these cells on the rejection process. However, the presence of these cells around the transplant may contribute to the rejection of the graft. In particular due to the secretion of molecules such as TNF $\alpha$  that facilitates monocytes and lymphocytes recruitment through the blood-brain barrier (Pober et al., 1986; Brett et al., 1989) (Calvo et al., 1996) or of IL-12 which stimulate T cell proliferation (Aloisi et al., 2000). So, in an attempt to decipher the role of activated microglial cells in the rejection of xenogeneic neurons, we searched for anti-inflammatory drugs that inhibit microglial activation. In this purpose, the minocycline appeared as an interesting drug. Indeed, this tetracycline antibiotic that cross the blood-brain barrier has recently been described as a potent inhibitor of microglial activation in vitro and in vivo (Yrjanheikki et al., 1998; Tikka et al., 2001; Tikka and Koistinaho, 2001; Kim et al., 2004). The results revealed that treatment of the rats with minocycline extend the survival of foetal porcine neurons transplanted into the striatum. We also showed that the sustained survival was correlated to a lower number of activated microglial cells and T cell infiltrating the graft.

## ***Materials and methods***

### ***Cell preparation***

Porcine foetuses were obtained from domestic Large White pigs 28 days after artificial insemination. Animals were obtained from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Nouzilly, France) and sacrificed in the institute's accredited slaughterhouse. Foetuses were collected in Hank's balanced salt solution (HBSS; GibcoBRL) after hysterectomy. Ventral mesencephalons (VM) were collected and conserved into a hibernation medium at 4°C for up to 3 days. Just before cell grafting, porcine neuroblasts (pNBs) were prepared as previously described (Remy et al., 2001) and the cell suspension was adjusted to a concentration of approximately  $2 \times 10^5$  cells/ $\mu$ l.

### ***Surgical procedure***

Male LEW.1A rats weighting around 250 g purchased from Janvier CERJ (Rouen, France) were anesthetized with an 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, USA) and a small cross-section of bone overlapping the appropriate coordinates was removed. Two sites 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 and -5.8 mm; incisor bar, -3.3 mm. Each site received 1  $\mu$ l of cell suspension delivered with a Hamilton syringe mounted on an automated microinjector (Phymed, Paris, France). After a delay of 4 min, the syringe was gently withdrawn, the pieces of cranial bone were replaced on the skull and the skin incisions were sewed.

### ***Minocycline treatment***

Minocycline (Zacnan, Merck) is dissolved in water and orally dispensed to the rats as follow. Two days before and after cell grafting, the animals receive a dose of 50 mg/kg of minocycline dispensed twice a day and then, administered once a day for the next 8 days. Subsequently, the treatment was reduced down to 25 mg/kg and was administrated once a day until the date of sacrifice (Ekdahl et al., 2003).

### ***Immunohistochemistry***

At days 3, 8, 28, 42 and 63 post-surgery (here after referred as D3, D8, D28, D42 and D63), 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 pre-wash (0.9% NaCl), followed by 200 ml of cold 4% paraformaldehyde (PFA). The brains were then removed from the skull and cryoprotected in 15% sucrose for 24h followed by a bathing in 30% sucrose. Brains were then frozen in cold isopentane and stored at -80°C. Sections of 20 µm were performed using a cryostat (Leica) and the slides were stored at -80°C.

After neutralization of the endogenous peroxidase with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 for one night at 4°C. A specific antibody directed against a specific 70 kDa porcine neurofilament (NF70, clone DP5; diluted 1:500; Université Paris 7, France) was used to reveal grafted neurons. Characterisation of dopaminergic phenotype was performed using an anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (1:250; Pel Freeze, Rogers, Ark, USA). Immune cells were identified using monoclonal antibodies (mAbs) obtained from the European Collection of Cell Culture (ECCC, Salisbury, UK). ED1 and Ox42 were used to characterize macrophages/activated microglia. R7.3 directed against the TCRαβ chain was

used to detect T lymphocytes. After washing, slides were incubated for 1h 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-peroxydase complex for 1 h and revealed with the Vector very intense purple substrate (VIP, Vector ABC kit). After several washes in distilled water, slides were dehydrated and mounted using Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France). Brains sections were observed using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss).

### *Semi-quantitative histological scale*

ED1 and R7.3 immunostaining was evaluated using a semi-quantitative scale described and modified from Armstrong and al. (2001). Briefly, histological criteria were divided as followed: **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 a perivascular distribution; **4**, intense immunostaining inside the graft and in a large part of the grafted striatum; **5**, only a scar remained with occasional immunopositive cells.

## **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= 40) or not (n=37) with minocycline and grafted with porcine neuroblasts (pNBs) isolated from G28 foetus as described in the Materials and Methods. Rats were then sacrificed at different time-points from day 3 up 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 percentage of rat displaying NF70 positive graft was reported in the figure 1a. Porcine NF70-expressing cells were detected in the striatum of all the rats at D8 and D28 post-grafting. At D42, the number of rats exhibiting a NF70<sup>+</sup> graft decrease in both untreated and treated rats but the biggest difference between the two groups was observed at D63. Indeed, at this stage, all the untreated rats had rejected their transplant (Fig. 1d), whereas 40% of the animals treated with minocycline exhibited a graft with porcine NF70<sup>+</sup> neurons (Fig. 1b, e). These difference in the survival of porcine NF70<sup>+</sup> cells between minocycline-treated and non-treated rats at D63 were statistically significant ( $P < 0,05$ ).

To control if the minocycline treatment interferes with dopaminergic differentiation, immunohistochemistry was performed using anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibodies. TH<sup>+</sup> cells were detected in the grafted striatum of both minocycline-treated and non-treated rats from D8. At all stages examined, we did not observe any particular differences between the two groups, in the number of positive cells or the intensity of TH staining as long as the graft contains NF70<sup>+</sup> cells (data not shown). Interestingly, at D63 TH<sup>+</sup> cells were still detected within the graft of minocycline-treated rats that had not rejected their transplant (Fig. 1c, f).

### *Minocycline treatment reduces microglial activation*

The impact of minocycline treatment on the activation of microglial cells following intracerebral xenografting was studied using ED1 and Ox42 antibodies. Cells immunopositive for these antibodies were detected in the grafted striatum in both minocycline non-treated rats (Fig 2a, b) and treated rats (Fig. 2c, d) at D28. In both groups, Ox42<sup>+</sup> (Fig 2a and c) and ED1<sup>+</sup> (Fig 2b and d) cells were mostly localised around and within the graft. The morphology of Ox42<sup>+</sup> and ED1<sup>+</sup> cells was very different (Fig 2, insert): Ox42<sup>+</sup> cells were more ramified while ED1<sup>+</sup> cells exhibit an amoeboid shape. At this stage, we did not observe major difference in microglial activation between the minocycline-treated and non-treated rats. However, at later stages such as D42 and D63, ED1 staining was much stronger in untreated rats as compared to treated one. As shown in the figure 3, ED1 immunostaining in treated animals that did not reject their graft was not very different at D42 and D63 (Fig. 3b and 3d) as compared to ED1 labelling at D28 (Fig. 2d). In contrast, in untreated animals, a strong ED1 immunostaining is observed all over the graft at D42 (Fig 3a) while at D63, the labelling is mainly observed along the scar (Fig. 3c). To get an estimation of these changes, ED1 immunostaining was evaluated using the semi-quantitative scale described by Armstrong and al., (2001). The results were reported on a graph presented in the figure 3e. They clearly show significant differences in ED1 staining at D42 and D63 ( $P < 0,05$ ) between the minocycline-treated rats and non-treated rats while ED1 staining was similar at earlier stages.

### *Minocycline treatment reduces T cells infiltration*

Since T cell infiltration is a major process in the rejection of neuronal xenograft, we evaluate the impact of minocycline on the recruitment of these cells using R7.3 mAb. As shown in the figure 4, R7.3<sup>+</sup> cells were hardly found inside or around the graft at D28, in untreated or minocycline-treated rats (Fig. 4a and 4d). It is of note that, by this time, no sign of rejection was detected in any of the grafted rats (Tab 1). In contrast, at D42, a strong and

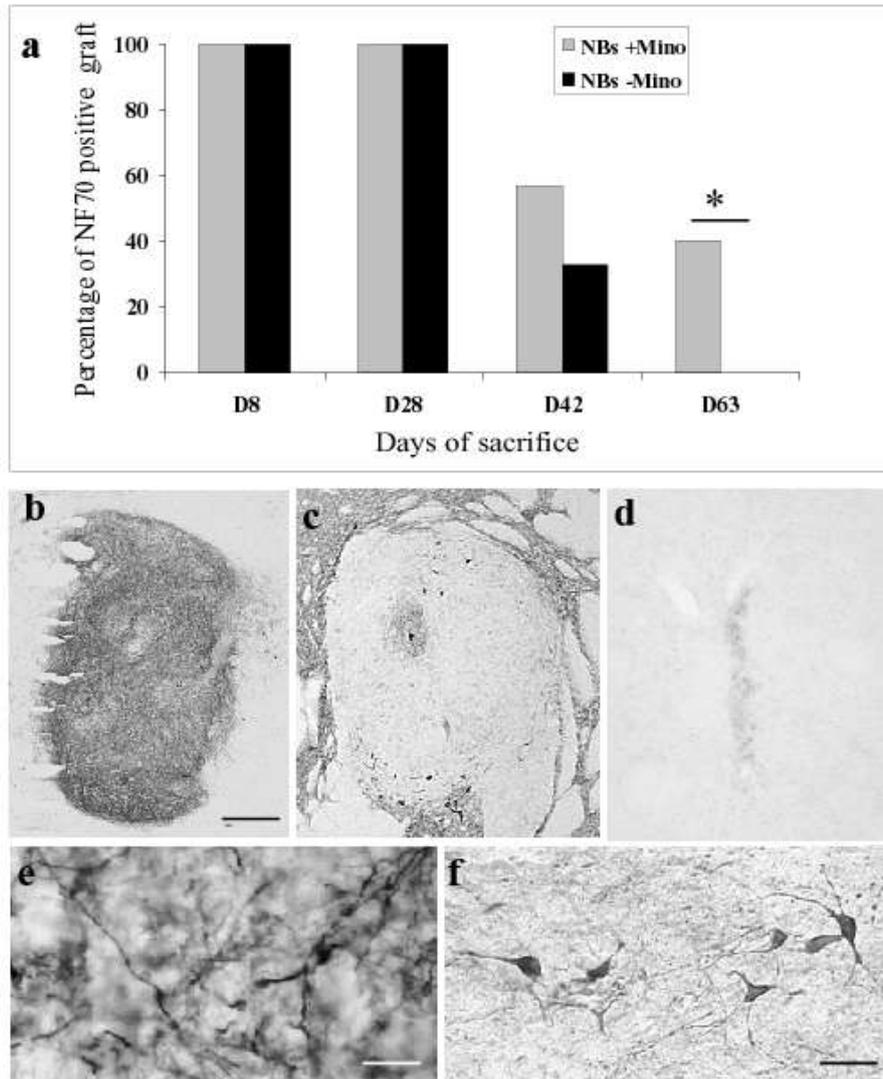
large immunostaining for R7.3 was observed but only in untreated animals. Indeed, while the graft was fully invaded by R7.3<sup>+</sup> cells in untreated rats (Fig.4b), we did not detect any R7.3<sup>+</sup> cells inside or around the graft in most rats treated with minocycline (Fig.4e). At D63, all the untreated rats had rejected their graft and rare R7.3<sup>+</sup> cells were detected around the scar (Fig.4c). Interestingly, in minocycline-treated animals that had not rejected their graft, we did not detect any R7.3<sup>+</sup> staining (Fig. 4f) except in one case where sparse R7.3<sup>+</sup> cells were detected. To get an estimation of these changes and these differences, R7.3 immunostaining was evaluated using the semi-quantitative scale mentioned above. The results were reported on a graph presented in the figure 4g. They clearly show significant differences in R7.3 staining at D42 and D63 ( $P < 0,05$ ) between the minocycline-treated rats and non-treated rats while R7.3 staining was similar at D28.

## *Discussion*

In the present study, we show that oral chronic treatment of rats with minocycline significantly enhances the survival of porcine mesencephalic neurons transplanted into the rat striatum without altering the apparition of neurons exhibiting a dopaminergic phenotype. Immunohistochemistry was performed to determine by which cellular and molecular processes, the minocycline delays the rejection of intracerebral xenograft. As several works reported an inhibitory effect of minocycline on microglia activation in vitro (Suk, 2004) and in vivo (Lin et al., 2001), we first analysed its impact on markers of microglial activation following neuronal xenografting in the brain. The results indicate that the drug did not inhibit the chronic activation of microglial cells as shown by the presence of Ox42<sup>+</sup> and ED1<sup>+</sup> cells in the graft at different time-points post-grafting. Nevertheless, there was differences in the immune response between the two groups as in minocycline-treated rats, we did not observe the strong invasion of the graft by ED1<sup>+</sup> cells and the settlement of the grafted striatum by Ox42<sup>+</sup> cells occurring in untreated rats while the graft is undergoing rejection. In presence of minocycline, the chronic activation of microglial cells/macrophages seems to have difficulties to proceed further at least up to 6 or 7 weeks post-grafting. This blockage in the establishment of a full microglial activation process may due to a direct effect of minocycline on microglial cells/macrophages but also to the low number of T cells in the grafted striatum. Indeed, the number of R7.3<sup>+</sup> cells inside or around the graft was extremely low in minocycline-treated animals as compared to untreated rats. This might due to an inhibition of T cell infiltration as minocycline was reported to inhibit enzymatic activity and the production of matrix metalloproteinases (MMPs) by leucocytes (Brundula et al., 2002; Power et al., 2003), which enzymes are essential for the transmigration of these cells through the blood-brain barrier (Yong et al., 2001). In addition to its effect on cell transmigration, minocycline may affect the leucocytes by inhibiting their proliferation and the synthesis of several cytokines such as

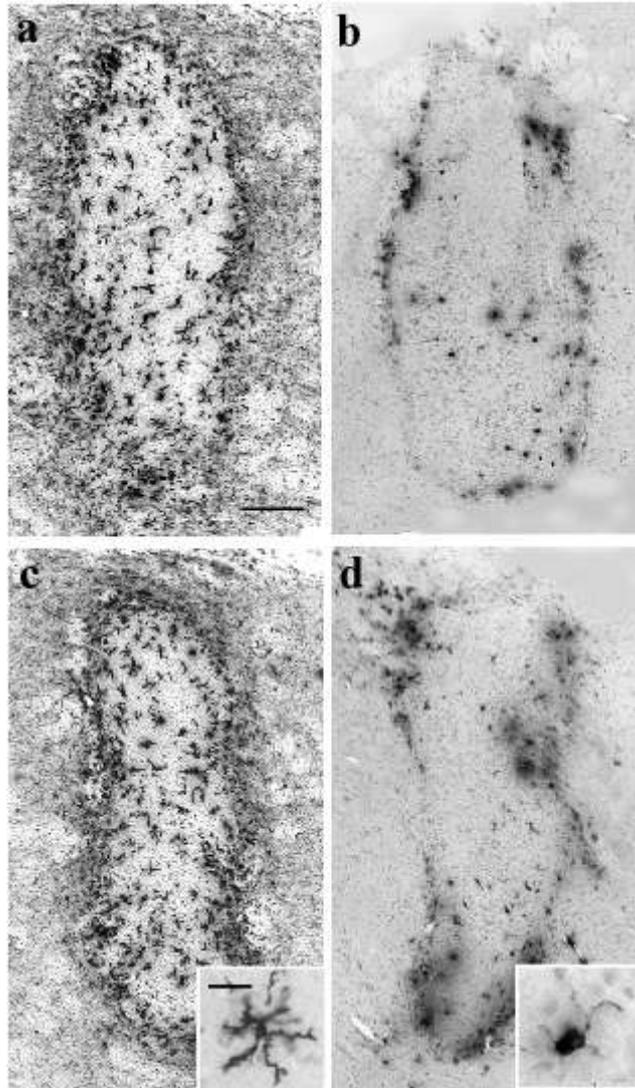
IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , and IL-2 (Kloppenburger et al., 1995; Kloppenburger et al., 1996). Inhibition of microglial and T cells activation might both contribute to the weak immune response observed in minocycline-treated rats as compared to untreated animals. However, the chronic administration of minocycline at the tested doses did not prevent completely the rejection of intracerebral xenograft since NF70<sup>+</sup> neurons have disappeared in 60% of the rats at D63. The dose that we tested was reported to be efficient to inhibit microglial activation in vivo in case of lipopolysaccharide-induced inflammation (Ekdahl et al., 2003) or in models of Parkinson's disease (Wu et al., 2002). This does not mean that the tested protocol for minocycline administration is optimal and it would be interesting to perform a dose-response study. An increase in the posology is possible since this tetracycline derivative has a good safety record.

In addition, it is necessary to test long-term administration of minocycline to see if minocycline prevents completely and not only delay cell rejection of some intracerebral xenografts. Finally, it would be interesting to test the efficiency of minocycline treatment with other immunosuppressive drugs. The combined administration of the drug with the cyclosporine A might be very informative as this immunosuppressive molecule delays by blocking T cell activation but does not prevent the rejection of intracerebral xenograft (Larsson et al., 2000). Co-treatment by the two drugs might increase the survival of xenogeneic neurons or might serve to decrease the dose of cyclosporine A. This last point is of great interest since this immunosuppressive molecule does not pass the blood brain-barrier and the high doses required to inhibit cell rejection in the brain lead to severe secondary effects, including renal failure (Rezzani, 2006). So, our present data indicates that minocycline is of great interest in restorative strategies based on cell transplantation. Even though the drug by itself does not inhibit totally the rejection of xenogeneic neurons, its co-administration with other molecules might improve immunosuppressive strategies.



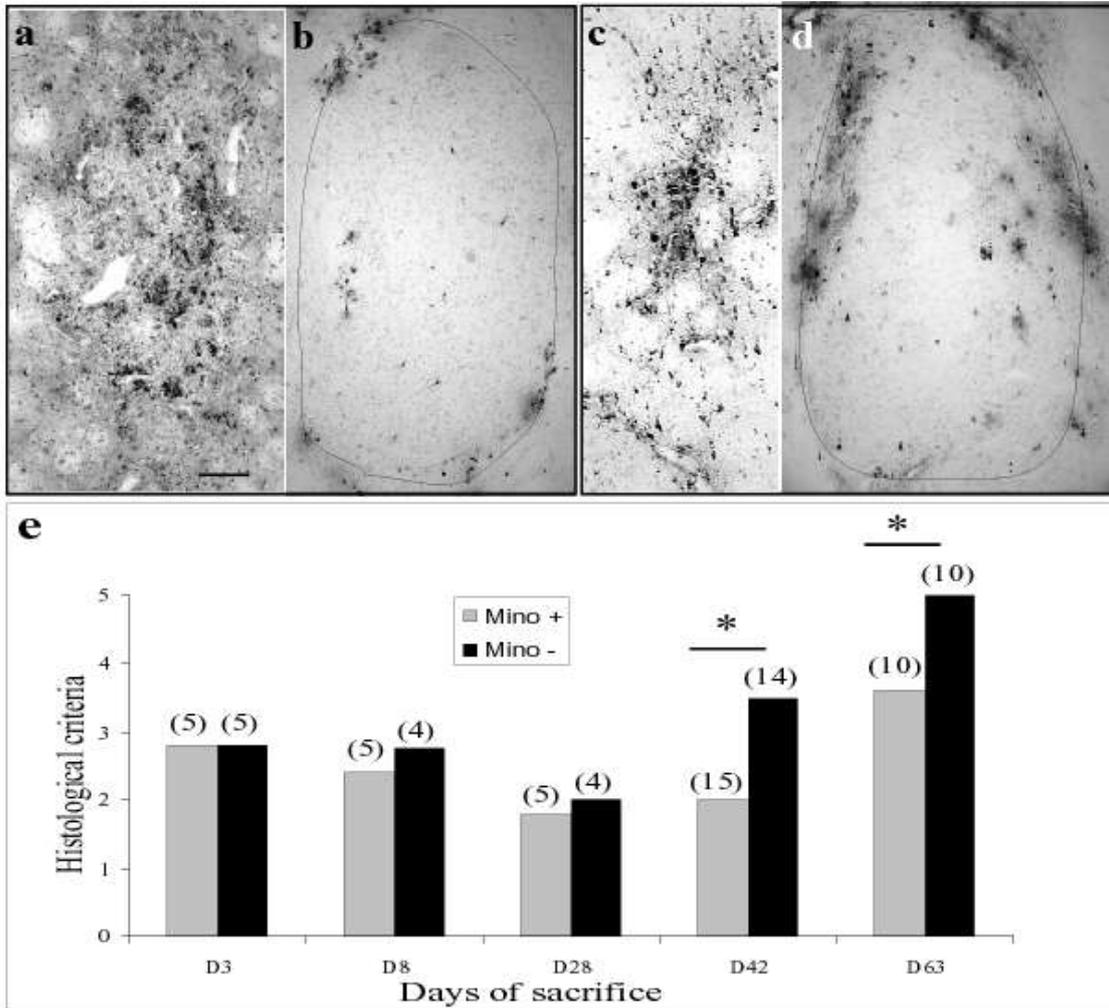
**Fig. 1: Study of minocycline effect on the survival and the phenotype of porcine neurons grafted into rat striatum.**

(a) Percentage of rat displaying a wide NF70 positive graft at the different time points post-transplantation. Immunostaining for NF70 (b, e) and for TH (c, f) in minocycline-treated animals at D63. Micrographs of the whole grafts are presented (b, c) as well as high magnification pictures (e, f). Immunostaining for NF70 (d) in untreated rats at D63 which at this stage exhibited only a residual scar. Scale bar (b-d) 400  $\mu$ m; (e) 60  $\mu$ m; (f) 80  $\mu$ m.



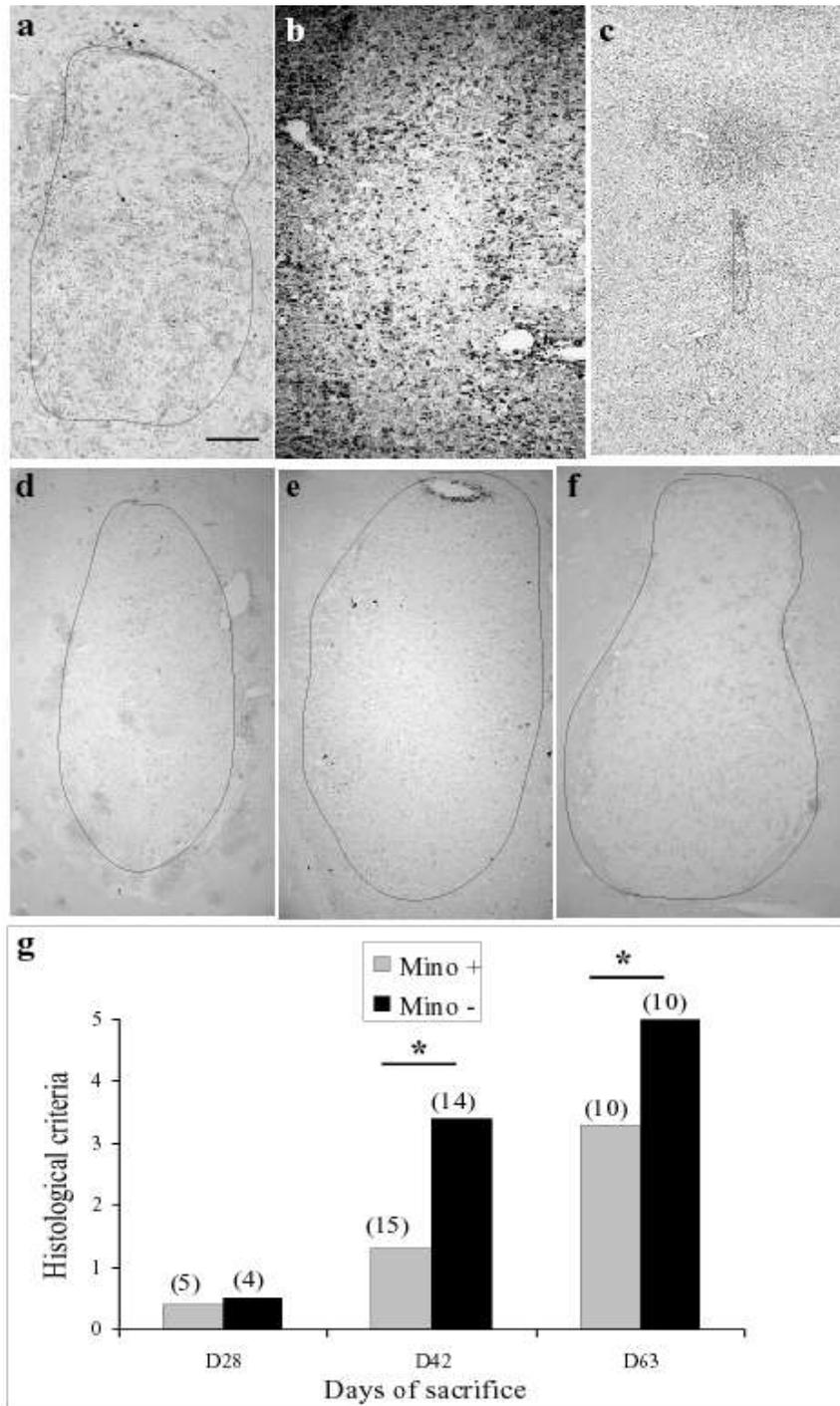
**Fig. 2: Immunostaining for Ox42 and ED1 at D28.**

*Immunostaining for Ox42 (a, c) and ED1 (b, d) in untreated (a and b) and treated (c and d) animals at D28. Scale bar 200  $\mu\text{m}$ ; insert 20  $\mu\text{m}$ .*



**Fig. 3: ED1 immunostaining in treated and untreated rats.**

ED1 immunostaining at D42 (**a** and **b**) and D63 (**c** and **d**) in untreated (**a**, **c**) and treated animals (**b**, **d**). Scale bar (**a-d**) 200  $\mu$ m. (**e**) ED1 immunostaining was evaluated with a semi quantitative scale based on histological criteria (Arsmtrong and al., 2001) at each time points of the experiment. The number of rats for each group were reported into bracket.



**Fig.4: R7.3 immunostaining in treated and untreated rats.** R7.3 immunostaining at D28 (**a** and **d**), D42 (**b** and **e**) and D63 (**c** and **f**) in untreated (**a-c**) and treated (**d-f**) animals. Scale bar (**a-f**) 200  $\mu$ m. (**g**) R7.3 immunostaining was evaluated with a semi quantitative scale based on histological criteria (Arsmtrong and al., 2001) at each time points of the experiment. The number of rats for each group were reported into bracket.

	J8		J28		J42		63	
	Mino -	Mino +						
Number of rats	4	5	4	5	15	14	10	10
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>-</sup>	1	3	2	4	0	8	0	3
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>+/-</sup>	3	2	2	1	1	0	0	1
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>+</sup>	0	0	0	0	4	1	0	0
NF70 <sup>-</sup> /R7.3 <sup>+</sup>	0	0	0	0	5	4	0	0
Scar	0	0	0	0	5	1	10	6

**Table 1: Evaluation of the rejection status using R7.3 and NF70 staining**  
R7.3<sup>+/-</sup> represents brain with 1-10 T cells per section.

- Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147.
- Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB (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.
- Bjorklund A, Dunnett SB, Brundin P, Stoessl AJ, Freed CR, Breeze RE, Levivier M, Peschanski M, Studer L, Barker R (2003) Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2:437-445.
- Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D (1989) Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 169:1977-1991.
- Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Bjorklund A (1989) Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res* 75:195-207.
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW (2002) Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125:1297-1308.
- Calvo CF, Yoshimura T, Gelman M, Mallat M (1996) Production of monocyte chemotactic protein-1 by rat brain macrophages. *Eur J Neurosci* 8:1725-1734.
- Duan WM, Widner H, 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.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- 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.
- Honey CR, Shen H (1999) Immunosuppression for neural xenografts: a comparison of cyclosporin and anti-CD25 monoclonal antibody. *J Neurosurg* 91:109-113.
- 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.
- Isacson O, Deacon TW (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 TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH (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.
- Kim SS, Kong PJ, Kim BS, Sheen DH, Nam SY, Chun W (2004) Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. *Arch Pharm Res* 27:314-318.
- Kloppenburg M, Verweij CL, Miltenburg AM, Verhoeven AJ, Daha MR, Dijkmans BA, Breedveld FC (1995) The influence of tetracyclines on T cell activation. *Clin Exp Immunol* 102:635-641.
- Kloppenburg M, Brinkman BM, de Rooij-Dijk HH, Miltenburg AM, Daha MR, Breedveld FC, Dijkmans BA, Verweij C (1996) The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 40:934-940.
- Larsson LC, Czech KA, Widner H, Korsgren O (1999) Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. *Transplantation* 68:1153-1160.

- Larsson LC, Czech KA, Brundin P, Widner H (2000) Intrastratial ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. *Cell Transplant* 9:261-272.
- Larsson LC, Corbascio M, Widner H, Pearson TC, Larsen CP, Ekberg H (2002) Simultaneous inhibition of B7 and LFA-1 signaling prevents rejection of discordant neural xenografts in mice lacking CD40L. *Xenotransplantation* 9:68-76.
- Larsson LC, Corbascio M, Pearson TC, Larsen CP, Ekberg H, Widner H (2003) Induction of operational tolerance to discordant dopaminergic porcine xenografts. *Transplantation* 75:1448-1454.
- Larsson LC, Frielingsdorf H, Mirza B, Hansson SJ, Anderson P, Czech KA, Strandberg M, Widner H (2001) Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp Neurol* 172:100-114.
- Lin S, Zhang Y, Dodel R, Farlow MR, Paul SM, Du Y (2001) Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 315:61-64.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247:574-577.
- Melchior B, Remy S, Nerrière-Daguin V, Heslan JM, Soullillou 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.
- Melchior B, Nerrière-Daguin V, Degauque N, Brouard S, Guillet M, Soullillou JP, Brachet P (2005) Compartmentalization of TCR repertoire alteration during rejection of an intrabrain xenograft. *Exp Neurol* 192:373-383.
- Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Tanuma N, Matsumoto Y (1997) Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation: tolerance induction by anti-T-cell antibodies. *J Neurosci Res* 48:385-396.
- Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA (1986) Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137:1893-1896.
- Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J (2003) Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol* 53:731-742.
- Remy S, Canova C, Daguin-Nerrière V, Martin C, Melchior B, Neveu I, Charreau B, Soullillou JP, 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.
- Suk K (2004) Minocycline suppresses hypoxic activation of rodent microglia in culture. *Neurosci Lett* 366:167-171.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J (2001) Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 21:2580-2588.
- Tikka TM, Koistinaho JE (2001) Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166:7527-7533.
- Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, Charlton HM (1996) Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience* 70:775-789.

- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22:1763-1771.
- Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2:502-511.
- Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15769-15774.

A travers cette étude, nous avons pu montrer l'efficacité du traitement minocycline sur la survie des xéno greffes de neurones embryonnaires porcins dans le striatum de rat. En effet, nous avons montré que 63 jours après la transplantation, 40% des rats ayant reçu un traitement minocycline présentaient encore une greffe qui semblait en bonne santé dans laquelle des cellules TH<sup>+</sup> ont été observées.

### **Minocycline et inflammation précoce**

Il a déjà été postulé que les cellules microgliales activées/macrophages observés dans le striatum dans les quelques jours après la transplantation et dont la présence est probablement imputable au traumatisme chirurgical, pourraient jouer un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire via la présentation antigénique aux cellules T (Hickey and Kimura, 1988; Poltorak and Freed, 1989; Shinoda et al., 1996a; Shinoda et al., 1996b). Cependant, dans notre étude, l'administration d'un antibiotique aux propriétés anti-inflammatoires ne semble pas influencer la réponse induite par le geste chirurgical. Ainsi, malgré l'administration orale d'un traitement préventif (débutant 2 jours avant l'opération) et relativement important (50 mg/kg 2 fois/jour) dans les premiers jours de l'expérimentation, la réponse inflammatoire précoce demeure chez tous les rats greffés. Cette observation ouvre plusieurs possibilités ; d'une part, la minocycline n'est peut-être pas suffisante pour pallier l'inflammation due au traumatisme chirurgical ou elle n'est pas administrée suffisamment précocement avant la greffe. En effet, des études récentes ont révélé qu'une administration intraveineuse était la plus appropriée pour une disponibilité rapide et efficace de l'antibiotique (Szymanska et al., 2006). D'autre part, au vu de ces résultats on peut supposer que dans les premiers jours qui suivent la transplantation, l'activation microgliale demeure limitée mais que ce sont principalement les macrophages périvasculaires qui envahissent le striatum suite à la rupture de la BHE occasionnée par le geste chirurgical.

### **Minocycline et activation microgliale**

Quarante-deux jours après la greffe est la période critique à laquelle le processus de rejet se met en place chez les rats contrôles. Ce qui se traduit par une élévation de l'activation microgliale et une infiltration lymphocytaire. En revanche, chez les rats ayant reçu de la minocycline le phénomène de rejet est atténué. En effet, à partir de cette période, l'activation microgliale chez les rats traités est significativement moins importante et les cellules ED1<sup>+</sup> restent localisées sur la périphérie de la greffe. Cette tendance se confirme également à J63 dans les greffes non rejetantes. Il a été montré que la minocycline pouvait inhiber la

prolifération et l'activation des cellules microgliales in vitro (Tikka et al., 2001; Kim et al., 2004). Ainsi, elle empêcherait d'une part l'effet cytotoxique en réduisant l'expression de molécules telles que les radicaux libres (Chen et al., 2000) ou certaines cytokines (Kremlev et al., 2004; Lee et al., 2004; Amin et al., 1996). D'autre part, en inhibant l'activation microgliale, la minocycline pourrait également supprimer la fonction phagocytaire et ainsi favoriser la survie des cellules transplantées.

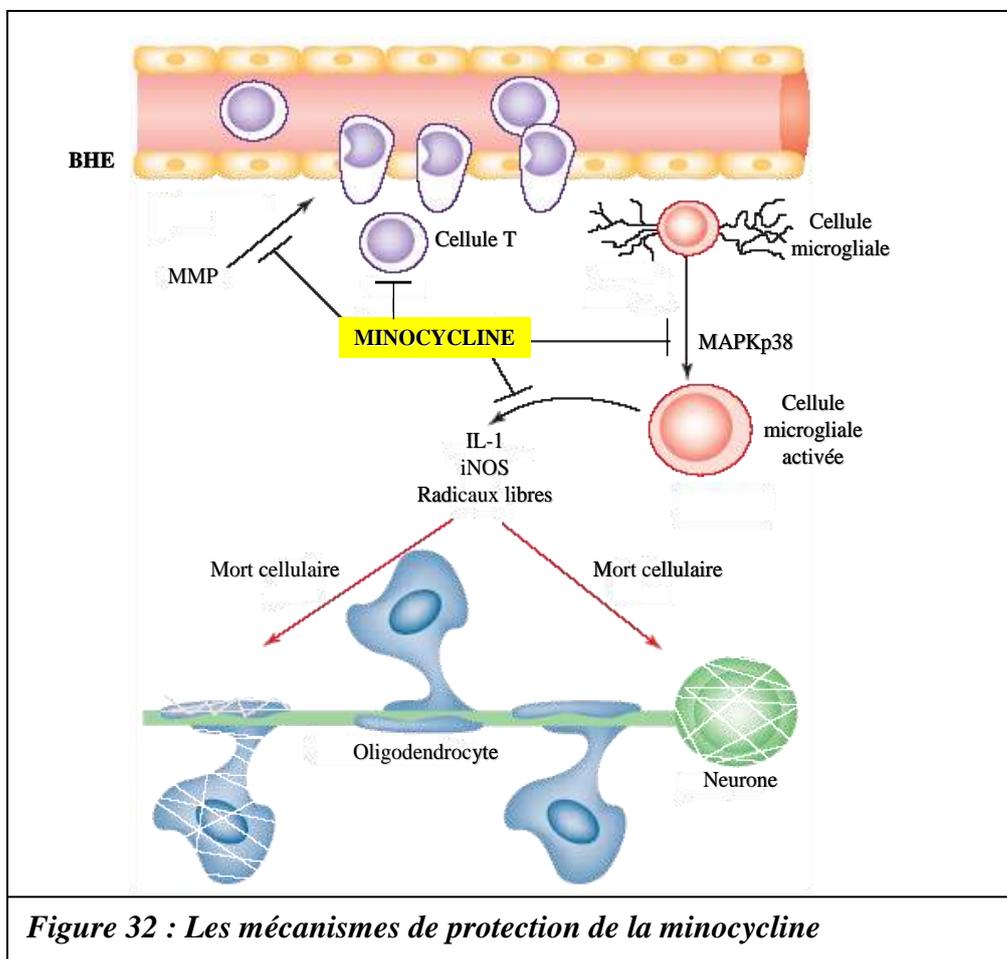
### **Minocycline et lymphocytes T**

L'une des conséquences du traitement par la minocycline est l'effet observé sur l'infiltration lymphocytaire. En effet, nous avons pu noter une diminution significative à J42 des LT dans les greffes de rats ayant reçus de la minocycline comparativement au groupe témoin. Bien que l'on ne puisse exclure que cette observation soit une conséquence directe de l'inhibition microgliale, nous devons également prendre en compte le fait que la minocycline peut présenter d'autres propriétés inhibitrices notamment sur les leucocytes.

Dans un premier temps il a été montré que la minocycline pouvait avoir des effets directs sur l'activation des leucocytes. En effet, il semblerait que l'antibiotique puisse inhiber la prolifération des cellules T réduisant par la même occasion, leur production de cytokines (Kloppenburger et al., 1995; Kloppenburger et al., 1996). D'autre part, ce dérivé de la tétracycline a été décrite pour sa capacité à inhiber les métalloprotéinases matricielles (MMP) in vitro et in vivo (Brundula et al., 2002; Popovic et al., 2002; Power et al., 2003). Or, les MMP sont des enzymes essentielles pour le passage transendothélial des LT à travers la BHE. La minocycline, en inhibant les MMP, pourrait réduire la migration cellulaire, et plus particulièrement la migration lymphocytaire, dans le parenchyme nerveux. Enfin, il a également été démontré que l'antibiotique pouvait induire une diminution de l'expression de CD40 ligand sur les LT, molécule clé du contact entre cellule microgliale et LT (Giuliani et al., 2005). Or, il est admis que les LT doivent être restimulés localement lors de leur pénétration dans le SNC pour procéder au rejet efficace des cellules transplantées. Il semblerait que les cellules microgliales activées disposent de la machinerie nécessaire pour remplir cette fonction de restimulation locale. Dès lors, l'absence de contact possible entre LT et microglie activée empêcherait la restimulation locale des LT et induirait leur anergie.

### Hypothèses sur l'effet minocycline dans notre modèle

Le spectre d'action très étendu de la minocycline résumé figure 32 ouvre plusieurs possibilités quant aux mécanismes mis en jeu pour retarder le rejet des xénogreffes. Bien qu'il soit fort probable que les multiples capacités inhibitrices de l'antibiotique s'associent pour conduire à la survie prolongée des xénogreffes, il est également envisageable que l'un des deux phénomènes observés, inhibition de l'activation microgliale ou inhibition de l'infiltration lymphocytaire soit à l'origine de l'autre. En effet, lors du rejet de xénogreffes, l'activation de la microglie et l'infiltration des LT sont deux phénomènes qui ne peuvent être dissociés puisque les cytokines exprimées par les cellules microgliales activées, telles que le  $TNF\alpha$ , favorisent la prolifération et l'entrée des LT dans le parenchyme et qu'en retour, les LT en produisant de l' $INF\gamma$  stimulent l'activation microgliale. Ainsi, il est possible que la diminution de l'activation microgliale au moment du rejet, en altérant d'une part le profil d'expression des cytokines et d'autre part l'expression des molécules telles que CMH II ou B7 à leur surface, empêche l'accès au parenchyme et la restimulation locale des LT qui sont alors dans l'incapacité de proliférer. D'autre part, il est également possible que la minocycline en empêchant directement la prolifération des cellules T ainsi que leur passage à travers la BHE, inhibe leur infiltration et, par conséquent, l'activation microgliale qui en découle.



**Figure 32 : Les mécanismes de protection de la minocycline**

### **Minocycline et apoptose**

La minocycline a également été décrite pour son rôle neuroprotecteur via son action anti-apoptotique (pour revue: Stirling et al., 2005). En effet, en stabilisant les membranes des mitochondries, l'antibiotique inhiberait la perméabilité mitochondriale et donc la libération du cytochrome c dans le cytosol (Zhu et al., 2002; Wang et al., 2004). Ce dernier, est un stimulateur des caspases 3 et 9 responsables de l'initiation du programme d'apoptose. Aussi, bien que l'on ait noté une diminution significative des cellules microgliales activées et des LT chez les rats ayant reçu de la minocycline, on ne peut exclure le rôle neuroprotecteur de cette dernière pour expliquer la survie prolongée des greffes. Plus particulièrement, il est admis que seuls 5 à 10% des neuroblastes survivent après leur transplantation intracérébrale et que les autres meurent par apoptose générant par la même occasion de nombreux antigènes susceptibles d'initier une réponse immune. Or, il est alors possible que la minocycline en inhibant l'apoptose diminue le nombre d'antigènes libérés.

### **Mode d'action de la minocycline**

Bien que la minocycline présente un large spectre d'action, son mode d'action reste encore mal compris. Néanmoins, des études réalisées via des inhibiteurs de MAPK p38 (Mitogen-Activated Protein Kinase p38) ont révélé des effets similaires à ceux exercés par la minocycline (Lin et al., 2001; Tikka and Koistinaho, 2001). En effet, il a notamment été montré que la MAPK p38 joue un rôle important dans la transduction des signaux inflammatoires (Dong et al., 2002; Koistinaho and Koistinaho, 2002; Kumar et al., 2003) ainsi que dans l'initiation du programme d'apoptose (Kikuchi et al., 2000) suggérant que le mode d'action de la minocycline pourrait être lié à une inactivation de la protéine kinase.

Finalement, le traitement minocycline s'est avéré être efficace pour la survie de notre modèle de xéno greffe. Bien que les mécanismes potentiellement responsables du rejet retardé demeurent variés, les répercussions du traitement sur les processus d'activation de la microglie et d'infiltration lymphocytaire suggèrent que les deux phénomènes sont liés au moment du rejet. Ainsi, nos résultats semblent évoquer un rôle important des cellules microgliales activées dans le maintien des cellules T effectrices dans le SNC via une synthèse cytokinique soutenue et/ou la restimulation locale des LT.

Par ailleurs, l'inefficacité du traitement minocycline pour inhiber l'activation microgliale précoce survenant suite au geste chirurgical ne permet pas de conclure quant au

rôle potentiel de cette dernière dans l'initiation de la réponse T en périphérie. Néanmoins, il n'existe pour l'instant aucune donnée disponible concernant la capacité des cellules microgliales activées à migrer en-dehors du SNC en nombre significatif pour présenter l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires et initier une réponse spécifique. La recherche des cellules potentiellement responsables de cette initiation fera l'objet de la deuxième partie de mon travail de thèse.

*TRAVAIL DE THESE :*

*Deuxième partie*

La forte infiltration de LT observée dans les xéngreffes de neurones embryonnaires porcins transplantés dans le striatum de rat est synonyme de rejet définitif pour les neuroblastes implantés. Cependant, ces cellules immunitaires n'apparaissent que 5 à 7 semaines après la xénotransplantation et les mécanismes responsables de leur recrutement ne sont pas connus. Bien qu'une forte activation des cellules microgliales ait été observée dans les jours qui suivent la greffe et au moment du rejet, il paraît peu probable que ces cellules soient capables de migrer et d'activer des LT naïfs. En revanche, les cellules dendritiques (CD), cellules sentinelles de l'immunité innée dans la plupart des organes, sont à ce jour les seules cellules capables d'induire une réponse spécifique des LT contre un antigène donné. Néanmoins, les caractéristiques immunologiques particulières du SNC rendent l'accès intracérébral des CD impossible si bien que celles-ci demeurent indétectables dans le parenchyme nerveux sain. Toutefois, dans les méninges et le plexus choroïde, des cellules dendriformes exprimant les marqueurs des CD tels que le CMH II et Ox62 ont été observées. C'est Vass qui a décrit pour la première, la présence de ces cellules dans les méninges de rat par analyses immunohistochimiques (Vass et al., 1986). Puis, elles ont été identifiées comme des CD par McMenamin (McMenamin, 1999). La présence de ces cellules a ensuite été mise en évidence au niveau du plexus choroïde (Matyszak and Perry, 1996). Cette localisation des CD au niveau du plexus choroïde et des méninges, qui correspondent respectivement aux sites de sécrétion et de circulation du LCR, leur permettent d'atteindre les ganglions cervicaux profonds où elles peuvent rencontrer les cellules T naïves. Il semble donc que les CD constituent une passerelle entre l'immunité innée et adaptative puisque d'une part, leur capacité de phagocytose et leur localisation stratégique à la périphérie du SNC dans le LCR leur permettent de jouer le rôle de sentinelles pour capturer les antigènes drainés par le LCR (McMenamin et al., 2003). D'autre part, elles peuvent initier la réponse adaptative en gagnant rapidement les ganglions cervicaux, via le LCR, où elles peuvent activer spécifiquement des cellules T naïves (Banchereau and Steinman, 1998).

Les premières études descriptives sur les CD du SNC ont montré qu'elles pouvaient inhiber la réponse immune adaptative (Suter et al., 2003). De nouvelles analyses ont par la suite reporté que les CD permettent la réactivation des cellules T dans le SNC (Greter et al., 2005) et que finalement comparativement à d'autres CPA du SNC, ce sont les seules à pouvoir activer efficacement les cellules T naïves (McMahon et al., 2005). Face au potentiel immunologique des CD concernant l'activation d'une réponse cellulaire T spécifique ainsi que leur localisation péri-parenchymale, nous avons entrepris de rechercher la présence de CD dans notre modèle de xéngreffes de neurones embryonnaires porcins dans le striatum de rat.

## DEUXIEME PUBLICATION

*“Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain”*

*Delphine Michel, Véronique Nerrière-Daguin, Régis Josien, Philippe Brachet, Philippe Naveilhan and Isabelle Neveu.*

*Experimental Neurology 202 (2006) 76-84.*

## Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain

Delphine C. Michel, Véronique Nerrière-Daguin, Régis Josien, Philippe Brachet, Philippe Naveilhan<sup>\*,1</sup>, Isabelle Neveu<sup>1</sup>

*INSERM, U643, Nantes F44000, France  
CHU Nantes, ITERT, Nantes F44000, France  
Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F44000, France*

Received 10 March 2006; revised 4 May 2006; accepted 13 May 2006  
Available online 7 July 2006

### Abstract

Following transplantation into the rat brain, porcine neuroblasts differentiate and integrate host tissue, but due to their xenogeneic nature, these cells are generally rejected within several weeks. This rejection is accompanied by infiltration of the graft by macrophages and  $\alpha\beta$ T lymphocytes, but so far nothing is known about the potential role of dendritic cells (DCs) in this process. DCs are professional antigen presenting cells that have the unique ability to prime naive T cells, thereby initiating an antigen-directed immune response. Here, we provide evidence for DC recruitment following the transplantation of pig mesencephalic neural cells into the striatum of LEW.1A rats, as indicated by the high number of OX62+ cells in the rejecting graft and the absence of V65 staining. DCs were found as early as 3 and 8 days postimplantation together with ED1+ and OX42+ cells. This early recruitment, which is probably due to the surgical procedure, might be a critical step in the rejection process, enabling DCs to be loaded with xenoantigens. The number of intracerebral DCs subsequently decreased, being barely detectable in older non-infiltrated xenografts. However, DCs re-appeared as they were observed in grafts infiltrated by macrophages and T cells, a phenomenon that usually precedes graft rejection. Interestingly, we observed a tight correlation between the number of DCs and that of R7.3+ T cells infiltrating the graft. In addition, DCs were often found in close proximity to  $\alpha\beta$ T cells and most expressed MHCII. Taken together, these findings give credence to a role for infiltrating DCs in the mediation of T cell responses to intracerebral xenografting.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Neurodegenerative disease; Parkinson's disease; Astrocyte; Neuron; Immune response; Microglial cell; CD4; CD8; Xenotransplantation

### Introduction

Cell replacement-based therapy is an interesting approach for the treatment of neurodegenerative diseases. Experimental and clinical studies using allogeneic tissues have provided proof-of-concept of such a strategy (Herman and Abrous, 1994; Lindvall and Bjorklund, 2004), but the limited access to human embryonic neurons and the ethical problems regarding their use

have led to the search for alternative sources of transplantable cells, such as porcine neuroblasts. Following their transplantation into the rodent brain, porcine neuroblasts are capable of emitting long axons and integrating host tissue, resulting in functional recovery (Galpern et al., 1996). However, in the absence of immunosuppressive treatment, the cells are generally rejected within 5–7 weeks post-transplantation (Barker et al., 2000; Melchior et al., 2002; Remy et al., 2001), despite the presence of the blood–brain barrier and the lack of conventional lymphatic drainage in the central nervous system (CNS). The rejection process is accompanied by an infiltration of the graft by macrophages/microglial cells, and a sudden appearance of T lymphocytes. This coincides with a marked accumulation of transcripts encoding monocyte chemoattractants such as MCP-1

\* Corresponding author. INSERM U643, 30 Bd Jean Mornet, 44093 Nantes cedex 01, France.

E-mail address: [Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr](mailto:Philippe.Naveilhan@univ-nantes.fr) (P. Naveilhan).

<sup>1</sup> Equal contribution.

and RANTES, as well as proinflammatory lymphokines and Th1 cytokines (Barker et al., 2000; Melchior et al., 2002; Remy et al., 2001). This late recruitment of lymphocytes suggests an indirect T cell activation, i.e. the processing of xenoantigens by host antigen-presenting cells and their presentation to recipient T cells. Activated microglial cells and macrophages, which are present in high numbers at day 3 and during rejection of xenografted porcine neuroblasts (Remy et al., 2001), are able to process and present antigens to T cells, but only dendritic cells (DCs) have the ability to prime naive T cells and thereby initiate a specific T cell response directed against xenoantigens. DCs have been detected in the CNS in the case of experimental allergic encephalomyelitis lesions or infection (Greter et al., 2005; Karman et al., 2004; Matyszak and Perry, 1996; Trifilo and Lane, 2004) but to date, nothing is known about the potential involvement of these professional antigen-presenting cells (APCs) in the cell-mediated rejection of intracerebral xenografts. In the present paper, we provide the first evidence of an intracerebral recruitment of DCs following the transplantation of porcine mesencephalic neurons into the rat striatum, thus opening new perspectives regarding the primary events leading to the rejection of neural xenografts.

## Material and methods

### *Animals and surgical procedures*

Pieces of ventral mesencephalon were dissected from G27/28 embryos of 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. All material was kept in hibernation medium at 4°C and used for up to 3 days. Porcine neuroblasts were prepared as previously described (Remy et al., 2001). The cell suspension was adjusted to a concentration of approximately  $2 \times 10^5$  cells/ $\mu$ l.

The transplantation was performed as previously described (Melchior et al., 2003; Remy et al., 2001). Male Lewis 1A rats weighing around 250 g were purchased from Janvier CERJ (Rouen, F). The animals were manipulated in compliance with the ethical rules and guidelines of our institute. Anesthesia was performed with an intramuscular injection of 2% Rompun and 50 mg/ml ketamine (1.6 ml/kg) (PanPharma, Fougères, F). Deeply anesthetized rats were then placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). After partial skull removal, porcine neuroblasts were transplanted unilaterally at the following coordinates according to the Bregma: anterior, +0.7 mm, lateral -2.8 mm; ventral -5.4 mm and -5.8 mm; incisor bar -3.3 mm. Implanted animals received a total of  $4 \times 10^5$  cells (2  $\mu$ l) using a Hamilton syringe placed on an automated microinjector (Phymed, Paris, F) over a time period of 1 min. After a 4 min delay period, the needle was gently removed, the piece of skull replaced and the skin sutured.

At 3, 8, 28, 42 and 63 days post-transplantation, animals were anesthetized with intraperitoneal injection of 2% Rompun and 50 mg/ml ketamine (3.2 ml/kg) and transcardially perfused with 200 ml of 0.9% NaCl, followed by 200 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 cold-isopentane and stored at -80°C. Sections of 20  $\mu$ m were prepared using a cryostat (Leica) and stored at -80°C.

### *Immunohistochemistry*

Slides were postfixed with PFA for 10 min and endogenous peroxidase was neutralized with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. After 45 min of incubation in 10% normal goat serum in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, F), slides were exposed overnight at 4°C to primary antibodies. Porcine neurons were stained with a monoclonal antibody (mAb) that specifically recognized the 70 kDa pig neurofilament protein NF70 (clone DP5; diluted 1:500; Université Paris 7, F). The anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (1:1000; Pel Freeze, Rogers, Ark, USA) was used to characterize dopaminergic neurons. Reactive astrocytes were labeled with a mAb raised against the Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) diluted 1:800 (Sigma-Aldrich). Immune cells were labeled with a series of mAbs obtained from the European Collection of Cell Culture (ECCC, Salisbury, UK). ED1 and OX42 were used to label macrophages/microglia. R7.3 was used to detect the TCR $\alpha\beta$  chain on T lymphocytes. V65 stained  $\gamma\delta$ T cells. OX62 revealed DCs and  $\gamma\delta$ T cells. T cells were detected using the W3/25 mAb (1:250) and CD8 $\beta$ <sup>+</sup> cells were stained with the 3.4.1 mAb.

Rat MHC II molecules (RT1B) were labeled with OX6 (BD Pharmingen, San Diego, CA, 1:1000). After washing, slides were incubated for 1 h at room temperature with biotinylated anti-mouse antibodies, diluted 1:500 in PBS/4% BSA. Slides were then washed and sections were exposed for 1 h to an avidin-biotinylated-peroxidase complex, and reacted with Vector very intense purple substrate (VIP, Vector ABC kit). After several washes in distilled water, slides were counterstained with hematoxylin and mounted with Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, F). Brain sections were observed using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). OX62 and R7.3 immunostaining was graded on a scale according to the histological criteria described by Armstrong et al., 2001.

Double labeling was performed as described above with two exceptions: (1) the avidin-biotinylated-peroxidase complex was first revealed using diaminobenzidine (DAB, Vector) in the presence of NiCl to obtain a black staining and (2) the second immunolabeling was revealed using only DAB so as to give a brown staining. Confocal analyses were performed after double staining with fluorescent-conjugated antibodies. After incubation in 10% normal goat serum-4% BSA, the slides were incubated with OX6 or W3.25 mAbs and exposed to FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody. Sections were then washed, fixed in 4% PFA for 15 min and stained with OX62, before being incubated with an Alexa 568-conjugated anti-mouse IgG antibody. The slides were observed using a confocal microscope (Leica).

Table 1  
Evaluation of the rejection using R7.3 and NF70 staining

Day postgraft	3/8	28	42	63
Rat number	7	5	15	10
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>-</sup>	2	3	2	0
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>+/-</sup>	5	0	0	0
NF70 <sup>+</sup> /R7.3 <sup>+</sup>	0	1	4	0
NF70 <sup>-</sup> /R7.3 <sup>+</sup>	0	0	4	0
Scar	0	1	5	10

R7.3+/- represents brain with 1–10 T cells per section.

### Semi-quantitative histological evaluation

Semi-quantitative histological quantification was performed as described by Armstrong et al. (2001). Briefly, sections were immunostained with Ox62 or R7.3, and the scale used to evaluate the staining was as followed: 0, no immunopositive cells; 0.5, extremely rare positive cells in some sections; 1, occasional positive cells in all the sections; 2, several immunopositive cells at the periphery of the graft; 3, numerous cells within and around the graft mass; 4, intense immunostaining inside the graft mass and in a large part of the grafted striatum.

## Results

### Graft survival and expression of neural markers

Porcine mesencephalic neuroblasts were transplanted into the striata of adult rats ( $n = 15$ ) and the analyses were first performed at day 42 postimplantation, which corresponded to

the average lag phase before cell rejection. At this time-point, four grafts were immunonegative for pig NF70 and strongly infiltrated by immune cells (Table 1). Five were replaced by a scar but 6 out of 15 survived as indicated pig NF70 immunohistochemistry. Two of the surviving grafts were poorly infiltrated, if at all (Figs. 1a–c, and 2a–d). Conversely, four grafts were markedly infiltrated (Figs. 1d–f, and 2e–h). Both non-infiltrated and infiltrated xenografts contained a dense network of pig NF70 protein (Figs. 1a and d) and a few TH<sup>+</sup> cells located at their periphery (Figs. 1b and e). The staining patterns obtained with an anti-GFAP antibody, which recognizes both rat and pig intermediate filaments, differed between the two types of surviving grafts. In non-infiltrated grafts, an intensely stained network of thin fibers was observed together with a staining around the blood vessels, whereas only a few large GFAP<sup>+</sup> cells were detected within the transplant (Fig. 1c). Prototypical GFAP<sup>+</sup> astrocytes were also found in the host parenchyma but were scattered throughout the striatum (Fig. 1c). In infiltrated grafts, GFAP<sup>+</sup> fibers were also observed within the graft, although they were in a lower density than in the non-infiltrated grafts. The main difference hinged, however, on the GFAP staining of host parenchyma, since in the case of infiltrated grafts, a huge number of cells were strongly immunolabeled throughout the grafted side of the rat striatum (Fig. 1f).

### Characterization of infiltrating cells

OX42<sup>+</sup> cells were present in the non-infiltrated graft, but although they were more strongly labeled than the microglial

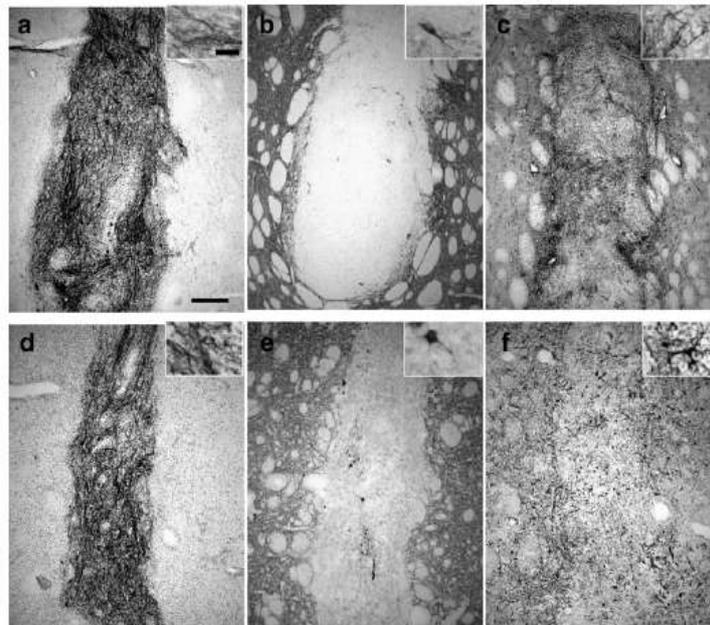


Fig. 1. Immunohistochemistry of non infiltrated (a–c) and infiltrated (d–f) grafts at day 42 postimplantation. Porcine neuroblasts were transplanted into the rat striatum and the animals were sacrificed 42 days later. The brain sections were immunostained with anti-porcine NF70 (a, d), anti-TH (b, e) and anti-GFAP (c, f) antibodies. Scale bar 200  $\mu$ m; insert, 25  $\mu$ m.

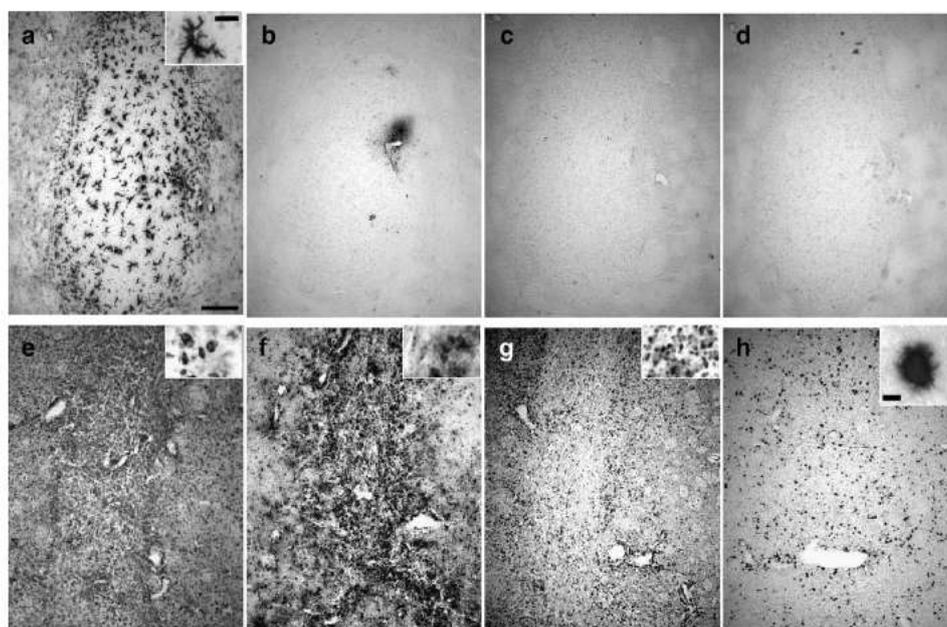


Fig. 2. Immunohistochemistry of non-infiltrated (a–d) and infiltrated (e–h) grafts at day 42 postimplantation. Porcine neuroblasts were grafted into the rat striatum and the animals were sacrificed 42 days later. The brain sections were immunostained with OX42 (a, e), ED1 (b, f), R7.3 (c, g) and OX62 (d, h) antibodies. Scale bar 200  $\mu$ m; insert, 25  $\mu$ m except in panel h, 10  $\mu$ m.

cells scattered in the surrounding striatum, they had a ramified morphology (Fig. 2a) and did not express ED1 (Fig. 2b). In contrast, strongly labeled OX42<sup>+</sup> cells were found within the transplant and throughout the grafted striatum in animals bearing an infiltrated graft (Fig. 2e). These cells were in higher numbers than in non-rejecting animals, exhibiting a rounded, amoeboid morphology (Fig. 2e compared to Fig. 2a) and expressing the ED1 marker characteristic of activated macrophages (Fig. 2f compared to Fig. 2b).

Likewise, infiltrated grafts contained numerous R7.3<sup>+</sup> T lymphocytes, which were absent in intact grafts (Figs. 2c and g). Since the classical anti-CD4 and anti-CD8 mAbs also labeled DCs and macrophages, the T cells were characterized by a double staining using the R7.3 mAb, which recognizes the TCR $\alpha\beta$  chains, and the 3.4.1 mAb raised against the  $\beta$  chain of CD8<sup>+</sup> T cells. Using this strategy, CD8<sup>-</sup>/R7.3<sup>+</sup> cells (CD4<sup>+</sup> T cells) were labeled in brown and CD8<sup>+</sup>/R7.3<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup> T cells) were stained in black (Figs. 3a and b). Cell counting indicated 71.4  $\pm$  1% of CD8<sup>-</sup> T cells and 28.6  $\pm$  1% of CD8<sup>+</sup> T cells ( $n = 4$ ).

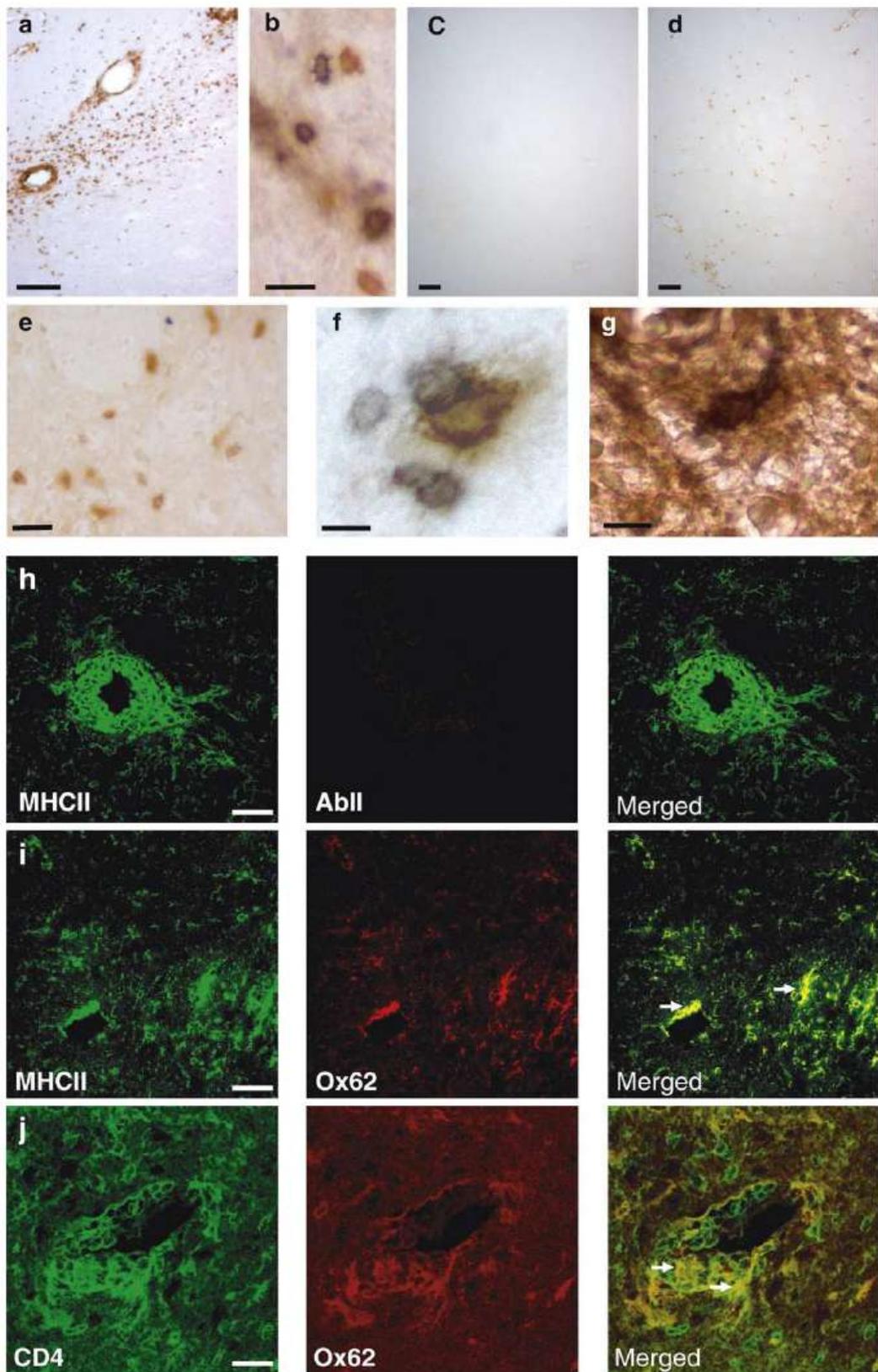
#### Detection of DCs

To evaluate a potential involvement of DCs in the rejection of intracerebral neural xenografts, immunohistochemistry was performed with OX62, an antibody directed against CD103, an  $\alpha\epsilon$ -integrin present on the surface of conventional rat DCs but not rat plasmacytoid dendritic cells (Hubert et al., 2004). As shown in Fig. 2h, a large number of immunopositive cells were

detected in the infiltrated grafts. The localization of OX62<sup>+</sup> cells was restricted to the grafted striatum and no immunopositive cells were found in the contralateral striatum (data not shown) or in non-infiltrated grafts (Fig. 2d). Besides DCs, the OX62 mAb may also label  $\gamma\delta$  T lymphocytes, a subpopulation of T cells. Therefore, serial sections were stained with the V65 mAb directed against the  $\gamma\delta$  T cell receptor (TCR), and/or OX62 (Figs. 3c–e). No V65<sup>+</sup> cells could be detected in the grafted striatum, in contrast to the numerous OX62<sup>+</sup> cells present, thus indicating that OX62<sup>+</sup> cells are most probably DCs.

A double staining with OX62 and W3/25 mAbs revealed that most OX62<sup>+</sup> cells were CD4<sup>+</sup> (Fig. 3j), a phenotype representative of a subpopulation of DCs. Very few OX62<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> cells were present within the grafted striatum, but numerous OX62<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> cells exhibiting a T cell morphology were observed. A double staining with OX62 and R7.3 revealed that DCs were often in close contact with  $\alpha\beta$  T cells (Fig. 3f), and a semi-quantitative evaluation using the scale described by Armstrong et al. (2001) showed a correlation between the number of OX62<sup>+</sup> and R7.3<sup>+</sup> cells infiltrating the grafts (Fig. 4). These OX62<sup>+</sup> cells might present antigens to T cells since they were virtually all immunopositive for OX6, an antibody directed against RT1B (rat MHCII) (Fig. 3i). A large number of MHC II<sup>+</sup> cells were negative for OX62 (Fig. 3g), these were probably activated microglia/brain macrophages or glial cells.

To define the appearance of DCs after the intracerebral transplantation of xenogenic cells, rats received xenografts and were sacrificed at time-points before and after day 42. At days 3 and 8, no signs of rejection were observed and



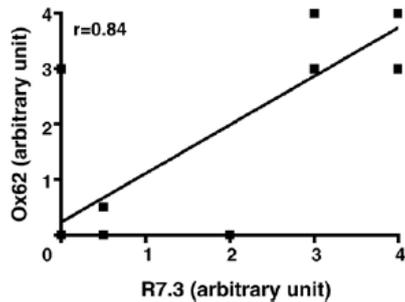


Fig. 4. R7.3 and OX62 immunostaining as evaluated using the histological criteria described by Armstrong et al. (2001). The data indicate a correlation between the number of OX62<sup>+</sup> cells and R7.3<sup>+</sup> cells infiltrating the xenografts in the striatum at day 42 postimplantation ( $r^2 = 0.7$ ,  $P < 0.0001$ ).

only rare R7.3<sup>+</sup> cells were detected in 5 out of the 7 animals (Table 1). By day 28, one rat had rejected the graft and another was in the process of doing so out of 5 animals. At day 63, only a scar could be observed in all animals. No V65<sup>+</sup> cells were detected by immunostaining at any time, but OX62<sup>+</sup> cells were clearly found at day 3 and 8 in all rats analyzed albeit in relatively low numbers. At day 8, OX62<sup>+</sup> cells were present, together with numerous ED1<sup>+</sup> and OX42<sup>+</sup> cells in 5 out of the 7 animals (Fig. 5), while only rare R7.3<sup>+</sup> cells were detected (Table 1). These OX62<sup>+</sup> cells were clearly MHC II<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> (Fig. 6) even though the MHCII staining was less intense than at day 42. OX62<sup>+</sup> cells as well as ED1<sup>+</sup> and OX42<sup>+</sup> cells were also found after the injection of vehicle into the striatum (Figs. 7a, b and c) while these cells were absent from the contralateral side of the grafted or vehicle-injected brains (data not shown). This early recruitment might therefore be part of the inflammatory process induced by the surgical procedure. By day 28, OX62<sup>+</sup> cells were either in very low numbers or undetectable in the NF70<sup>+</sup>/R7.3<sup>-</sup> grafts. This contrasted with the numerous DCs present within the graft in rejecting animals (NF70<sup>+</sup>/R7.3<sup>+</sup>) at day 42. At day 63, residual DCs were present around the scar in 6 out of 10 animals.

## Discussion

Out of 15 LEW.1A rats transplanted with fetal pig mesencephalic neuroblasts, 6 grafts survived at 42 days post-transplantation but only two of them had not been infiltrated by T lymphocytes at this time. Our results confirm previous studies

showing a slow but certain rejection of discordant xenogeneic neural cells following their transplantation into the brain of an adult immunocompetent rat (Armstrong et al., 2001; Barker et al., 2000; Galpern et al., 1996; Larsson et al., 2001; Melchior et al., 2002; Remy et al., 2001).

The two xenografts devoid of T cells contained numerous NF70<sup>+</sup> cells and a few TH-expressing cells located at the periphery. They also contained numerous astrocytic extensions, as shown by GFAP labeling, whereas only few GFAP<sup>+</sup> cells exhibiting an astrocyte shape could be detected. Microglial cells located inside the graft exhibited a strong immunoreactivity for OX42 when compared to the cells present in the surrounding parenchymal host tissue. The cells retained a ramified morphology, but their processes were thickened. Although these cells did not express the ED1 marker, these features are consistent with a certain degree of activation, as observed in models of prion and Parkinson's diseases (Depino et al., 2003; Perry, 2004). A much stronger activation of the macrophage/microglial cells was observed in the xenografts infiltrated by T cells. Indeed, a large number of amoeboid OX42<sup>+</sup> and ED1<sup>+</sup> cells were found within the grafts, but also in the surrounding parenchymal host tissue. This pattern is consistent with previous analyses (Armstrong et al., 2001; Barker et al., 2000; Galpern et al., 1996; Melchior et al., 2002; Remy et al., 2001). Characterization of T cells infiltrating the xenografts indicated that a large majority were CD4<sup>+</sup> cells (72%) while only 27% were CD8<sup>+</sup> cells. This is in agreement with the dramatic increase in MCP1 transcripts observed at the time of neural xenogeneic cell rejection in the rat brain (Melchior et al., 2002), since this chemokine promotes the transmigration of CD4<sup>+</sup> T cells (Siveke and Hamann, 1998). Further studies are required to determine the respective role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the xenogeneic immune rejection process. Interestingly, Larsson et al. (1999) reported that the CD4/CD8 ratio was always above 1.5 at the time of rejection, even if the CD8<sup>+</sup> cells were in higher numbers at earlier stages. A major role for CD4<sup>+</sup> cells in xenograft rejection was further supported by the long-term survival of concordant and discordant xenografts after CD4 but not CD8 depletion (Wood et al., 1996) and by the prolonged survival of rat nigral xenografts after their transplantation into the brain of MHC class II, but not class I-deficient mice (Duan et al., 2002).

While infiltration of intracerebral xenografts by microglial cells/macrophages and T cells has been reported by several groups (Armstrong et al., 2001; Barker et al., 2000; Galpern et al., 1996; Larsson et al., 2001; Melchior et al., 2002; Remy et al., 2001), nothing is known concerning the potential presence of DCs. Yet, studies on cell transplantation in peripheral

Fig. 3. Immunohistochemistry of a rejecting brain at day 42 post-transplantation. (a, b) Micrograph of a DAB/DAB-nickel double labeling of T cells with R7.3 (brown) and anti-CD8 $\beta$  (black) mAbs. Scale bar (a) 100  $\mu$ m and (b) 25  $\mu$ m. (c–e) Immunostaining of grafted striatum with V65 (c) and OX62 (d) mAbs, and DAB/DAB-nickel double labeling with OX62 (brown)/V65 (black) (e). Scale bar (c, d) 100  $\mu$ m and (e) 25  $\mu$ m. (f) Double labeling with OX62 and R7.3 showing that T cells (R7.3<sup>+</sup> in black) and DC (OX62<sup>+</sup> in brown) are in close proximity. Scale bar 5  $\mu$ m. (g) DAB/DAB-nickel double labeling of DCs with OX62 (black) and OX6 (rat MHC II) (brown) in an infiltrated graft. Scale bar 10  $\mu$ m. (h–j) Confocal image of a double labeling of OX6/OX62, indicating that most OX62<sup>+</sup> cells express RT1B (rat MHCII) (i), and of W3.25/OX62, showing that a large number of OX62<sup>+</sup> cells were CD4<sup>+</sup> (j), which is representative of a subpopulation of DCs. Brain sections taken at the level of the graft were incubated with OX6 (h, i) or W3/25 (j) and exposed to a FITC-conjugated secondary antibody. The sections were then incubated with or without OX62 before exposure to Alexa 568-coupled secondary antibody. Scale bar 50  $\mu$ m.

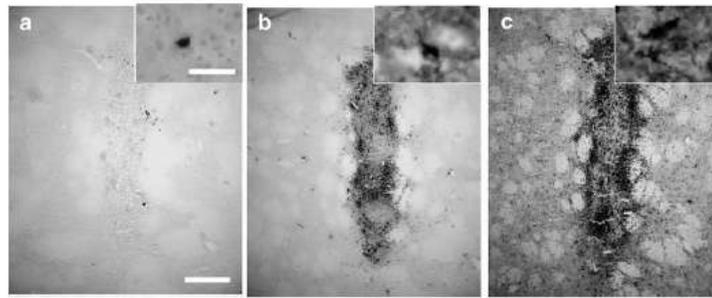


Fig. 5. Early recruitment of DCs following the transplantation of porcine neuroblasts into the rat striatum. Photomicrographs show the presence of OX62<sup>+</sup> (a) ED1<sup>+</sup> (b) and OX42<sup>+</sup> (c) cells at day 8 post-transplantation. Higher magnifications are presented in the inserts. Scale bar 200  $\mu$ m, insert 20  $\mu$ m.

tissues have highlighted the central role of these professional APCs in cell rejection. Indeed, DCs are the only cells capable of priming naive T cells after processing antigen at the site of transplantation. DC may therefore be responsible for initiating the Ag-specific T cell response that leads to the rejection of neural xenogeneic cells in the rat brain. To investigate this possibility, we used the OX62 mAb, which revealed numerous immunoreactive cells in T-infiltrated xenografts, while these cells were scarce within the NF70<sup>+</sup>/R7.3<sup>-</sup> transplant. Since the OX62 mAb may also label  $\gamma\delta$  T cells, we additionally performed staining with the V65 mAb. The results of this staining were negative, thus supporting the DC nature of the OX62<sup>+</sup> cells. Interestingly, several subclasses of DCs have been identified in the rat according to cell surface markers (Liu et al., 1998; Voisine et al., 2002). Double staining indicated that most of the DCs found in the xenografted rat brains were OX62<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. The expression of MHCII supports their capacity to present xenoantigens to T cells, while CD4 expression suggests these DC to have specific functions, which remain to be determined. For instance, it was recently shown that CD4<sup>-</sup> DCs produce high levels of proinflammatory cytokines such as IL-12 or TNF- $\alpha$  in contrast to CD4<sup>+</sup> DCs (Voisine et al., 2002). It would therefore be interesting to characterize the cytokines produced

by OX62<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells and investigate whether selection of this subpopulation contributes to reducing the inflammatory process in the grafted brain. In this regard, it is noteworthy that  $\gamma\delta$  T cells known to induce a massive inflammation in the brain after parasitic diseases (Cardona et al., 1999; Cardona and Teale, 2002), were not detected in the xenografted striatum.

DCs are described as a heterogeneous population present in several peripheral tissues in an immature form (Trinite et al., 2000; Voisine et al., 2002), but these cells have never been detected in the CNS parenchyma under physiological conditions (Matyszak and Perry, 1996). They may be derived from brain resident microglial cells, since these cells can be skewed towards an immature DC-like phenotype upon exposure to GM-CSF, while CD40 ligation triggers their terminal differentiation (Fischer and Reichmann, 2001; Santambrogio et al., 2001). However, the perivascular location of OX62<sup>+</sup> cells in the xenografted striatum suggests a recruitment of brain DCs from a blood-derived population, in agreement with a model of acute brain injury (Newman et al., 2005). In this regard, it is interesting to note that Flt3 ligand recruits plasmacytoid DCs but not conventional DCs to the brain (Curtin et al., 2006).

Tissue-derived DCs have been shown to be necessary for an optimal T cell response (Itano et al., 2003). Such a

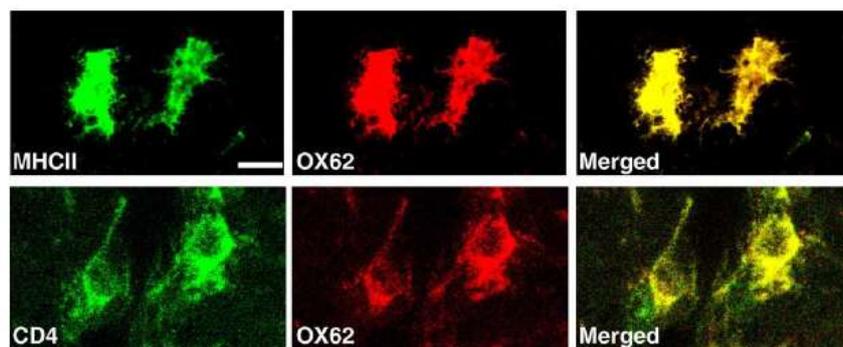


Fig. 6. Co-expression of OX62 and MHC II or CD4 in DCs present in the striatum at day 8 post-transplantation. Confocal imaging of double labeling of rat MHC II (OX6) or CD4 (W3/25) with OX62. Brain sections at the level of the graft were incubated with OX6 or W3/25 and exposed to FITC-coupled secondary antibody. The sections were then incubated with or without OX62 before exposure to Alexa 568-coupled secondary antibody. Scale bar 15  $\mu$ m.

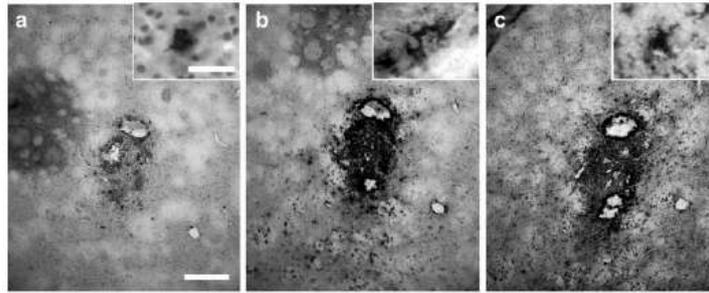


Fig. 7. Inflammatory response and presence of DCs at day 8 following the injection of 2  $\mu$ l of vehicle. Photomicrographs show the presence of OX62<sup>+</sup> (a), ED1<sup>+</sup> (b) and OX42<sup>+</sup> (c) cells at the site of vehicle injection. A higher magnification is presented in the inserts. Scale bar 200  $\mu$ m, insert 20  $\mu$ m.

possibility would question the current hypothesis of antigen lymphatic drainage through the subarachnoid space towards the cervical lymph nodes (Harling-Berg et al., 1999). However, Karman et al. (2004) recently showed that Ag-loaded DCs injected into brain parenchyma were able to migrate from the brain to the lymph nodes to initiate a specific T cell response in the periphery, which in turn led to the homing of activated Ag-specific T cells to the CNS. In addition, experimental studies of CNS autoimmunity have indicated that activated and expanded T cells that enter the CNS need to re-encounter their cognate APCs in order to identify their target (Slavin et al., 2001). The presence of both OX62<sup>+</sup> cells and R7.3<sup>+</sup> cells around the vessels and the correlation between their relative number in the infiltrated graft support such a role for DCs following intracerebral xenotransplantation and might explain why the T lymphocytes present in the graft at the time of rejection differ from the population present in the deep cervical lymph nodes (Melchior et al., 2005). Concerning the potential role of DCs in intracerebral xenograft rejection, it should be noted that the administration of anti-CD4 mAbs may lead to a decrease in the number of DC since most of the OX62<sup>+</sup> cells are CD4<sup>+</sup>. This might contribute to the long-term survival of xenograft observed by Wood et al. (1996), after the treatment of rats with anti-CD4 mAbs. In addition, the recruitment of DCs followed a similar kinetics as that described for macrophages (Remy et al., 2001), with an early infiltration followed by their near disappearance until the time of rejection. Their presence soon after transplantation is probably the result of the surgical procedure, as is the case for OX42<sup>+</sup> and ED1<sup>+</sup> cells. However, this raises the possibility that these professional APCs loaded with xenoantigens migrate to peripheral lymphoid organs where they prime naive T cells and thereby initiate a porcine antigen-directed immune response leading to the rejection of the xenogeneic neurons.

#### Acknowledgments

The authors are particularly grateful to Pr. Jean-Paul Soullou for his support and encouragement. We also thank Joanna Ashton-Chess for editing the manuscript. This work was supported by the "Association Française contre les Myopathies"

(AFM) and the AVENIR program (INSERM). D. Michel was supported by a fellowship INSERM/Région Pays de Loire.

#### References

- Armstrong, R.J., Harrower, T.P., Hurelbrink, C.B., McLaughlin, M., Ratcliffe, E.L., Tyers, P., Richards, A., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., 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., 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.
- Cardona, A.E., Teale, J.M., 2002. Gamma/delta T cell-deficient mice exhibit reduced disease severity and decreased inflammatory response in the brain in murine neurocysticercosis. *J. Immunol.* 169, 3163–3171.
- Cardona, A.E., Restrepo, B.I., Jaramillo, J.M., Teale, J.M., 1999. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *J. Immunol.* 162, 995–1002.
- Curtin, J.F., King, G.D., Barcia, C., Liu, C., Hubert, F.X., Guillonnet, C., Josien, R., Anegón, I., Lowenstein, P.R., Castro, M.G., 2006. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand recruits plasmacytoid dendritic cells to the brain. *J. Immunol.* 176, 3566–3577.
- Depino, A.M., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., del Rey, A., Pitossi, F.J., Oertel, W.H., 2003. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2731–2742.
- Duan, W.M., Westerman, M.A., Wong, G., Low, W.C., 2002. Rat nigral xenografts survive in the brain of MHC class II-, but not class I-deficient mice. *Neuroscience* 115, 495–504.
- Fischer, H.G., Reichmann, G., 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol.* 166, 2717–2726.
- Galpern, W.R., Burns, L.H., Deacon, T.W., 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.
- Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., Becher, B., 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 11, 328–334.
- Harling-Berg, C.J., Park, T.J., Knopf, P.M., 1999. Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *J. Neuroimmunol.* 101, 111–127.
- Herman, J.P., Abrous, N.D., 1994. Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog. Neurobiol.* 44, 1–35.
- Hubert, F.X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., Josien, R., 2004. Rat

- plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J. Immunol.* 172, 7485–7494.
- Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y., Jenkins, M.K., 2003. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19, 47–57.
- Karman, J., Ling, C., Sandor, M., Fabry, Z., 2004. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J. Immunol.* 173, 2353–2361.
- Larsson, L.C., Czech, K.A., Widner, H., Korsgren, O., 1999. Discordant neural tissue xenografts survive longer in immunoglobulin deficient mice. *Transplantation* 68, 1153–1160.
- Larsson, L.C., Frielingsdorf, H., Mirza, B., Hansson, S.J., Anderson, P., Czech, K.A., Strandberg, M., Widner, H., 2001. Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp. Neurol.* 172, 100–114.
- Lindvall, O., Bjorklund, A., 2004. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1, 382–393.
- Liu, L., Zhang, M., Jenkins, C., MacPherson, G.G., 1998. Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J. Immunol.* 161, 1146–1155.
- Matyszak, M.K., Perry, V.H., 1996. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 74, 599–608.
- Melchior, B., Remy, S., Neri-Daguin, V., Heslan, J.M., Soullillou, J.P., 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.
- Melchior, B., Neri-Daguin, V., Laplaud, D.A., Remy, S., Wiertelowski, S., Neveu, I., Naveilhan, P., Meakin, S.O., Brachet, P., 2003. Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependent neuroprotection. *Exp. Neurol.* 183, 367–378.
- Melchior, B., Neri-Daguin, V., Degauque, N., Brouard, S., Guillet, M., Soullillou, J.P., Brachet, P., 2005. Compartmentalization of TCR repertoire alteration during rejection of an intrabrain xenograft. *Exp. Neurol.* 192, 373–383.
- Newman, T.A., Galea, I., van Rooijen, N., Perry, V.H., 2005. Blood-derived dendritic cells in an acute brain injury. *J. Neuroimmunol.* 166, 167–172.
- Perry, V.H., 2004. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav. Immun.* 18, 407–413.
- Remy, S., Canova, C., Daguin-Nerriere, V., Martin, C., Melchior, B., Neveu, I., Chareau, B., Soullillou, J.P., Brachet, P., 2001. Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotranspl. (Kbh.)* 8, 136–148.
- Santambrogio, L., Belyanskaya, S.L., Fischer, F.R., Cipriani, B., Brosnan, C.F., Ricciardi-Castagnoli, P., Stern, L.J., Strominger, J.L., Riese, R., 2001. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6295–6300.
- Siveke, J.T., Hamann, A., 1998. Cutting edge: T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J. Immunol.* 160, 550–554.
- Slavin, A.J., Soos, J.M., Stuve, O., Patarroyo, J.C., Weiner, H.L., Fontana, A., Bikoff, E.K., Zamvil, S.S., 2001. Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 108, 1133–1139.
- Trifilo, M.J., Lane, T.E., 2004. The CC chemokine ligand 3 regulates CD11c+CD11b+CD8alpha- dendritic cell maturation and activation following viral infection of the central nervous system: implications for a role in T cell activation. *Virology* 327, 8–15.
- Trinite, B., Voisine, C., Yagita, H., Josien, R., 2000. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J. Immunol.* 165, 4202–4208.
- Voisine, C., Hubert, F.X., Trinite, B., Heslan, M., Josien, R., 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J. Immunol.* 169, 2284–2291.
- Wood, M.J., Sloan, D.J., Wood, K.J., Charlton, H.M., 1996. Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience* 70, 775–789.

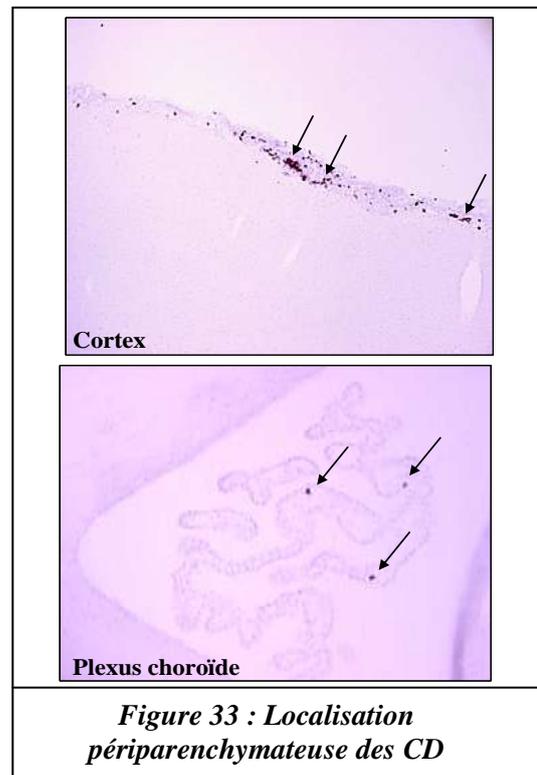
En dépit du fait que les CD ne font pas partie des composants cellulaires du tissu nerveux sain, elles semblent jouer un rôle important dans la réaction immunitaire qui conduit au rejet des xénogreffes de neurones embryonnaires porcins transplantés dans le striatum de rat. En effet, nous avons observé que les CD sont présentes dans toutes les greffes étudiées dès 3 jours après l'implantation.

### L'origine des CD

La localisation ectopique intraparenchymateuse des CD n'est pas clairement établie. Deux hypothèses concernant l'origine de ces cellules sont aujourd'hui avancées.

1) Il a été montré in vitro que les cellules microgliales pouvaient se différencier en CD mais cette différenciation ne pouvait se produire qu'en présence d'astrocytes. En effet, il semblerait que le GM-CSF, synthétisé par la microglie et les astrocytes activés (Wada et al., 1997), induirait le phénotype de CD immatures et que le M-CSF, libéré par les astrocytes, assurerait l'apparition de la fonction de présentation de l'antigène (Fischer and Bielinsky, 1999). Bien que cette propriété n'ait été démontrée qu'en condition in vitro, la forte activation microgliale ainsi que l'astroglie précoces observées dans notre modèle, deux phénomènes résultants du geste chirurgical, fournissent un environnement propice à cette différenciation en CD. Néanmoins, étant donné l'importance des phénomènes d'activation de la microglie et des astrocytes, on pourrait s'attendre à ce qu'il y ait davantage de CD à ce stade.

2) Les CD retrouvées dans la greffe peuvent également provenir des méninges. En conditions normales non inflammatoires, les CD sont drainées par le LCR et sont localisées au niveau du plexus choroïde dans le système ventriculaire et dans l'espace sous-arachnoïdien de la barrière méningée. Aussi, bien que cette dernière soit retirée avant l'implantation intracérébrale, il est probable que quelques CD puissent gagner le site de greffe sous l'effet du geste chirurgical et de la rupture de la BHE. La mise en évidence de la présence de CD au niveau de la barrière méningée sur la surface corticale ainsi qu'au niveau du plexus choroïde 3 jours après l'opération conforte cette hypothèse (Fig. 33).



### La migration périphérique des CD

Par la suite, les CD tendent à disparaître de la greffe jusqu'au moment du rejet (Fig. 34). Cette disparition peut témoigner de leur migration périphérique, puisqu'il a été montré que des CD injectées dans le parenchyme pouvaient atteindre rapidement les ganglions lymphatiques cervicaux (Carson et al., 1999; Karman et al., 2004).

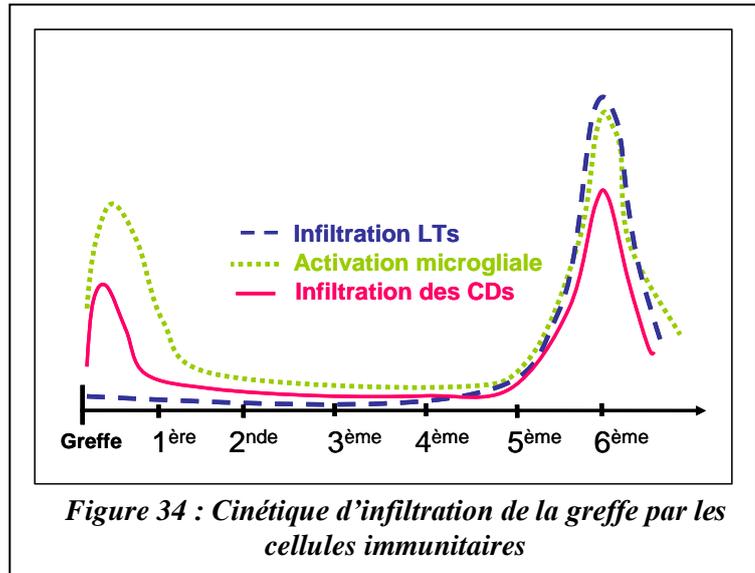


Figure 34 : Cinétique d'infiltration de la greffe par les cellules immunitaires

Cependant, la voie de migration des CD du cerveau vers les ganglions pose encore de nombreuses questions. Plusieurs voies de migrations sont aujourd'hui avancées: d'une part, à travers la BHE pour atteindre la circulation sanguine. Cette hypothèse est née de la mise en évidence de la présence de ligands aux chimiokines sur la BHE, suggérant que le guidage initial des CD matures pourrait être médié par les cellules endothéliales cérébrales (Alt et al., 2002). D'autre part, la rupture de la BHE probablement occasionnée lors du geste chirurgical ouvre une autre possibilité d'accès direct du parenchyme vers le sang périphérique. Toutefois, il est également probable que les CD puissent empreinter la voie de migration le long des nerfs craniaux qui permet un drainage direct du parenchyme vers les ganglions cervicaux via le LCR. En effet, il a été montré que suite à une xéngreffe de neuroblastes porcins dans le striatum de rat, la population lymphocytaire des ganglions cervicaux profonds et celle infiltrant le parenchyme cérébrale au moment du rejet présentaient des modifications de leur récepteur (TCR) caractéristiques de l'activation des LT (Melchior et al., 2005). En revanche, aucune altération du TCR n'a été observée dans les populations lymphocytaires de la rate et du sang suggérant que les LT présents dans les ganglions cervicaux pourraient jouer un rôle important dans le rejet d'une xéngreffe intracérébrale. Dès lors, il est possible que les CD localisées précocement dans les greffons puissent migrer le long des nerfs craniaux pour atteindre directement les ganglions cervicaux.

### L'initiation de la réponse T par les CD

La faculté des CD à migrer hors du SNC vers les ganglions lymphatiques, associée à leur phénotype CMH II<sup>+</sup>, leur confère la capacité de présenter les xénoantigènes aux cellules T naïves CD4<sup>+</sup>. Ces dernières sont les principales responsables du rejet puisque, d'une part, la

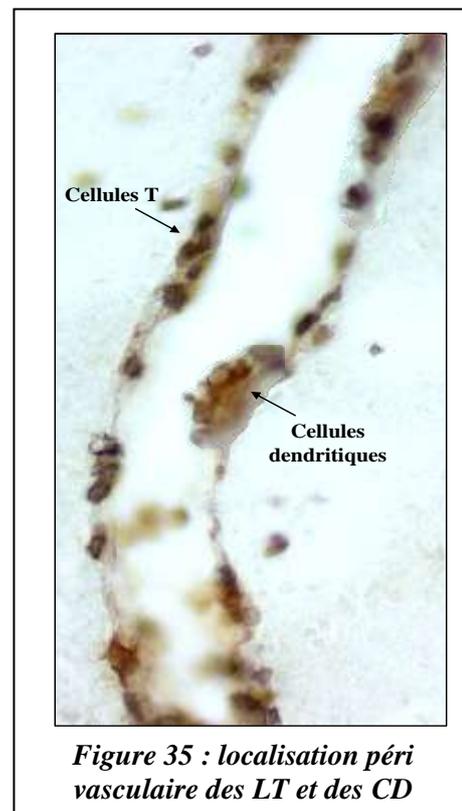
déplétion de l'hôte en cellules CD4<sup>+</sup> induit une survie à long terme dans des modèles de xéno greffes concordantes et discordantes (Wood et al., 1996; Duan et al., 2002). D'autre part, cette population CD4<sup>+</sup> correspond à une large majorité des cellules T infiltrantes (72%) dans notre modèle.

Par ailleurs, le phénotype CD4<sup>+</sup> des CD renforce leur rôle potentiel d'activateurs de la réponse T périphérique puisqu'il a été montré que les CD CD4<sup>+</sup> induisaient une forte prolifération ainsi que la différenciation Th1/Th2 des cellules T CD4<sup>+</sup> et la différenciation Tc1 des cellules T CD8<sup>+</sup> (Liu et al., 1998). Pourtant, contrairement aux CD CD4<sup>-</sup>, les CD4<sup>+</sup> produisent peu ou pas d'IL-12. En revanche, elles induisent la libération d'IL-13, d'INF- $\gamma$  et d'IL-2 par les cellules T CD4<sup>+</sup>, suggérant une capacité d'initiation de la réponse Th1 indépendante de l'IL-12.

Il a été précédemment montré que les CD CD4<sup>+</sup> correspondent à une population hétérogène sur le plan morphologique et phénotypique qui circule des différents tissus vers les ganglions lymphatiques ou la rate. Il semblerait également qu'à l'instar des autres populations de CD, l'apparition du phénotype CD4<sup>+</sup>, dépendrait davantage des conditions environnementales de la CD que d'une programmation initiale de la cellule (Voisine et al., 2002; Shortman and Naik, 2007).

### **Le rôle tardif des CD**

De la même façon que dans les organes périphériques, la présentation antigénique par les CD émigrantes du SNC est suffisante pour induire l'expression de molécules d'adhésion sur la surface des cellules T, leur activation et leur accumulation dans le SNC. Néanmoins, il semble que les CD pénètrent dans le SNC avec les cellules T activées comme en témoigne la forte corrélation observée entre les deux types de cellules. Leur localisation péri-vasculaire autour des néo vaisseaux qui apparaissent au moment du rejet dans le striatum conforte cette hypothèse (Fig. 35).



Néanmoins, on ne sait pas si les CD migrent simultanément aux LT depuis les ganglions ou si elles ont une origine tardive. En effet, d'une part il a été rapporté que les CD pouvaient diriger les cellules T qu'elles activent vers leur organe d'origine (Mora et al., 2003), d'autre part, il a été montré que dans des conditions inflammatoires, le nombre de CD dans le LCR pouvait être largement accru (Pashenkov et al., 2001; Pashenkov et al., 2002). Cette augmentation aurait pour origine les précurseurs monocytaires circulant dans les espaces périvasculaires et qui sous l'influence de stimuli inflammatoires pourraient acquérir le phénotype de CD (Aloisi et al., 2000). On ne peut donc exclure la possibilité d'un recrutement locale des CD.

Par ailleurs, il a récemment été rapporté que les CD sont capables de franchir la BHE via le développement de nombreux filopodes sans perturber l'intégrité de la barrière suggérant que la monocouche de cellules endothéliales cérébrales reste intacte pendant leur migration (Zozulya et al., 2007). Kouwenhoven et ses collaborateurs ont également montré que les CD immatures et matures expriment, produisent et secrètent des métalloprotéinases matricielles (MMP) fonctionnelles ainsi que des inhibiteurs de ces MMP (Kouwenhoven et al., 2001; Kouwenhoven et al., 2002). L'expression des MMP et de leurs inhibiteurs par les CD suggère qu'elles peuvent utiliser ces protéases pour altérer l'occludine (protéine des jonctions serrées) et traverser les microvaisseaux cérébraux (Rescigno et al., 2001; Osman et al., 2002).

La migration simultanée des CD et des cellules T, le phénotype CMH II des CD infiltrantes tardives ainsi que la grande proximité entre les deux types cellulaires observée à de nombreuses reprises dans le striatum greffé, suggèrent la restimulation locale des cellules T par les CD. En effet, il est postulé que les cellules T entrant dans le SNC, doivent rencontrer à nouveau leur antigène pour être restimulées. Par ailleurs, il a été récemment observé que le processus migratoire des CD à travers la BHE pouvait induire la sur régulation des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 sur les CD (Zozulya et al., 2007) renforçant l'hypothèse d'une restimulation locale des cellules T.

Dans le système immunitaire périphérique, les CD correspondent à des cellules sentinelles de l'immunité innée qui peuvent également assurer la liaison entre l'immunité innée et adaptative en raison de leur capacité exclusive à activer les cellules T naïves. Finalement, notre étude associée à d'autres, confirme que les CD sont responsables de la présentation antigénique dérivant du SNC de la même façon que dans les autres organes.

*TRAVAIL DE THESE :*

*Troisième partie*

L'étude des caractéristiques cellulaires du processus de rejet d'une xéno greffe intracérébrale de neuroblastes porcins a fourni certaines connaissances nouvelles sur les réponses immunitaires dans le SNC. Or, plusieurs auteurs ont montré que la composition cellulaire de la suspension transplantée pouvait altérer le profil de rejet (Bartlett et al., 1990; Shinoda et al., 1996a; Belkadi et al., 1997; Litchfield et al., 1997; Remy et al., 2001). Dans le cas de xéno greffes porcines, par exemple, les mécanismes de rejet de neuroblastes fœtaux et de cellules endothéliales aortiques porcines paraissent différents (Remy et al., 2001). De même, Widner et ses collaborateurs ont montré que la présence de cellules immunogènes parmi les neuroblastes favorisait le rejet de ceux-ci même dans le cas d'allotransplantation (Duan et al., 1997). Dans ce contexte, par leur capacité proliférative et leur immunogénicité réduite rapportée par certains auteurs (Odeberg et al., 2005; Wang et al., 2006), les cellules souches représentent une source de cellules à fort potentiel thérapeutique. Aussi, nous avons entrepris de réaliser une étude comparative entre des greffes de neuroblastes (NBp) ou de précurseurs neuronaux (PNp) porcins.

## TROISIEME PUBLICATION

*“Comparison of porcine neuroblasts and neural precursor cells xenografts into the rat striatum”*

*Delphine Michel, Véronique Nerrière-Daguin, Philippe Brachet, Isabelle Neveu and Philippe Naveilhan.*

*(En préparation)*

Delphine Michel, Véronique Nerrière-Daguin, Philippe Brachet, Isabelle Neveu and Philippe Naveilhan.

INSERM U643, Nantes, France.

ITERT, Nantes, France.

University of Nantes, UFR of Medicine, Nantes, France.

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

## *Abstract*

Intracerebral xenotransplantation of porcine fetal neurons (pNBs) is an interesting alternative to the use of human neurons for the treatment of neurodegenerative diseases. However, pNBs are systematically rejected, even in an immunoprivileged site such as the brain. In this context, neural precursor cells (NPC) which were suggested to exhibit low immunogenicity appear as an interesting source of xenogeneic cells. So, to determine whether the use of pNPCs may have any advantage over the use of pNBs in xenotransplantation, the two types of cells were grafted into the striatum of non-immunosuppressed rats. Animals were then sacrificed at 8, 28, 42 and 63 days post-surgery to evaluate graft survival and to compare the immune response induced by pNBs and pNPCs. The analyses revealed a longer survival of pNPC grafts as compared to pNB transplants. Indeed, 40 % of pNPCs grafted rats exhibit a healthy graft at D63 whereas all pNBs grafts were rejected at this time point. Interestingly, in the surviving grafts, we did not observe any sign of inflammation as indicated by the absence of ED1 staining or any presence of T lymphocytes infiltration as revealed by the absence of R7.3<sup>+</sup> cells. Furthermore, at the different time points analysed, R7.3<sup>+</sup> cells were only found in two out of 22 pNPCs grafted rats whereas T cells were almost systematically found in pNB transplanted animals. These data suggest a difference in the immune response following intracerebral xenotransplantation of pNPCs and pNBs. Comparison of tyrosine hydroxylase staining revealed another striking difference between the two groups. Indeed, a large number of TH<sup>+</sup> fibres were observed in pNPC grafts whereas only few TH<sup>+</sup> cells with short process were detected in pNB grafts. These observations raise the possibility that pNPC exert neurotrophic effects on host dopaminergic neurons. Taken together, our data suggest that pNPC may have several advantages over the use of pNBs for restorative strategies based on the transplantation of xenogeneic cells.

## ***Introduction***

Cell replacement is a promising strategy to restore cell function in the human central nervous system (CNS). In patients affected by the Parkinson's disease (PD), a diminution of the motor deficits was observed after the transplantation of human fetal mesencephalic neurons (Lindvall et al., 1989; Lindvall et al., 1990). However, cells derived from the mesencephalon of five or more embryos have to be grafted in the striatum to get a functional effect, raising logistical and ethical problems. So, alternative sources of cells have to be found, and among them, cells derived from pig embryos are of great interest (Isacson et al., 1995; Isacson and Deacon, 1996). Porcine xenograft reveal that fetal pig neural cells survive and emit axons in the human brain ((Pakzaban and Isacson, 1994; Deacon et al., 1997; Fink et al., 2000), but the xenogeneic neurons are systematically rejected (Deacon et al., 1997) despite the brain is considered as an immunologically privileged site (Barker and Billingham, 1977). Graft rejection could be delayed using immunosuppressors such as cyclosporine A but xenogeneic neurons are finally rejected and the cyclosporine A at the doses required to inhibit the rejection of intracerebral xenograft has strong secondary effects (Rezzani, 2006). Stem cells has been suggested to have a low immunogenicity (Odeberg et al., 2005; Wang et al., 2006). So, in the present paper, we analysed whether neural stem/precursor cells (pNPCs) isolated from pig fetal brains and expanded in vitro survive longer than neuroblasts (pNBs) freshly isolated from fetal pig mesencephalon, following their transplantation into the striatum of an adult rat.

## ***Materials and methods***

### ***Preparation of porcine neural cells***

Porcine foetuses were obtained from domestic Large White pigs 28 days after artificial insemination. Animals were obtained from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Nouzilly, France) and sacrificed in the institute's accredited slaughterhouse. Foetuses were collected in Hank's balanced salt solution (HBSS; GibcoBRL) after hysterectomy. Embryos were then washed and tissues were dissected out of the developing brain.

*Preparation of porcine mesencephalic neuroblasts.* Ventral mesencephalons were collected and conserved into a hibernation medium at 4°C for up to 3 days. Just before cell grafting, porcine neuroblasts (pNBs) were prepared as previously described (Remy et al., 2001) and the cell suspension was adjusted to a concentration of approximately  $2 \times 10^5$  cells/ $\mu$ l.

*Preparation of neural stem/precursor cells (pNPCs).* pNPCs were prepared as rat NPC (Sergent-Tanguy et al., 2006). Cortical tissues were dissected, freed of meninges and incubated in 0,25% of trypsin for 15 min at 37°C. After addition of 10% fetal calf serum (FCS), tissues were exposed to 10  $\mu$ g/ml of DNase I for 10 min before mechanical trituration. Aggregates were removed by decantation and cells were further purified of small debris by centrifugation. Cells were resuspended and plated for one night in medium composed of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/ Ham's F12 (1/1, v/v), 33 mM glucose, 5 mM HEPES (pH 7.2), 5  $\mu$ g/ml streptomycine, 5 UI/ml penicillin and supplemented with 10% FCS (serum-supplemented medium). The next day, the floating cells were recovered, washed and resuspended in a serum-free medium supplemented with N2 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The cells were then plated in uncoated dishes and expanded as neurospheres for 10 days in presence of 25 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF-2).

To analyse the fate of pNPCs *in vitro*, the neurospheres were collected, transferred to poly-L-ornithine-coated (PORN) dishes and incubated in serum-supplemented medium for one night. The next day, the medium was changed and the cells were grown for 7 days in N2-supplemented medium. To analyse the survival and the fate of pNPCs *in vivo*, the neurospheres mechanically dissociated and the cell suspension was adjusted to a concentration of approximately  $2 \times 10^5$  cells/ $\mu$ l.

### ***Transplantation of porcine neural cells***

The transplantation was performed as previously described (Remy et al., 2001; Melchior et al., 2002). Male Lewis 1A rats weighting around 250 g were purchased from Janvier CERJ (Rouen, France). The animals were manipulated in compliance with the ethical rules and guidelines of our institute. Anaesthesia was performed with an intramuscular injection of 2% Rompun and 50 mg/ml ketamine (1.6 ml/kg) (PanPharma, Fougères, France). Deeply anesthetized rats were the placed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). After partial skull removal, pNBs or pNPCs were transplanted unilaterally at the following coordinates according to the Bregma: anterior, +0.7 mm; lateral, -2.8 mm; ventral, -5.4 mm and -5.8 mm; incisor bar, -3.3 mm. In both type of grafts,  $4 \times 10^5$  cells (2 $\mu$ l) were transplanted using a Hamilton syringe placed on an automated microinjector (Phymed, Paris, France) over a time period of 1 min. The needle was then left in place for a further 4 min before being slowly withdrawn.

### ***Minocycline treatment***

Minocycline (Zacnan, Merck) is dissolved in water and orally dispensed to the rats as follow. Two days before and after cell grafting, the animals receive a dose of 50 mg/kg of minocycline dispensed twice a day and then, administered once a day for the next 8 days.

Subsequently, the treatment was reduced down to 25 mg/kg and was administrated once a day until the date of sacrifice (Ekdahl et al., 2003).

### ***Immunocytochemistry***

#### *Immunocytochemistry*

Cells were washed and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (PFA 4%) during 15 min. Then, after washing with phosphate-buffered saline (PBS), cells were incubated for 30 min at room temperature (RT) in 1X PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 0.1% Triton and 10% normal goat serum (NGS). The cells were subsequently exposed overnight at 4°C to primary antibodies. Porcine neurons were stained with a monoclonal antibody (mAb) that specifically recognized the 70 kDa pig neurofilament protein NF70 (clone DP5; diluted 1:500; Université Paris 7, France). Astrocytes were labelled with a mAb raised against the glial fibrillary acidic protein (GFAP) diluted 1:800 (Sigma-Aldrich). The anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (1:1000; Pel Freeze, Rogers, Ark, USA) was used to characterize dopaminergic neurons. After washing, cells were incubated for 1h at RT with fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse IgG or FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:500; Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, United Kingdom) diluted in PBS-4% BSA.

#### *Immunohistochemistry*

At 8, 28, 42 and 63 days post-surgery, animals were anesthetized with intraperitoneal injection of 2% Rompun and 50 mg/ml ketamine (3.2 ml/kg) before transcardiac perfusion with 200 ml of 0.9% NaCl, followed by 200 ml of cold 4% PFA. The brains were then removed from the skull and cryoprotected in 2 successive solutions of 15% (24h) and 30% sucrose until the brains sink to the bottom of the pot (48h). Brains were then frozen in cold

isopentane and stored at -80°C. Sections of 20 µm were performed using a cryostat (Leica) and the slides were stored at -80°C.

Immunohistochemistry was performed as previously described (Michel et al., 2006). After neutralization of endogenous peroxidase with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 10 min, slides were incubated 45 min in 10% NGS diluted in PBS-4% BSA. Then, primary antibodies were deposited for one night at 4°C. Porcine neurons were detected using the antibody raised against the porcine NF70 (clone DP5). The dopaminergic neurons were analysed using the anti-TH antibody (Pel Freeze). Reactive astrocytes were stained with the anti-nestin mAb (rat 401; diluted 1: 500; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA). Immune cells were labelled with mAbs obtained from the European Collection of Cell Culture (ECCC, Salisbury, UK). ED1 and R7.3 was used to detect macrophages/activated microglia and T lymphocytes, respectively. After washing, slides were incubated for 1h at RT with biotinylated anti-mouse or anti-rabbit Abs. Sections were then washed and exposed to avidin-biotinylated-peroxidase complex for 1h. The revelation was performed using Vector very intense purple (VIP, Vector ABC kit) as substrat. After several washes in distilled water, slides were dehydrated and mounted with Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France). Double labelling was performed as described above except that the first immunostaining was revealed with diaminobenzidine (DAB, Vector) and NiCl (black staining) while the second immunostaining was revealed only with DAB (brown staining). Brains sections were observed using an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss).

#### *Semi-quantitative histological scale*

ED1 and R7.3 immunostaining was evaluated using a semi-quantitative scale described and modified from Armstrong and al. (2001). Briefly, histological criteria were divided as followed: **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 a perivascular distribution; **4**, intense immunostaining inside the graft and in a large part of the grafted striatum; **5**, only a scar remained with occasional immunopositive cells.

## **Results**

### *Analyses of the fate of pNPCs in vitro*

Cells isolated from the forebrain of G28 porcine embryos were grown with 25 ng/ml bFGF in uncoated plates for 10 days, giving rise to floating neurospheres (Fig. 1a). To analyse the fate of cells in differentiating conditions, the neurospheres were transferred into poly-ornithine coated plate and cultured in defined medium without bFGF for 7 days. Characterization of the cells by immunocytochemistry indicated that a large majority of the cells present in the neurospheres were immunopositive for the porcine neurofilament subunit NF70 (NF70<sup>+</sup> cells) expressed by pig neurons (Fig 1b) and for the glial fibrillary acidic protein (GFAP<sup>+</sup> cells) expressed by astroglial cells (Fig. 1 c). TH<sup>+</sup> cells were occasionally detected (Fig. 1d).

### *Comparison of pNBs and pNPCs survival in case of intracerebral xenotransplantation*

pNBs freshly isolated from the ventral mesencephalon of G28 porcine embryos or pNPCs isolated from G28 porcine forebrain and grown for 10 days in presence of bFGF, were transplanted into intact rat striatum. The rats were sacrificed at days 8, 28, 42 and 63 post-grafting (D8, D28, D42 and D63) to analyse survival of these two types of cells in case of intracerebral xenotransplantation. Over time, we observed an increase in the volume of grafts. This was observed in both cases but as shown in the figure 2, the increase in size occurred earlier in case of pNBs grafting (Fig. 2a-c) as compared to pNPCs transplantation (Fig. 2e-h). To evaluate cell survival of porcine neurons, we used a specific antibody directed against porcine NF70, a neurofilament subunit expressed by most differentiated neurons. Immunohistochemistry analyses of pNB grafts indicate the presence of numerous NF70<sup>+</sup> cells by D8 post-grafting (Fig. 2a). At D28 and D42, a dense network of NF70<sup>+</sup> fibres was observed in non-rejected graft (Fig. 2b and 2c). In contrast, very few NF70<sup>+</sup> cell bodies were detected in pNPC transplants at D8. The NF70<sup>+</sup> cells were scattered throughout the graft and

did not extend process (Fig. 2e and insert). At later time-points such as D28 or D42, some NF70<sup>+</sup> fibres were observed (Figs. 2 f-g) but it is mainly at D63, that an heavy network of NF70<sup>+</sup> fibres invade the graft (Fig 2h).

Since NF70<sup>+</sup> fibers were observed in all the healthy pNPCs and pNBs grafts at day 28, the percentage of graft survival was estimated by counting the number of graft exhibiting NF70<sup>+</sup> cells. The results were reported on a graph in figure 2i. At D28 and D42, NF70<sup>+</sup> cells were not detected in 20% and 60 % of the rats grafted with pNBs, respectively. At the same time-points, 100% and 70% of the rats transplanted with pNPCs still exhibited NF70<sup>+</sup> graft. At D63, there was no more NF70<sup>+</sup> cells in the striatum of rats grafted with pNBs while porcine neurons were still observed in 4 out of ten rats transplanted with pNPCs. At this stage, the difference in graft survival between the two groups was statically significant ( $P < 0,05$ ).

As a first attempt to characterise the phenotype of porcine neurons, we analysed the presence of TH<sup>+</sup> neurons inside the grafts. TH<sup>+</sup> staining was present at D28 in the striatum of rats transplanted with pNBs or pNPCs. Major differences in the staining profiles were observed. In case of pNB transplant, TH<sup>+</sup> neurons were mostly observed at the periphery of the graft (Fig. 3a). The cells exhibited a characteristic neuronal morphology and the cell bodies were clearly observed inside the graft (Fig. 3c). In case of pNPC transplant, TH<sup>+</sup> fibres were present inside the graft (Fig. 3b) but we were not able to detect any TH<sup>+</sup> cell body within or outside the graft, at any time-points. In fact, the TH<sup>+</sup> fibres that were present in the graft seemed to come from the striatum (Fig. 3d). This may explain why TH<sup>+</sup> fibers were mostly observed at the periphery of the graft at D28 while the whole graft were invaded by a dense network of TH<sup>+</sup> fibres at D63 (Fig. 3b).

#### *Characterization of the inflammatory and immune responses*

In case of inflammatory reaction in the brain, immune cells are activated but neural cells such as astroglial cells also become reactive. To evaluate the impact of pNBs or pNPCs

grafting on rat astrocytes, we analysed the expression of nestin known to be expressed in reactive astroglial cells. For this purpose, we used the rat 401 antibody which recognises the nestin derived from rat but from pig (Fig. 4). In the rats grafted with pNBs, nestin immunostaining was undetectable in the host striatum as long as the graft was not rejected. Only a limited number of nestin<sup>+</sup> cells was found inside the graft (Fig. 4d). In contrast, a strong nestin staining was observed in the whole striatum and in the graft as the rejection occurred (Fig. 4e). The staining has almost completely disappeared when the scar has replaced the graft (Fig. 4f). In the rats grafted with pNPC, nestin<sup>+</sup> cells were present within the graft at D28 (Fig. 4a), however, their number strongly decreased at later time-points and almost no immunopositive cells were observed at D42 and D63 (Fig. 4b, c). In animals rejecting their graft, a strong immunostaining for nestin was found all over the grafted striatum and inside the graft as in the case of pNBs (data not shown).

In case of intracerebral grafting, the microglial cells/macrophages are strongly activated after the surgery and at the moment of cell rejection. To compare activation of these cells following the transplantation of pNBs and pNPCs, ED1 immunostaining was performed (Fig. 5). At early time-points such as D8, ED1 staining was very strong in rats grafted with pNPCs (Fig. 5a) as we previously observed in pNB graft (data not shown). Then, we observed a diminution in the staining intensity and the ED1<sup>+</sup> cells were mostly observed at the periphery of the graft at D28 (Fig. 5b). In pNPCs grafted rats that did not reject their transplant, ED1 labelling further decreased becoming very weak at D42 and being almost undetectable at D63 (n = 4/10; Fig 5c and 5d). In contrast, a strong increase in ED1 staining was observed in the grafted striatum of rats rejecting the pNPCs (Fig. 5e) and some ED1<sup>+</sup> cells were still observed in the scar at D63 (Fig. 5f) as observed in case of pNB graft.

All the studies performed on intracerebral xenotransplantation suggest a main role of T cells in the rejection of pNBs. So, we examined T cell infiltration following the transplantation of

pNBs and pNPCs in rat striatum. At early time-points such as D8, T cells were rarely detected in the grafted striatum whatever was the cell type transplanted. In contrast, at later time-points such as D28 or D42 a massive infiltration of R7.3<sup>+</sup> cells was observed in numerous pNBs grafted rats (Fig. 6b). This massive invasion of the graft by T cells is strongly correlated to the rejection of the graft and at D63, only a scar with few R7.3<sup>+</sup> cells persisted (Fig. 6d). The presence of T cells in the striatum of pNPC grafted rats was rarer at D42 (Fig. 6a) and D63 (Fig. 6c). Indeed, we did not detect R7.3<sup>+</sup> cells in most pNPC grafted rats at day 28, 42 and 63 post-grafting (Fig. 6e). R7.3<sup>+</sup> cells were only found in two animals. The T cells were observed in one rat at D42 while its graft was undergoing rejection. In the second rat, T cells were detected at D63 while the graft was almost rejected. (Fig. 6e). A double labelling CD8 $\beta$ /R7.3 indicated that these R7.3<sup>+</sup> cells correspond to both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 6f).

As previously suggested (Michel et al., 2006), dendritic cells may have a major role in the rejection process by inducing a specific T cell response against xenoantigens and by restimulating T cells locally following their infiltration into the brain. So, we examined the presence of dendritic cells in the grafted striatum using Ox62 antibody. As previously described for pNBs, few dendritic cells were already present at D8 after pNPC transplantation (data not shown).

#### *Effect of the minocycline on the survival of pNPC grafts*

As treatment of the rats with minocycline delayed the rejection of pNBs (manuscript n°1), we examined whether the administration of this tetracycline derivative extend graft survival in case of xenotransplantation with pNPCs. 25 adults rats were treated with the drug as described in the Materials and Methods and pNPCs were grafted into their striatum. In contrast to what has been observed for pNBs, the analyses did not reveal a longer graft

survival in treated rats as shown by the number of NF70<sup>+</sup> graft that did not vary significantly from the control group (Fig 7).

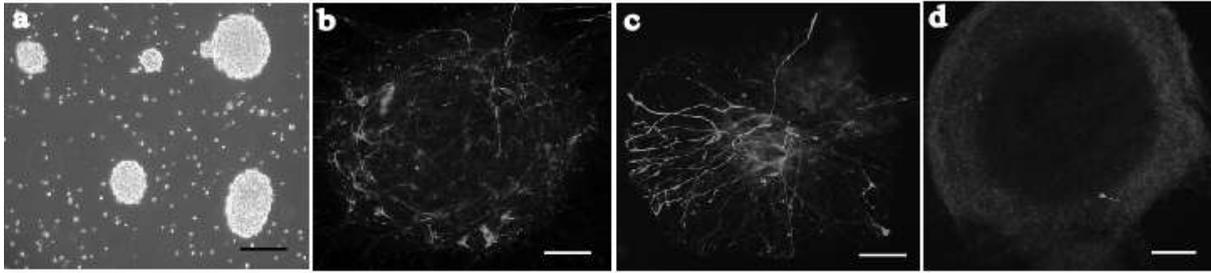
## *Discussion*

In this study, we showed that cortex-derived pNPCs survived longer than pNBs isolated from the ventral mesencephalon, following their transplantation into the striatum of non immunosuppressed rats. Analyses of the immune response reveal a lower frequency of T cell infiltration into the striatum of pNPCs grafted rats since R7.3<sup>+</sup> cells were only detected in two of these rats. This contrast with the large number of rats presenting T cell infiltration at 28 and 42 days following pNBs grafting (Mason et al., 1986; Barker et al., 2000; Remy et al., 2001; Melchior et al., 2002; Michel et al., 2006). As the same type of cellular response is observed in pNB grafted rats and in two of the pNPC transplanted animals, pNBs and pNPCs may induce the same immune response. In such case, additional time-points between day 42 and day 63 may reveal the presence of T cells in a larger number of pNPC. However, we clearly observed a delay in the rejection of pNPC as 4 animals out of 10 exhibited a healthy graft at day 63 post-grafting without any sign of inflammation. Indeed, ED1 staining indicates an absence of residual inflammatory reaction which was always observed at the site of pNB graft, even before the starting of rejection process. Taken together, these observations suggest differences in the immune response induced by NBs and NPC. In support of this hypothesis, Armstrong et al., show an absence of humoral response following intraperitoneal injection of pNPC while pNB do so (Armstrong et al., 2001). In addition, we showed administration of minocycline clearly extends graft survival in case of pNBs grafting (manuscript n°1) while the treatment has no effect on pNPCs transplant. Further studies will be necessary to clearly define the differences in the immune response induced by pNBs and pNPCs in case of intracerebral xenotransplantation. In particular, it would be interesting to find out whether the longer survival of pNPC graft in 40% of the rats is due to a lower amount of immunogenic molecules in the cell suspension or to an active tolerogenic or immunosuppressive action of the pNPCs. On the other hand, longer time-points than day 63 should be analysed to

determine whether some grafted NPCs might be tolerated in the brain in case of xenotransplantation or if the rejection of NPCs will systematically occur and is only delayed as compared to NBs.

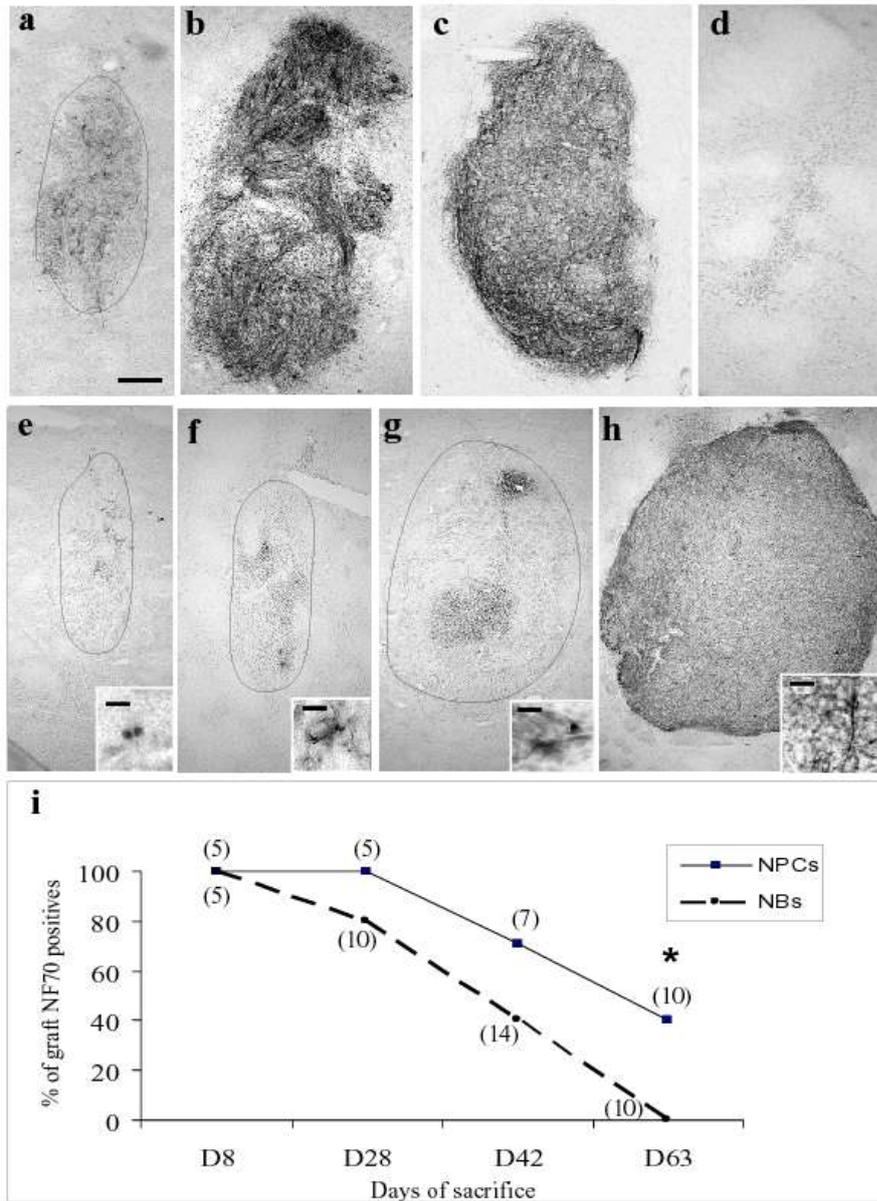
So, our results highlight the fact that pNPCs as a cellular source for xenotransplantation may have interesting advantages as compared to pNBs, in particular in term of graft survival. They also draw attention to several interesting points. First, there was clearly a delay in the differentiation of pNPCs as compared to pNBs. Indeed, the neuronal network as revealed by NF70 staining was very weak in pNPCs grafted rats up to 42 days post-grafting while a huge amount of numerous NF70<sup>+</sup> fibres were observed in pNBs grafted rats as soon as day 28. This difference is most probably due to the undifferentiated state of the NPC at the time of the grafting. Pretreatment of the cells or particular microenvironment may however favour their differentiation as pNPC grown in bFGF/EGF and grafted in a rat model of Parkinson's disease differentiate earlier (Armstrong et al, 2001). Whatever is the rapidity of NPCs differentiation, the most important thing is the presence of a strong neuronal network inside the graft at day 63 post-grafting. A second interesting point is the invasion of the pNPC graft by numerous TH<sup>+</sup> fibres. Indeed, in pNB grafted rats, few TH<sup>+</sup> cells with short process were observed at the periphery of the transplant while in pNPCs transplanted animals, numerous TH<sup>+</sup> fibres were already present in the graft at day 28, invading almost the entire graft at late time point such as day 63. The low number of TH<sup>+</sup> cells in culture of NPCs and the absence of TH<sup>+</sup> cell bodies in pNPC graft inside the graft raise the question of the origin of these TH<sup>+</sup> fibres. In addition, these fibres appear relatively early and are present in huge number while NF70 staining indicates a late differentiation of the pNPCs in vivo. So, the most probable hypothesis is that the TH<sup>+</sup> fibers come from the host. Double staining using anti-TH and anti-NF70 antibodies were tried but the two antibodies never labelled the same cell, even in cultures of porcine neurons derived from the ventral mesencephalon. Further experiments

will be required to demonstrate the exact provenance of the TH<sup>+</sup> fibres but their absence in 6-OHDA-treated rats grafted with pNPC (Armstrong et al., 2002; Armstrong et al., 2003) is in favour of an host origin. Indeed, the injection of 6-OHDA induces the death of host dopaminergic neurons. If our hypothesis is confirmed, this would mean that pNPC graft exerts a strong neurotrophic action on host dopaminergic neurons, promoting their axonal outgrowth. This is fully possible as NPCs produce various trophic factors such as BDNF or GDNF (Lu et al., 2003) and in fact, the most surprising point would be that the grafting of pNBs does not have a similar effect on host TH neurons. Further studies are required to explain such discrepancy but whatever is the case, our present data highlight the fact that in addition to the advantage of using pNPCs in term of cell survival, grafting of pNPCs instead of pNBs may also have beneficial effects by promoting neurite outgrowth from surviving host dopaminergic neurons.

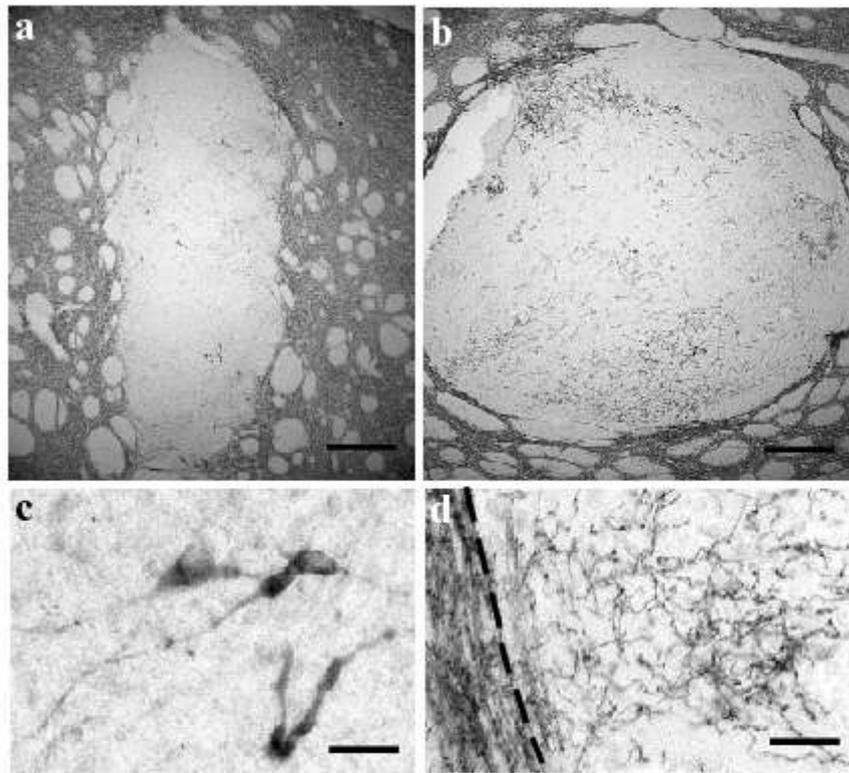


**Fig. 1: Analyse of the fate of pNPC in vitro.**

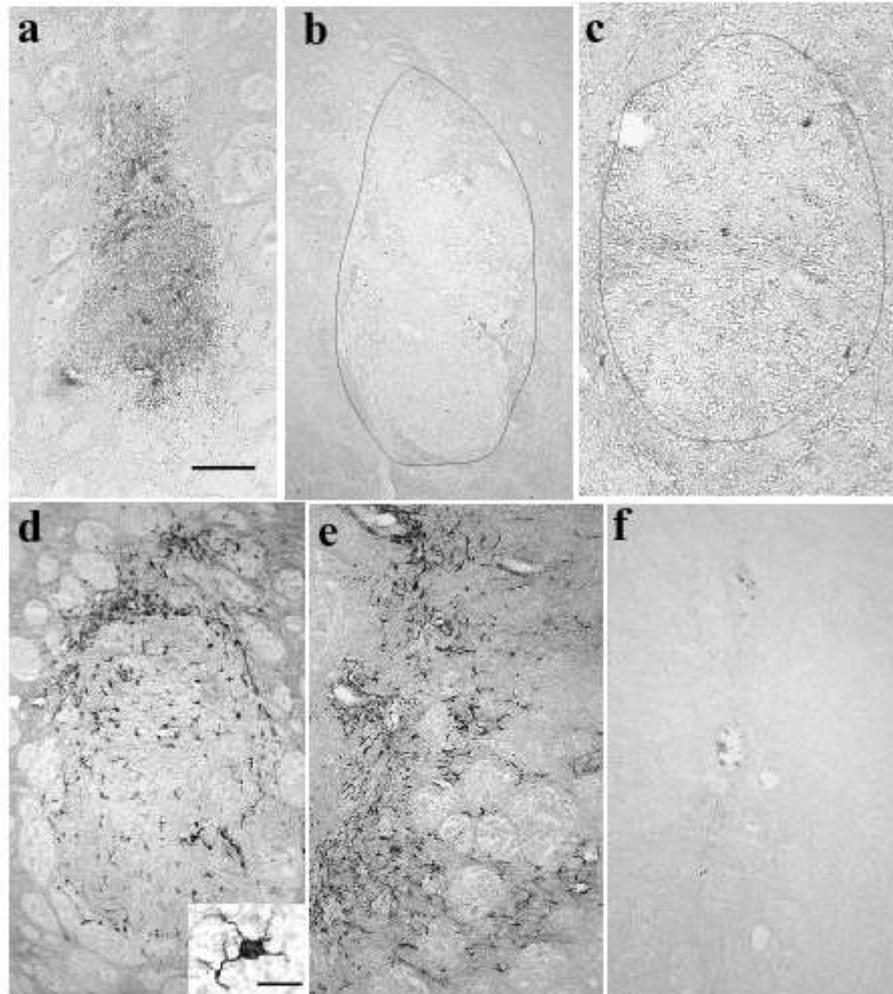
*(a) pNPC grown in N2-defined medium supplemented with bFGF proliferate as neurospheres. (b, c, d) In absence of bFGF and in PORN-coated dishes, pNPC differentiate, giving rise to NF70+ cells (b), to GFAP+ cells (c) and occasionally to TH+ cells (d). Scale bar (a) 25  $\mu\text{m}$ ; (b-d) 80  $\mu\text{m}$ .*



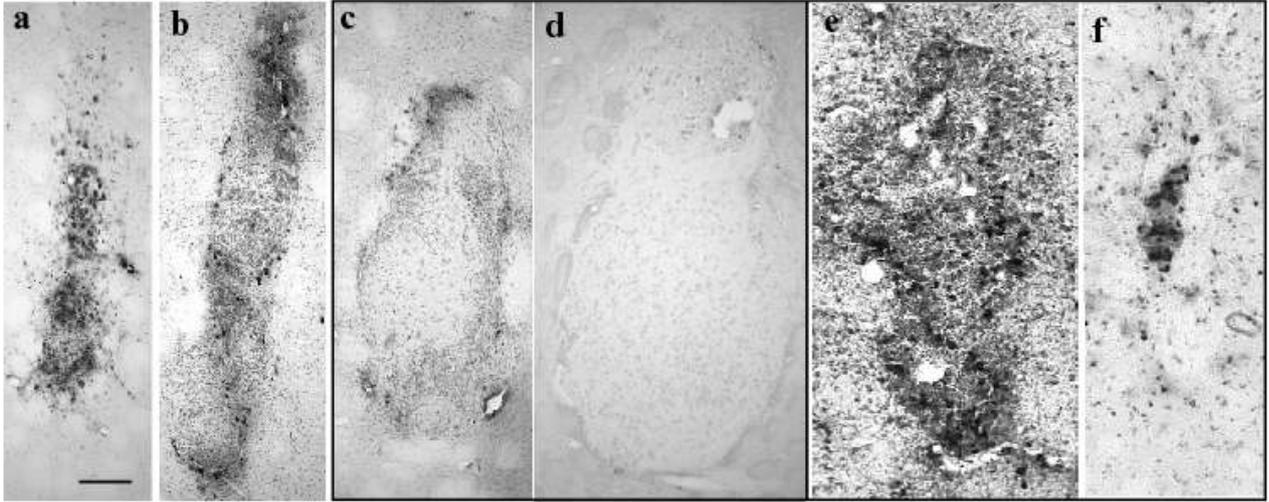
**Fig. 2: Evaluation of pNBs and pNPCs graft survival using NF70 immunostaining**  
 NF70 immunostaining at D8 (**a** and **e**), D28 (**b** and **f**), D42 (**c** and **g**) and D63 (**d** and **h**) in pNBs grafts (**a-d**) and pNPCs grafts (**e-h**). Scale bar 200, insert (**e-g**) 20  $\mu$ m, (**h**) 50  $\mu$ m. (**i**) Percentage of rat displaying NF70 positive graft at the different time points post-transplantation. The number of rats for each group were reported into brackets.



**Fig. 3: TH immunostaining of pNBs and pNPCs grafts.** Striatum of the rats grafted with pNB (a, c) or pNPCs (b, d) were immunostained with anti-TH mAbs. Micrographs of the whole grafts at D63 are presented (a, b) as well as high magnification pictures (c, d). Scale bar (a-b) 170  $\mu\text{m}$ , (c) 15  $\mu\text{m}$ , (d) 70  $\mu\text{m}$ .

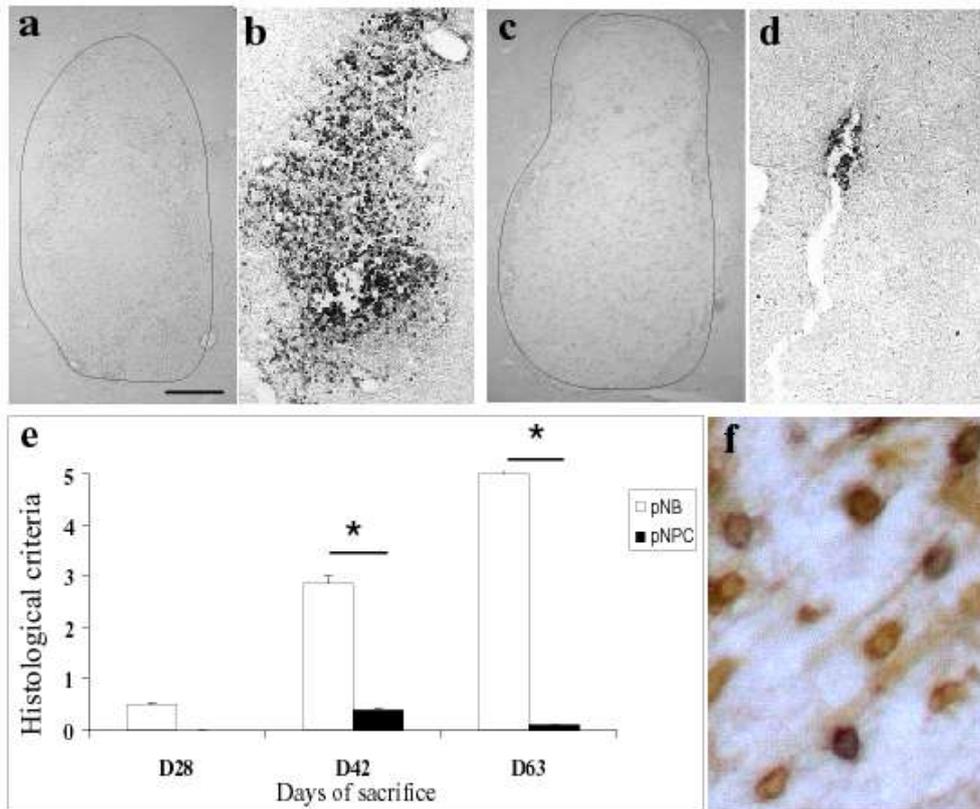


**Fig. 4: Nestin immunostaining in pNPCs and pNBs grafts.**  
*Nestin immunostaining at D28 (a and d), D42 (b and e) and D63 (c and f) in pNPCs (a-c) and pNBs (d-f) grafts. Scale bar (a-f) 130  $\mu$ m; insert 15  $\mu$ m.*



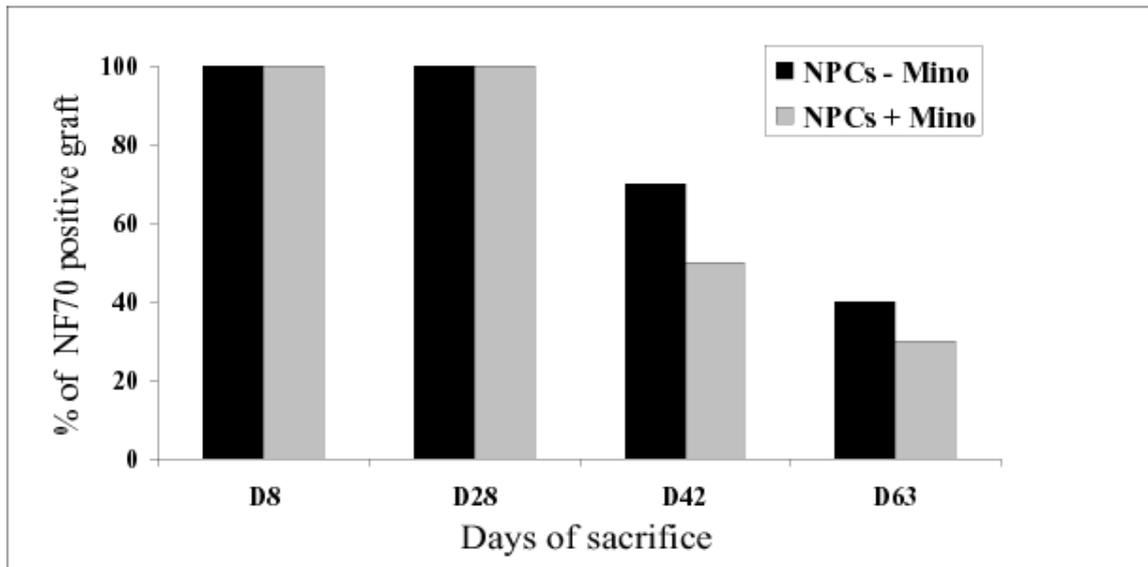
**Figure 5: ED1 immunostaining in pNPC grafts**

ED1 immunostaining at D8 (a), D28 (b), D42 (c and e) and D63 (d and f) in non rejecting (c, d) and in rejecting (e, f) pNPCs grafts. Scale bar 150µm.



**Fig. 6: R7.3 immunostaining in pNBs and pNPCs graft.**

R7.3 immunostaining at D42 (a and b) and D63 (c and d) in pNPCs (a, c) and pNBs (b, d) grafts. Scale bar (a-d) 150  $\mu$ m. (e) R7.3 immunostaining evaluated with a semi quantitative scale based on histological criteria (Armstrong and al., 2001) at each time point of the experiment. (f) Double labelling CD8b (black cells)/R7.3 (brown cells) in pNPCs graft. Scale bar (f) 10  $\mu$ m.



**Figure 7: Minocycline effect on the survival of pNPC grafts.**  
*Percentage of rats displaying NF70 positive graft at the different time points post-transplantation.*

- Armstrong RJ, Tyers P, Jain M, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA (2003) Transplantation of expanded neural precursor cells from the developing pig ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 151:204-217.
- Armstrong RJ, Hurelbrink CB, Tyers P, Ratcliffe EL, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA (2002) The potential for circuit reconstruction by expanded neural precursor cells explored through porcine xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 175:98-111.
- Armstrong RJ, Harrower TP, Hurelbrink CB, McLaughlin M, Ratcliffe EL, Tyers P, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA (2001) Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience* 106:201-216.
- Barker CF, Billingham RE (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25:1-54.
- Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB (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.
- 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.
- Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- 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.
- Isacson O, Deacon TW (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 TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH (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.
- Lindvall O, Rehnström S, Brundin P, Gustavii B, Astedt B, Widner H, Lindholm T, Björklund A, Leenders KL, Rothwell JC, et al. (1989) Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 46:615-631.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247:574-577.
- Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 181:115-129.
- Mason DW, Charlton HM, Jones AJ, Lavy CB, Puklavec M, Simmonds SJ (1986) The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* 19:685-694.
- Melchior B, Remy S, Nerrière-Daguin V, Heslan JM, Soullillou 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, Nerrière-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.

- Odeberg J, Piao JH, Samuelsson EB, Falci S, Akesson E (2005) Low immunogenicity of in vitro-expanded human neural cells despite high MHC expression. *J Neuroimmunol* 161:1-11.
- Pakzaban P, Isacson O (1994) Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience* 62:989-1001.
- 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.
- 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.
- Sergent-Tanguy S, Michel DC, Neveu I, Naveilhan P (2006) Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation. *J Neurosci Res* 83:1515-1524.
- Wang L, Lu XF, Lu YR, Liu J, Gao K, Zeng YZ, Li SF, Li YP, Cheng JQ, Tan WD, Wan L (2006) Immunogenicity and immune modulation of osteogenic differentiated mesenchymal stem cells from Banna minipig inbred line. *Transplant Proc* 38:2267-2269.

L'étude comparative qui a été réalisée a mis en évidence une survie significativement prolongée des greffes de PNp, comparativement aux greffes de NBp après transplantation intrastriatale chez des rats non lésés et non immunosupprimés.

### **La différenciation neuronale des PNp**

L'apparition du phénotype NF70, témoignant de la différenciation neuronale des cellules transplantées, est retardée chez les rats ayant été greffés avec des PNp comparativement à ceux ayant reçu des NBp. De plus, nous avons constaté que les greffes de PNp saines à J63 étaient massives avec un volume bien plus important que celui des greffes de NBp saines à J28. Cette observation suggère que les PNp sont implantés dans un environnement qui leur est favorable. Par ailleurs, il a été rapporté que lors de la transplantation de NBp, de nombreuses cellules mouraient suite au stress opératoire (Barker et al., 1996; Emgard et al., 1999; Remy et al., 2001) alors que les PNp présenteraient une susceptibilité moindre à ce même stress et qu'ils continueraient à proliférer temporairement après leur implantation (Ostenfeld et al., 2000).

La différenciation neuronale des PNp greffés ne fait aucun doute au vue des marquages NF70. Néanmoins, contrairement à ce qui se passe avec des PNp humains ou de rats qui, transplantés dans un cerveau en développement ou dans des régions neurogéniques de cerveau adulte adoptent un phénotype adapté à leur site d'intégration (Snyder et al., 1992; Suhonen et al., 1996; Rosser et al., 2000), il semble que la morphologie des neurones dérivant des PNp soit plus hétérogène (Armstrong et al., 2002). Il a été montré que les PNp dérivant de différentes régions du cerveau en développement étaient équivalents dans leur capacité à adopter un phénotype neuronal. Cependant, l'acquisition du phénotype dopaminergique restait rare même lorsque les PNp étaient issus du mésencéphale ventral (Daadi et al., 1998; Fricker et al., 1999; Armstrong et al., 2003). Cette observation coïncide avec nos résultats in vitro qui indiquent une pauvre différenciation TH<sup>+</sup> des PNp. En revanche, dans les greffes de PNp nous avons remarqué dès J28 la présence de nombreuses fibres TH<sup>+</sup> qui envahissent le greffon. Etant donné les faible taux de différenciation TH<sup>+</sup> recensé in vivo et observé in vitro dans notre étude, il est probable que les fibres qui envahissent la greffe proviennent du striatum de l'hôte. Cette théorie concorde avec la récente mise en évidence, in vitro et in vivo des effets trophiques des cellules souches (Akerud et al., 2001; Lu et al., 2003). En effet, outre leur forte caractéristique proliférative in vitro et leur capacité à générer les principaux types cellulaires du SNC, les PN pourraient également être utilisés comme des outils intéressants pour délivrer des facteurs neurotrophiques tels que le GDNF, le BDNF ou le NGF. Il sera donc important,

pour vérifier ces hypothèses, de démontrer que l'innervation TH<sup>+</sup> qui colonise le greffon est effectivement dérivée de l'hôte et que les PNp sont capables d'exprimer in vivo des gènes spécifiques de facteurs neurotrophiques en particulier le GDNF.

Dans les greffes de NBp, en revanche, les cellules TH<sup>+</sup> ont un phénotype différent avec un corps cellulaire bien visible et situé dans le greffon. Cette observation associée au fait que les neurones dopaminergiques ont leur corps cellulaire dans la SN, suggère que les cellules TH<sup>+</sup> observées dans la greffe sont d'origine porcine.

### **Cas des greffes non rejetées**

Les PNp ont la capacité de survivre plus longtemps que les NBp lorsqu'ils sont transplantés dans le SNC d'un hôte xénogénique. En effet, dans 40% des rats greffés avec des PNp, le greffon est toujours présent 63 jours après l'opération. Par ailleurs, à ce stade, alors que toutes les greffes de NBp sont rejetées, l'analyse des différents composants cellulaires de la réponse immune a révélé l'absence de lymphocytes, de cellules microgliales/macrophages et d'astrocytes activés dans les greffes de PNp non rejetées. Dans ce contexte, plusieurs hypothèses peuvent expliquer la survie prolongée observée.

Dans un premier temps, des analyses réalisées en cytométrie de flux ont révélé que la suspension de PNp n'exprimait pas les molécules du CMH de classe II mais qu'en revanche, dans la suspension de NBp cette molécule était exprimée (Armstrong et al., 2001). Cette absence d'expression du CMH dans la suspension de PNp peut être imputable à 1) une immunogénicité réduite des PNp. En effet, il est possible que les PNp en raison de leur phénotype indifférencié n'expriment pas encore les molécules du CMH. Leur apparition sur les PNp transplantés, de la même façon que l'apparition du phénotype NF70, se trouverait alors retardée par rapport à leur expression dans des greffes de NBp. 2) L'absence de cellules immunogènes dans la suspension de PNp. En effet, il a été montré que dans les suspensions de NB de rat (Shinoda et al., 1996a; Shinoda et al., 1996b) et de porc (Brevig et al., 1999) des composants des lignées atrocytaires et macrophagiques pouvaient être présents. De même, des études réalisées dans notre laboratoire ont révélé que la suspension de neuroblastes transplantée pouvait contenir des cellules endothéliales porcines (Martin et al., 2005). Ainsi, la transplantation intracérébrale, en favorisant la synthèse de cytokines proinflammatoires, induirait l'induction de molécule du CMH sur ces cellules contaminants les tissus donneurs et pourrait ainsi cautionner le processus de rejet. Il est probable que la phase de prolifération in vitro sous forme de neurosphères des PNp favorise la survie des cellules neurales au mépris

des cellules plus immunogènes. La suspension cellulaire transplantée serait alors purifiée de tout « contaminant » potentiellement CMH<sup>+</sup>.

Dès lors, que ce soit la faible immunogénicité des PNp ou l'absence de cellules immunogènes dans la suspension cellulaire ou les deux, la transplantation de PNp semble se caractériser par une diminution et/ou un retard de l'induction des molécules du CMH et par conséquent une absence et/ou un décalage de leur reconnaissance par les cellules immunitaires de l'hôte.

Dans un deuxième temps, on ne peut exclure la possibilité que la survie prolongée observée des greffes de PNp puisse résulter d'une capacité incomplète du système immunitaire de l'hôte à rejeter les cellules transplantées. Il a notamment été montré que les PN issues de la souris ou du rat pouvaient exprimer in vitro des récepteurs aux chimiokines (Tran et al., 2004; Dziembowska et al., 2005) suggérant qu'il pourrait exister des interactions entre les PN et la réponse immune. De plus, il a récemment été rapporté que l'injection systémique de PN dans des modèles murins d'inflammation chronique du SNC était rapidement suivie par leur migration intracérébrale jusqu'au site inflammatoire où ils auraient des effets immunomodulateurs via l'induction de l'apoptose des cellules T, et plus particulièrement des cellules de polarité Th1 (Pluchino et al., 2005). Depuis d'autres études sont venues confirmer des effets immunomodulateurs des PN (Ben-Hur, 2006; Einstein et al., 2006)

### **Cas des greffes rejetées**

Bien que les greffes de PNp survivent significativement plus longtemps que les greffes de NBp, à 63 jours post-greffe, 60% des rats greffés avec des PNp n'ont plus de greffon et ne présentent plus qu'une cicatrice. Or, excepté dans deux cas, l'un à 42 jours et l'autre à 63 jours, les LT demeurent complètement absents du striatum. Cette observation semble suggérer que la réaction de rejet via l'infiltration lymphocytaire suit un processus rapide. Il sera donc nécessaire, pour vérifier cette hypothèse, de réaliser une étude plus restreinte à cette période avec davantage de dates de sacrifice. Toutefois, il est également possible que le rejet des PNp puisse être principalement médié par d'autres composants de la réponse immunitaire. Dès lors, une forte activation des cellules microgliales ayant été observée chez certains rats, il est possible que ces dernières puissent jouer un rôle important via la phagocytose. Néanmoins, les études réalisées avec la minocycline n'ont révélé aucune différence significative entre les rats traités et non traités. Il sera toutefois intéressant d'observer les effets de cet antibiotique sur le plus long terme.

Par ailleurs, Armstrong et son équipe ont pu montrer que de nombreuses immunoglobulines (Ig) et plus particulièrement des IgM, se fixaient sur les cellules à morphologie neuronale et gliale dans les greffes de PNp rejetantes (Armstrong et al., 2001). Cette observation suggère que les anticorps pourraient constituer un élément important de la réponse immune.

# *DISCUSSION/PERSPECTIVES*

## DISCUSSION

Les études réalisées au cours de ce travail de thèse nous ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes intervenants dans le rejet des xénogreffes intracérébrales. Plus particulièrement, la mise en évidence de la présence de cellules dendritiques dès 3 jours après l'intervention, a ouvert de nouvelles perspectives concernant les événements précoces susceptibles d'être à l'origine d'une réponse cellulaire T spécifique. En effet, les cellules dendritiques sont les seules cellules immunitaires connues pour leur capacité à activer des lymphocytes T naïfs. Leur présence au niveau du site de greffe dans les jours qui suivent l'intervention ouvre la possibilité d'un rôle essentiel de ces cellules en tant que CPA pour induire une réponse indirecte dirigée contre les cellules neurales xénogéniques. Les xénoantigènes libérés notamment suite à la mort d'une partie des cellules greffées lors de l'intervention, pourraient être directement phagocytés par les cellules dendritiques présentes dans le parenchyme. Celle-ci migreraient ensuite vers les tissus lymphoïdes pour activer les lymphocytes T naïfs (Bradbury et al., 1981; Harling-Berg et al., 1989; Knopf et al., 1998; Ni et al., 2000). Les xénoantigènes étant susceptibles d'être drainés vers les tissus lymphoïdes périphériques via le LCR, il est également possible que les cellules dendritiques périparenchymateuses, c'est-à-dire celles localisées dans le LCR au niveau des méninges et du plexus choroïde, ou les cellules dendritiques présentes dans les ganglions lymphatiques profonds, participent à la mise en place d'une réponse T spécifique.

Dans le cas où les cellules dendritiques auraient effectivement un rôle essentiel dans la mise en place d'une réponse T spécifique, la minocycline pourrait non seulement intervenir en inhibant directement l'activation des cellules microgliales/macrophages et des lymphocytes T mais également en perturbant l'étape de préparation (ou processing) des antigènes par les cellules dendritiques. En effet, les travaux de Kalish et Koujak indiquent que l'addition de minocycline entraîne une inhibition de la réponse T due à une perturbation du processing de l'antigène par les CPA (Kalish and Koujak, 2004). Cet effet encore très peu connu de ce dérivé de la tétracycline pourrait contribuer à la faible réponse T observée chez les rats greffés traités par la minocycline.

Outre un rôle dans les phases précoces de la réponse immune, les cellules dendritiques pourraient également jouer un rôle critique dans l'étape de rejet. En effet, après leur priming dans les tissus lymphoïdes, les lymphocytes ont besoin d'être restimulés par les CPA pour être pleinement actifs. Or, nous avons effectivement observé que la colonisation de la greffe par les lymphocytes T était corrélée à une invasion du greffon par les cellules

dendritiques. Cette observation ajoutée au fait qu'au sein du striatum greffé, les deux types cellulaires sont très souvent retrouvés à proximité l'un de l'autre et que les cellules dendritiques expriment les molécules de costimulation, rendent tout à fait plausible un rôle essentiel des cellules dendritiques au moment du rejet. Une restimulation locale des LT par les cellules dendritiques pourrait notamment expliquer la rapidité de la réaction de rejet observée après quelques semaines de latence.

A ce propos, il est intéressant de noter que si la réaction de rejet intervient après 5 à 7 semaines de latence lors d'une xéno greffe de NBp, les PNp survivent, quant à eux, significativement plus longtemps. Ces résultats confirment l'importance de la composition cellulaire du greffon sur la réponse immune engendrée. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer cette différence de réponse. D'une part, il semblerait qu'il y ait moins de mortalité cellulaire suite à la transplantation de PN comparativement à une greffe de NB (Ostenfeld et al., 2000). Si tel est le cas, alors une plus grande quantité de xénoantigènes est susceptible d'être libérée en cas de xéno greffes de NBp, engendrant une réaction de rejet plus forte et/ou plus rapide. D'autre part, il est probable que les PNp par leur nature ou leurs caractéristiques phénotypiques, correspondent à des cellules moins immunogènes que les NBp (Armstrong et al., 2001). Enfin, le procédé de préparation des cellules en cas de greffe de NBp et de PNp est très différent. Alors que les NBp sont préparés après une simple dissociation de tissus fœtaux fraîchement prélevés, les PNp sont cultivés pendant 10 jours en présence de FGF-2. Cette étape qui a pour but une amplification du nombre de PNp, permet très certainement l'élimination de nombreuses cellules potentiellement plus immunogènes que les NBp, comme par exemple les cellules microgliales/macrophages ou les cellules endothéliales. De plus, la récente mise en évidence d'effets potentiellement immunomodulateurs, est une nouvelle caractéristique des PN qui pourrait également favoriser leur survie à long terme (Pluchino et al., 2005) ; (Ben-Hur, 2006; Einstein et al., 2006). Ainsi, il est fort possible que l'ensemble de ces particularités contribuent à favoriser la survie des PNp comparativement à des NBp lors de xéno greffes intracérébrales.

## **PERSPECTIVES**

Face à l'évolution de la fréquence de la maladie de Parkinson, la transplantation cellulaire reste aujourd'hui la seule stratégie thérapeutique aspirant à une restauration fonctionnelle. Or, dans le contexte très restrictif de l'allotransplantation en clinique neurologique, l'utilisation de neurones embryonnaires porcins présentent de nombreux avantages si l'on parvient à comprendre et à contrôler la réaction de rejet. Les expériences que j'ai réalisées durant ma thèse nous ont permis de mieux comprendre certains des mécanismes immuns mis en jeu lors d'une xénogreffe neurale dans le cerveau. Elles devraient ainsi ouvrir de nouvelles perspectives pour de futures expériences visant notamment à prolonger la survie de greffes intracérébrales.

### **La minocycline en traitement préventif des maladies neurodégénératives (ou MP)**

L'inflammation qu'elle soit cause ou conséquence de la mort neuronale, semble jouer un rôle important dans la progression de la maladie de Parkinson. Outre ces effets délétères via la libération de molécules telles que les radicaux libres, certaines cytokines comme l'IL-6, peuvent également altérer la neurogénèse dans le SNC in vivo (Monje et al., 2003). Ainsi, une inflammation dans le SNC serait susceptible de provoquer un dysfonctionnement de la neurogénèse qui pourrait alors potentiellement jouer un rôle dans l'apparition de maladies neurodégénératives (telles que la maladie de Parkinson) (Martino and Pluchino, 2006). Or, il a été montré que la minocycline en inhibant l'inflammation, pouvait restaurer cette neurogénèse (Ekdahl et al., 2003). Une inhibition de la réaction inflammatoire et en particulier l'administration de minocycline utilisée dans notre modèle pour atténuer le rejet de xénogreffe, pourrait donc être bénéfique pour les patients atteints de maladie de Parkinson. Des études cliniques réalisées sur des patients pré-parkinsoniens n'ayant encore reçu aucune médication ont effectivement montré des effets bénéfiques d'un traitement par la minocycline (NINDS NET-PD Investigators, 2006). Si ces effets sont confirmés, la minocycline pourrait également être utile pour ralentir le processus neurodégénératif chez des patients présentant un stade plus avancée de la maladie et être administrée avec la L-DOPA.

### **Favoriser la survie des neurones embryonnaires greffés**

La transplantation intracérébrale de neurones embryonnaires est notamment compliquée par le faible taux de survie des cellules implantées. En effet, seules 5 à 10% des cellules greffées survivent aux opérations de prélèvement, de dissociation puis de

transplantation. En effet, ces étapes induisent la production de radicaux libres oxygénés. Or, les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles au stress oxydatif. Aussi, une grande partie de ces derniers ainsi que de nombreux autres neurones présents dans la suspension cellulaire entament un programme d'apoptose après leur transplantation intracérébrale. Ceci a pour conséquence une diminution drastique du nombre de neurones survivant ainsi que la libération de nombreux antigènes susceptibles d'initier une réaction immune de l'hôte. Dès lors, la minocycline par ses propriétés anti-apoptotiques (Stirling et al., 2005) et anti-inflammatoires pourraient constituer un pré-traitement intéressant pour favoriser la survie des neurones lors d'allo- ou de xéno greffe intracérébrale. En effet, elle pourrait d'une part, empêcher l'activation des cellules microgliales et d'autre part, atténuer l'apoptose. Ces actions protectrices pourraient être d'autant plus efficaces si elles étaient associées à un pré-traitement par des facteurs neurotrophiques, tels que le GDNF ou le BDNF (Helt et al., 2001; Hoglinger et al., 2001) qui ont déjà montré leur efficacité, ou encore le MANF (Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor) facteur sécrété par les astrocytes du mésencéphale et dont l'action semble cibler les neurones dopaminergiques (Petrova et al., 2004).

#### **Atténuer la réponse immunitaire en cas de greffe intracérébrale**

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence la présence de cellules dendritiques dans les greffes striatales lors de xénotransplantation de cellules neurales. Leur observation précoce ainsi que leur infiltration dans le striatum, simultanément aux lymphocytes T lors de la réaction de rejet, suggèrent une probable implication de ces cellules dans la réponse immune initiée par la présence de xénoantigènes. Dès lors, les cellules dendritiques correspondent à une nouvelle cible pour tenter de prolonger la survie des greffons et il serait intéressant d'étudier les conséquences d'une inhibition spécifique de ces cellules dendritiques. Or, des études réalisées dans notre laboratoire indiquent que la tolérance d'allogreffe cardiaque chez le rat induite par l'administration de LF15-0195 (un analogue du déoxyspergualine) (Chiffolleau et al., 2002) serait principalement due à l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques. Certaines molécules importantes pour la présentation des antigènes comme les molécules du CMH II et les molécules de costimulation CD40 et CD86 ne serait pas exprimées par les cellules dendritiques en présence de LF15-0195 (Yang et al., 2003). L'administration du LF15-0195 pourrait donc favoriser la présence de cellules dendritiques tolérogènes incapables de présenter les xénoantigènes et d'initier une réponse primaire cellulaire T.

La minocycline en inhibant le processing des antigènes par les cellules dendritiques, l'activation et/ou la migration de différentes cellules immunes comme les cellules microgliales/macrophages ou les lymphocytes T, pourrait être également utile pour prévenir le rejet en cas xéno greffe intracérébrale. La mise en évidence, lors de mon travail de thèse, d'une survie prolongée de neuroblastes porcins greffés chez le rat, confirme les effets bénéfiques de ce dérivé de la tétracycline. Toutefois, à l'heure actuelle, la ciclosporine A reste le principal immunosuppresseur utilisé chez des patients transplantés. Ce dernier, en inhibant spécifiquement la réponse T, a montré son efficacité pour la survie à long terme des greffons (Huffaker et al., 1989; Galpern et al., 1996). Néanmoins, la ciclosporine A favorise la libération de radicaux libres oxygénés pouvant être toxiques pour les reins, le foie ou le cœur (Rezzani, 2006). Elle peut également favoriser l'apparition de l'ostéoporose (Cipriani and Farias, 2005). L'utilisation de ciclosporine, surtout à fortes doses, a donc des effets secondaires alors que la minocycline est quant à elle, bien tolérée en clinique notamment lors de traitement de l'acné juvénile et de l'arthrite rhumatoïde. Cette bonne tolérance associée à son large spectre d'action, encouragent son utilisation. Il serait notamment intéressant d'étudier dans quelle mesure l'administration de minocycline en co-traitement ne permettrait pas de diminuer les doses de ciclosporine à administrer pour prévenir la réaction de rejet.

### **Diminuer l'immunogénicité de la suspension de neuroblastes**

La suspension de neuroblastes porcins constitue une source de xénoantigènes pouvant être reconnus par les cellules immunitaires du rat. Lors de la préparation et de l'implantation de la suspension cellulaire, non seulement les molécules du CMH sont surexprimées mais divers antigènes porcins, tels que l'intégrine  $\beta 1$ , pourraient constituer des éléments très immunogènes pour le système immunitaire du receveur (Martin et al., 2005). Dès lors, la neutralisation de certains xénoantigènes connus pour leur forte immunogénicité pourrait être un moyen pour diminuer l'immunogénicité du greffon.

Il est également à noter que l'utilisation du rat comme receveur dans notre étude nous a affranchit du problème des xénoanticorps naturels (XAN) dirigés contre l' $\alpha$ -Gal puisque cet antigène est exprimé tant chez le donneur (le porc) que chez le receveur (le rat). Pourtant l'éventuelle utilisation de tissu porcine dans des essais cliniques devra prendre en compte la présence de ces XAN présents chez l'homme. C'est la raison pour laquelle des porcs transgéniques n'exprimant pas l' $\alpha$ -Gal ont été générés (Phelps et al., 2003; Kolber-Simonds et al., 2004). Même si une réponse humorale contre cet épitope ne semble pas être l'élément

déterminant dans le rejet des xéno greffes intracérébrales, il a été montré que sa neutralisation réduisait la réponse immune de l'hôte lors d'une greffe de cellules porcines chez l'homme (Brevig et al., 2001). Ainsi, la neutralisation de certains xénoantigènes en association avec des immunosuppresseurs de la réponse T et des anti-inflammatoires pourrait prolonger de façon significative la survie de xéno greffes intracérébrales.

### **Transplanter des cellules potentiellement moins immunogènes**

Comparativement à la greffe de neuroblastes, l'utilisation de précurseurs neuronaux porcins (PNp) semble présenter un avantage certain d'un point de la réponse immune induite. De plus, même nos observations restent à confirmer, les PNp greffées semblent favoriser l'innervation du greffon par les fibres TH<sup>+</sup> de l'hôte. Un tel effet n'est pas observé chez un rat dénervé (Armstrong et al., 2002; Armstrong et al., 2003) et il serait essentiellement dû à la capacité des PNp à sécréter des facteurs trophiques (Lu et al., 2003). Dès lors, il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure la greffe des PN dans des modèles de MP à des stades précoces ne permettrait pas une protection des neurones dopaminergiques non encore affectés par la maladie ainsi que la persistance ou l'induction d'une réinnervation du striatum par les neurones encore sains de la substance noire. Il serait également intéressant dans des modèles plus avancés de la maladie, de réaliser des doubles greffes visant à transplanter des NB (susceptibles de générer davantage de neurones TH<sup>+</sup>) dans la substance noire et des PN dans le striatum pour analyser la possibilité d'une croissance axonale médiée par des effets trophiques sur de longues distances. Par ailleurs, la récente mise en évidence des effets immunomodulateurs des PN, notamment sur les cellules T infiltrant le parenchyme, renforce l'intérêt thérapeutique de ces cellules. A ce jour, la faible différenciation des PN en neurones dopaminergiques in vitro et in vivo, limite leur utilisation en tant que source cellulaire pour remplacer les neurones affectés par la maladie de Parkinson, toutefois, les différentes caractéristiques trophiques et immunomodulatrices de ces cellules permettent de considérer les PN comme des cellules intéressantes pour des co-greffes avec par exemple, des neuroblastes issus de mésencéphale ventral. Il est à noter que d'autres cellules que les NP pourraient être intéressantes pour leur effets trophiques et immunomodulateurs. Ce sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui sont plus facilement disponibles que les PN et qui pourraient même permettre d'envisager des autogreffes. Une première série d'expérience menée au sein de notre groupe semble indiquer un effet bénéfique des CSM sur la survie de NBp greffés dans un striatum de rat.

# *BIBLIORAPHIE*

## A

---

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Agid Y (1991) Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 337:1321-1324.
- Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E (2001) Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:8108-8118.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147.
- Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L (1998) Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol* 160:4671-4680.
- Aloisi F, Penna G, Polazzi E, Minghetti L, Adorini L (1999) CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *J Immunol* 162:1384-1391.
- Aloisi F, Ria F, Columba-Cabezas S, Hess H, Penna G, Adorini L (1999) Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur J Immunol* 29:2705-2714.
- Alt C, Laschinger M, Engelhardt B (2002) Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 32:2133-2144.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ (2000) Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 20:4091-4098.
- Amaducci L, Forno KI, Eng LF (1981) Glial fibrillary acidic protein in cryogenic lesions of the rat brain. *Neurosci Lett* 21:27-32.
- Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB (1996) A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14014-14019.
- Andjelkovic AV, Pachter JS (1998) Central nervous system endothelium in neuroinflammatory, neuroinfectious, and neurodegenerative disease. *J Neurosci Res* 51:423-430.
- Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH (1997) Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:406-415.
- Aquino DA, Chiu FC, Brosnan CF, Norton WT (1988) Glial fibrillary acidic protein increases in the spinal cord of Lewis rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* 51:1085-1096.
- Arimoto T, Bing G (2003) Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 12:35-45.
- Armstrong RJ, Tyers P, Jain M, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA (2003) Transplantation of expanded neural precursor cells from the developing pig ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 151:204-217.

- Armstrong RJ, Hurelbrink CB, Tyers P, Ratcliffe EL, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA (2002) The potential for circuit reconstruction by expanded neural precursor cells explored through porcine xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 175:98-111.
- Armstrong RJ, Harrower TP, Hurelbrink CB, McLaughlin M, Ratcliffe EL, Tyers P, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA (2001) Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience* 106:201-216.
- Arvieux J, Yssel H, Colomb MG (1988) Antigen-bound C3b and C4b enhance antigen-presenting cell function in activation of human T-cell clones. *Immunology* 65:229-235.
- Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild MA, Thun MJ (2006) Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 60:197-203.
- Aschner M (1998) Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* 19:269-281.
- Asensio VC, Campbell IL (1999) Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci* 22:504-512.

## B

---

- Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg* 62:169-173.
- Bacon KB, Harrison JK (2000) Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol* 104:92-97.
- Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
- Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250:91-104.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Barker CF, Billingham RE (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25:1-54.
- Barker RA, Dunnett SB, Faissner A, Fawcett JW (1996) The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Exp Neurol* 141:79-93.
- Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB (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.
- Bartholdi D, Schwab ME (1997) Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 9:1422-1438.
- Bartlett PF, Rosenfeld J, Bailey KA, Cheesman H, Harvey AR, Kerr RS (1990) Allograft rejection overcome by immunoselection of neuronal precursor cells. *Prog Brain Res* 82:153-160.
- Bauer J, Bradl M, Hickley WF, Forss-Petter S, Breitschopf H, Linington C, Wekerle H, Lassmann H (1998) T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 153:715-724.

- Bauer MK, Lieb K, Schulze-Osthoff K, Berger M, Gebicke-Haerter PJ, Bauer J, Fiebich BL (1997) Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur J Biochem* 243:726-731.
- Bayer SA, Yackel JW, Puri PS (1982) Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216:890-892.
- Becher B, Prat A, Antel JP (2000) Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29:293-304.
- Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27:62-74.
- Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F (1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373:339-341.
- Belkadi AM, Geny C, Naimi S, Jeny R, Peschanski M, Riche D (1997) Maturation of fetal human neural xenografts in the adult rat brain. *Exp Neurol* 144:369-380.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW (1993) Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 268:19161-19164.
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-632.
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol* 50:344-346.
- Ben-Hur T (2006) Human embryonic stem cells for neuronal repair. *Isr Med Assoc J* 8:122-126.
- Benveniste EN (1998) Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:259-275.
- Bernard CC, de Rosbo NK (1991) Immunopathological recognition of autoantigens in multiple sclerosis. *Acta Neurol (Napoli)* 13:171-178.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702-710.
- Billingham RE, Boswell T (1953) Studies on the problem of corneal homografts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 141:392-406.
- Bjorklund A (1992) Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery. *Curr Opin Neurobiol* 2:683-689.
- Bjorklund A (1993) Neurobiology. Better cells for brain repair. *Nature* 362:414-415.
- Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH (1982) Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Nature* 298:652-654.
- Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ (2000) Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res* 886:82-98.
- Bjorklund A, Dunnett SB, Brundin P, Stoessl AJ, Freed CR, Breeze RE, Levivier M, Peschanski M, Studer L, Barker R (2003) Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2:437-445.
- Block ML, Hong JS (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98.

- Bo L, Mork S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD (1994) Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 51:135-146.
- Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172:151-154.
- Bonifati DM, Kishore U (2007) Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol* 44:999-1010.
- Bonuccelli U, Del Dotto P (2006) New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 67:S30-38.
- Bouvier MM, Mytilineou C (1995) Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci* 15:7141-7149.
- Bradbury MW, Cserr HF, Westrop RJ (1981) Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am J Physiol* 240:F329-336.
- Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D (1989) Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 169:1977-1991.
- Brevig T, Pedersen EB, Kristensen T, Zimmer J (1997) Proliferative response of human T lymphocytes to porcine fetal brain cells. *Cell Transplant* 6:571-577.
- Brevig T, Kristensen T, Zimmer J (1999) Expression of major histocompatibility complex antigens and induction of human T-lymphocyte proliferation by astrocytes and macrophages from porcine fetal brain. *Exp Neurol* 159:474-483.
- Brevig T, Meyer M, Kristensen T, Zimmer J, Holgersson J (2001) Xenotransplantation for brain repair: reduction of porcine donor tissue immunogenicity by treatment with anti-Gal antibodies and complement. *Transplantation* 72:190-196.
- Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ (1999) Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 823:1-10.
- Brosnan CF, Battistini L, Raine CS, Dickson DW, Casadevall A, Lee SC (1994) Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci* 16:152-161.
- Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW (2002) Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 125:1297-1308.
- Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Bjorklund A (1989) Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res* 75:195-207.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:1013-1021.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.

## C

---

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

- Cannella B, Raine CS (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37:424-435.
- Cardona AE, Teale JM (2002) Gamma/delta T cell-deficient mice exhibit reduced disease severity and decreased inflammatory response in the brain in murine neurocysticercosis. *J Immunol* 169:3163-3171.
- Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM, Teale JM (1999) Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *J Immunol* 162:995-1002.
- Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA, Jr. (2000) Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 123 (Pt 6):1092-1101.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D (1999) Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 154:481-494.
- Cascalho M, Platt JL (2001) The immunological barrier to xenotransplantation. *Immunity* 14:437-446.
- Castle BE, Kishimoto K, Stearns C, Brown ML, Kehry MR (1993) Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J Immunol* 151:1777-1788.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462-4471.
- Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ (1998) Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 282:1714-1717.
- Chen LW, Yung KL, Chan YS (2005) Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease. *Curr Drug Targets* 6:821-833.
- Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 6:797-801.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462-4471.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou JP, Cuturi MC (2002) Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 168:5058-5069.
- Chung IY, Benveniste EN (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol* 144:2999-3007.
- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L, Lanza R (2006) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439:216-219.
- Cipriani R, Farias ML (2005) [Osteoporosis after solid organs transplantation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 49:369-377.
- Clarke DL (2003) Neural stem cells. *Bone Marrow Transplant* 32 Suppl 1:S13-17.
- Collier TJ, Redmond DE, Jr., Sladek CD, Gallagher MJ, Roth RH, Sladek JR, Jr. (1987) Intracerebral grafting and culture of cryopreserved primate dopamine neurons. *Brain Res* 436:363-366.
- Collier TJ, Redmond DE, Jr., Roth RH, Elsworth JD, Taylor JR, Sladek JR, Jr. (1997) Metabolic energy capacity of dopaminergic grafts and the implanted striatum in

- parkinsonian nonhuman primates as visualized with cytochrome oxidase histochemistry. *Cell Transplant* 6:135-140.
- Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC (2003) IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 86:123-129.
- Coomber BL, Stewart PA (1985) Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res* 30:99-115.
- Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S (1999) Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* 147:1569-1582.
- Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA (1993) Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149:111-114.
- Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ (1998) Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21:505-520.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) L-dopa in parkinson's syndrome. *N Engl J Med* 281:272.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-2658.
- Cremer JE, Cunningham VJ, Seville MP (1983) Relationships between extraction and metabolism of glucose, blood flow, and tissue blood volume in regions of rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:291-302.
- Cronin DC, 2nd, Stack R, Fitch FW (1995) IL-4-producing CD8+ T cell clones can provide B cell help. *J Immunol* 154:3118-3127.
- Cross AK, Woodroffe MN (1999) Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro. *Glia* 28:183-189.
- Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW (1994) Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 180:1715-1728.
- Cserr HF, Knopf PM (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13:507-512.
- Curtin JF, King GD, Barcia C, Liu C, Hubert FX, Guillonneau C, Josien R, Anegon I, Lowenstein PR, Castro MG (2006) Fms-like tyrosine kinase 3 ligand recruits plasmacytoid dendritic cells to the brain. *J Immunol* 176:3566-3577.

## D

---

- Daadi M, Arcellana-Panlilio MY, Weiss S (1998) Activin co-operates with fibroblast growth factor 2 to regulate tyrosine hydroxylase expression in the basal forebrain ventricular zone progenitors. *Neuroscience* 86:867-880.
- Dalpke AH, Schafer MK, Frey M, Zimmermann S, Tebbe J, Weihe E, Heeg K (2002) Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol* 168:4854-4863.
- Damier P, Tremblay L, Feger J, Hirsch EC (2000) [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)* 156:224-235.
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52:1-6.

- Daniloff JK, Low WC, Bodony RP, Wells J (1985) Cross-species neural transplants of embryonic septal nuclei to the hippocampal formation of adult rats. *Exp Brain Res* 59:73-82.
- Dausset J (1981) The major histocompatibility complex in man. *Science* 213:1469-1474.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1:249-254.
- Davson H, Oldendorf WH (1967) Symposium on membrane transport. Transport in the central nervous system. *Proc R Soc Med* 60:326-329.
- de Silva HR, Khan NL, Wood NW (2000) The genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Genet Dev* 10:292-298.
- 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.
- Deacon TW, Pakzaban P, Burns LH, Dinsmore J, Isacson O (1994) Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats. *Exp Neurol* 130:151-167.
- Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT (1996) C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271:348-350.
- Denis-Donini S, Glowinski J, Prochiantz A (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307:641-643.
- Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ, Oertel WH (2003) Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 18:2731-2742.
- Derkinderen P, Vidailhet M (2002) [Dyskinesia caused by L-DOPA]. *Rev Neurol (Paris)* 158 Spec no 1:S92-101.
- Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C (2004) Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113:1701-1710.
- Ding M, St Pierre BA, Parkinson JF, Medberry P, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Merrill JE (1997) Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia. A kinetic analysis. *J Biol Chem* 272:11327-11335.
- Dobrogowska DH, Vorbrodt AW (1999) Quantitative immunocytochemical study of blood-brain barrier glucose transporter (GLUT-1) in four regions of mouse brain. *J Histochem Cytochem* 47:1021-1030.
- Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55-72.
- Doucet G, Murata Y, Brundin P, Bosler O, Mons N, Geffard M, Ouimet CC, Bjorklund A (1989) Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol* 106:1-19.
- Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM (2001) Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14669-14674.

- Duan WM, Widner H, Brundin P (1995) Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngeneic, allogeneic or xenogeneic embryonic neuronal tissue in rats. *Exp Brain Res* 104:227-242.
- Duan WM, Cameron RM, Brundin P, Widner H (1997) Rat intrastriatal neural allografts challenged with skin allografts at different time points. *Exp Neurol* 148:334-347.
- Duan WM, Westerman MA, Wong G, Low WC (2002) Rat nigral xenografts survive in the brain of MHC class II-, but not class I-deficient mice. *Neuroscience* 115:495-504.
- Dubois-Dalcq M, Armstrong R (1990) The cellular and molecular events of central nervous system remyelination. *Bioessays* 12:569-576.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O (2001) Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2:365-369.
- During MJ, Naegel JR, O'Malley KL, Geller AI (1994) Long-term behavioral recovery in parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. *Science* 266:1399-1403.
- Dziembowska M, Tham TN, Lau P, Vitry S, Lazarini F, Dubois-Dalcq M (2005) A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia* 50:258-269.

## E

---

- Ebadi M, Sharma S, Shavali S, El Refaey H (2002) Neuroprotective actions of selegiline. *J Neurosci Res* 67:285-289.
- Einstein O, Grigoriadis N, Mizrachi-Kol R, Reinhartz E, Polyzoidou E, Lavon I, Milonas I, Karussis D, Abramsky O, Ben-Hur T (2006) Transplanted neural precursor cells reduce brain inflammation to attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol* 198:275-284.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16:2508-2521.
- Emgard M, Karlsson J, Hansson O, Brundin P (1999) Patterns of cell death and dopaminergic neuron survival in intrastriatal nigral grafts. *Exp Neurol* 160:279-288.
- Engelhardt B (2006) Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113:477-485.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Erickson JT, Brosenitsch TA, Katz DM (2001) Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci* 21:581-589.

## F

---

- Fabry Z, Fitzsimmons KM, Herlein JA, Moninger TO, Dobbs MB, Hart MN (1993) Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol* 47:23-34.

- Fabry Z, Topham DJ, Fee D, Herlein J, Carlino JA, Hart MN, Sriram S (1995) TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *J Immunol* 155:325-332.
- Fahn S, Cohen G (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32:804-812.
- Farrell CL, Pardridge WM (1991) Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5779-5783.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301.
- Fink JS, Schumacher JM, Elias 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.
- Finsen BR, Sorensen T, Castellano B, Pedersen EB, Zimmer J (1991) Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol* 32:159-183.
- Fischer HG, Bielinsky AK (1999) Antigen presentation function of brain-derived dendriform cells depends on astrocyte help. *Int Immunol* 11:1265-1274.
- Fischer HG, Reichmann G (2001) Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 166:2717-2726.
- Fischer HG, Bonifas U, Reichmann G (2000) Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 164:4826-4834.
- Fisher LJ, Jinnah HA, Kale LC, Higgins GA, Gage FH (1991) Survival and function of intrastrially grafted primary fibroblasts genetically modified to produce L-dopa. *Neuron* 6:371-380.
- Flugel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, Kreutzberg GW, Graeber MB (2000) Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol* 10:353-364.
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD (1995) Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154:4309-4321.
- Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, Sedgwick JD (1996) Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med* 184:1737-1745.
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD (1995) Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154:4309-4321.
- Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breitmayer JP, Groux H (2003) A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol* 171:5018-5026.
- Frank MM, Fries LF (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 12:322-326.
- Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Wells TH, Barrett JN, Grafton ST, Huang SC, Eidelberg D, Rottenberg DA (1990) Transplantation of human fetal dopamine cells for Parkinson's disease. Results at 1 year. *Arch Neurol* 47:505-512.

- Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, Lone T, Zhang YB, Snyder JA, Wells TH, et al. (1992) Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 327:1549-1555.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344:710-719.
- Freeman TB, Wojak JC, Brandeis L, Michel JP, Pearson J, Flamm ES (1988) Cross-species intracerebral grafting of embryonic swine dopaminergic neurons. *Prog Brain Res* 78:473-477.
- Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJ, et al. (1995) Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 38:379-388.
- Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol* 17:1271-1278.
- Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates MA, Bjorklund A (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* 19:5990-6005.
- Frigerio R, Sanft KR, Grossardt BR, Peterson BJ, Elbaz A, Bower JH, Ahlskog JE, de Andrade M, Maraganore DM, Rocca WA (2006) Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study. *Mov Disord* 21:1688-1692.
- Fritz RB, Wang X, Zhao ML (2000) The fate of adoptively transferred quiescent encephalitogenic T cells in normal and antigen-tolerized mice. *J Neuroimmunol* 107:66-72.
- Froes MM, Correia AH, Garcia-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Neto MV (1999) Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7541-7546.
- Frohman EM, Frohman TC, Dustin ML, Vayuvegula B, Choi B, Gupta A, van den Noort S, Gupta S (1989) The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J Neuroimmunol* 23:117-124.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147:891-903.

## G

---

- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Gai WP, Geffen LB, Denoroy L, Blessing WW (1993) Loss of C1 and C3 epinephrine-synthesizing neurons in the medulla oblongata in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 33:357-367.
- Gajewski TF, Fitch FW (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140:4245-4252.
- Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA (1988) Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 263:17755-17762.

- Galpern 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.
- Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP (2000) Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology* 49:171-186.
- Gaudin DP, Rioux L, Bedard PJ (1990) Fetal dopamine neuron transplants prevent behavioral supersensitivity induced by repeated administration of L-dopa in the rat. *Brain Res* 506:166-168.
- Gerhart DZ, LeVasseur RJ, Broderius MA, Drewes LR (1989) Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res* 22:464-472.
- Giasson BI, Lee VM (2001) Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron* 31:885-888.
- Gibb WR, Scott T, Lees AJ (1991) Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Mov Disord* 6:2-11.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9:589-595.
- Giulian D, Ingeman JE (1988) Colony-stimulating factors as promoters of amoeboid microglia. *J Neurosci* 8:4707-4717.
- Giuliani F, Hader W, Yong VW (2005) Minocycline attenuates T cell and microglia activity to impair cytokine production in T cell-microglia interaction. *J Leukoc Biol* 78:135-143.
- Glabinski AR, Ransohoff RM (1999) Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* 5:3-12.
- Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2:492-501.
- Goldman JE, Yen SH, Chiu FC, Peress NS (1983) Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* 221:1082-1084.
- Gollackner B, Mueller NJ, Houser S, Qawi I, Sozic D, Knosalla C, Buhler L, Dor FJ, Awwad M, Sachs DH, Cooper DK, Robson SC, Fishman JA (2003) Porcine cytomegalovirus and coagulopathy in pig-to-primate xenotransplantation. *Transplantation* 75:1841-1847.
- Gould DS, Auchincloss H, Jr. (1999) Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 20:77-82.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3168-3171.
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res* 21:18-24.
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1989) Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res* 22:103-106.
- Graham DG (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14:633-643.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-227.

- Granger DN, Kubes P (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55:662-675.
- Gregoire N (1990) [The blood-brain barrier]. *J Radiol* 71:481-487.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:328-334.
- Grewal IS, Flavell RA (1998) CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16:111-135.
- Griffith TS, Ferguson TA (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today* 18:240-244.
- Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16:1091-1100.
- Guo Q, Sebastian L, Sopher BL, Miller MW, Glazner GW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP (1999) 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* 96:4125-4130.

## H

---

- Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehncrona S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, Lindvall O (2002) Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 5:627-628.
- Hall PA, Watt FM (1989) Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106:619-633.
- Hamrock DJ (2006) Adverse events associated with intravenous immunoglobulin therapy. *Int Immunopharmacol* 6:535-542.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155.
- Hanisch UK, Neuhaus J, Quirion R, Kettenmann H (1996) Neurotoxicity induced by interleukin-2: involvement of infiltrating immune cells. *Synapse* 24:104-114.
- Harling-Berg C, Knopf PM, Merriam J, Cserr HF (1989) Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused into rat cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 25:185-193.
- Harrower TP, Richards A, Cruz G, Copeman L, Dunnett SB, Barker RA (2002) Alpha Gal is widely expressed in embryonic porcine stem cells and neural tissue. *Neuroreport* 13:481-485.
- Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuillat C, Malcus C, Belin MF, Nataf S (2006) How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* 107:806-812.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
- He Y, Appel S, Le W (2001) Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 909:187-193.
- Helt CE, Hoernig GR, Albeck DS, Gerhardt GA, Ickes B, Reyland ME, Quissell DO, Stromberg I, Granholm AC (2001) Neuroprotection of grafted neurons with a GDNF/caspase inhibitor cocktail. *Exp Neurol* 170:258-269.
- Herman JP, Arous ND (1994) Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog Neurobiol* 44:1-35.

- Hickey WF (1991) Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1:97-105.
- Hickey WF (1999) Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* 11:125-137.
- Hickey WF, Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-348.
- Hirschi KK, D'Amore PA (1996) Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32:687-698.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290:1768-1771.
- Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2004) Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 14:43-50.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H (2000) The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 107:161-166.
- Hoglinger GU, Sautter J, Meyer M, Spenger C, Seiler RW, Oertel WH, Widmer HR (1998) Rat fetal ventral mesencephalon grown as solid tissue cultures: influence of culture time and BDNF treatment on dopamine neuron survival and function. *Brain Res* 813:313-322.
- Hoglinger GU, Widmer HR, Spenger C, Meyer M, Seiler RW, Oertel WH, Sautter J (2001) Influence of time in culture and BDNF pretreatment on survival and function of grafted embryonic rat ventral mesencephalon in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 167:148-157.
- Honey CR, Clarke DJ, Dallman MJ, Charlton HM (1990) Human neural graft function in rats treated with anti-interleukin II receptor antibody. *Neuroreport* 1:247-249.
- Honey CR, Shen H (1999) Immunosuppression for neural xenografts: a comparison of cyclosporin and anti-CD25 monoclonal antibody. *J Neurosurg* 91:109-113.
- Horellou P, Vigne E, Castel MN, Barneoud P, Colin P, Perricaudet M, Delaere P, Mallet J (1994) Direct intracerebral gene transfer of an adenoviral vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 6:49-53.
- Hornykiewicz O (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev* 18:925-964.
- Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R (2004) Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172:7485-7494.
- 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.
- Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ (2000) Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290:2155-2159.
- Hurelbrink CB, Barker RA (2001) Prospects for the treatment of Parkinson's disease using neurotrophic factors. *Expert Opin Pharmacother* 2:1531-1543.

- Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM (1994) Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci* 14:335-347.
- Hynes M, Rosenthal A (2000) Embryonic stem cells go dopaminergic. *Neuron* 28:11-14.

## I

---

- Isacson O, Deacon TW (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 (1997) Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *Trends Neurosci* 20:477-482.
- Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH (1995) Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med* 1:1189-1194.
- Isacson O, Costantini L, Schumacher JM, Cicchetti F, Chung S, Kim K (2001) Cell implantation therapies for Parkinson's disease using neural stem, transgenic or xenogeneic donor cells. *Parkinsonism Relat Disord* 7:205-212.
- Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, Ehst BD, Ingulli E, Rudensky AY, Jenkins MK (2003) Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19:47-57.

## J

---

- Jain M, Armstrong RJ, Tyers P, Barker RA, Rosser AE (2003) GABAergic immunoreactivity is predominant in neurons derived from expanded human neural precursor cells in vitro. *Exp Neurol* 182:113-123.
- Jemison LM, Williams SK, Lublin FD, Knobler RL, Korngold R (1993) Interferon-gamma-inducible endothelial cell class II major histocompatibility complex expression correlates with strain- and site-specific susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 47:15-22.
- Jenner P (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13 Suppl 1:24-34.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Johns TG, Bernard CC (1999) The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 72:1-9.
- Johnson MD, Gold LI, Moses HL (1992) Evidence for transforming growth factor-beta expression in human leptomeningeal cells and transforming growth factor-beta-like activity in human cerebrospinal fluid. *Lab Invest* 67:360-368.
- Jolliet P (2000) [Pharmacologic constraints imposed by the blood-brain barrier: the example of multiple sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)* 156:681-683.
- Joly E, Oldstone MB (1992) Neuronal cells are deficient in loading peptides onto MHC class I molecules. *Neuron* 8:1185-1190.
- Joly E, Mucke L, Oldstone MB (1991) Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 253:1283-1285.

- Jordan FL, Thomas WE (1988) Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res* 472:165-178.
- June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB (1994) The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 15:321-331.

## K

---

- Kalish RS, Koujak S (2004) Minocycline inhibits antigen processing for presentation to human T cells: additive inhibition with chloroquine at therapeutic concentrations. *Clin Immunol* 113:270-277.
- Kalyani A, Hobson K, Rao MS (1997) Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev Biol* 186:202-223.
- Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z (2004) Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 173:2353-2361.
- Kempermann G, Neumann H (2003) Neuroscience. Microglia: the enemy within? *Science* 302:1689-1690.
- Kent SJ, Karlik SJ, Cannon C, Hines DK, Yednock TA, Fritz LC, Horner HC (1995) A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 58:1-10.
- Kiefer R, Streit WJ, Toyka KV, Kreutzberg GW, Hartung HP (1995) Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int J Dev Neurosci* 13:331-339.
- Kikuchi M, Tanneti L, Lipton SA (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20:5037-5044.
- Kim SS, Kong PJ, Kim BS, Sheen DH, Nam SY, Chun W (2004) Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. *Arch Pharm Res* 27:314-318.
- Kitada T, Asakawa S, Matsumine H, Hattori N, Shimura H, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y (2000) Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism. *Neurogenetics* 2:207-218.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R (2006) Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444:481-485.
- Kloppenborg M, Verweij CL, Miltenburg AM, Verhoeven AJ, Daha MR, Dijkmans BA, Breedveld FC (1995) The influence of tetracyclines on T cell activation. *Clin Exp Immunol* 102:635-641.
- Kloppenborg M, Brinkman BM, de Rooij-Dijk HH, Miltenburg AM, Daha MR, Breedveld FC, Dijkmans BA, Verweij C (1996) The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 40:934-940.
- Knopf PM, Harling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D, Sirulnick EJ, Nolan SC, Park JT, Keir G, Thompson EJ, Hickey WF (1998) Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol* 161:692-701.
- Koistinaho M, Koistinaho J (2002) Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia* 40:175-183.

- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ (2004) Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7335-7340.
- Konno H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Suzuki H, Saito T, Terunuma H (1989) Wallerian degeneration induces Ia-antigen expression in the rat brain. *J Neuroimmunol* 25:151-159.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10711-10716.
- Kouwenhoven M, Ozenci V, Gomes A, Yarinlin D, Giedraitis V, Press R, Link H (2001) Multiple sclerosis: elevated expression of matrix metalloproteinases in blood monocytes. *J Autoimmun* 16:463-470.
- Kouwenhoven M, Ozenci V, Tjernlund A, Pashenkov M, Homman M, Press R, Link H (2002) Monocyte-derived dendritic cells express and secrete matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitors and are imbalanced in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 126:161-171.
- Kremlev SG, Roberts RL, Palmer C (2004) Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition. *J Neuroimmunol* 149:1-9.
- Krum JM, Rosenstein JM (1988) Patterns of angiogenesis in neural transplant models: II. Fetal neocortical transplants. *J Comp Neurol* 271:331-345.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kumar S, Boehm J, Lee JC (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2:717-726.

## L

---

- Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D (2005) Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ Health Perspect* 113:1230-1233.
- Lang AE, Lozano AM (1998a) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339:1130-1143.
- Lang AE, Lozano AM (1998b) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044-1053.
- Langosch JM, Gebicke-Haerter PJ, Norenberg W, Illes P (1994) Characterization and transduction mechanisms of purinoceptors in activated rat microglia. *Br J Pharmacol* 113:29-34.
- Langston JW, Forno LS, Tetrad J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46:598-605.
- Langston JW (1996) The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 47:S153-160.
- Lansbury PT, Jr., Brice A (2002) Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Cell Biol* 14:653-660.

- Lanzavecchia A (1997) Understanding the mechanisms of sustained signaling and T cell activation. *J Exp Med* 185:1717-1719.
- Larsson LC, Duan WM, Widner H (1999) Discordant xenografts: different outcome after mouse and rat neural tissue transplantation to guinea-pigs. *Brain Res Bull* 49:367-376.
- Larsson LC, Czech KA, Brundin P, Widner H (2000) Intrastratial ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. *Cell Transplant* 9:261-272.
- Larsson LC, Anderson P, Widner H, Korsgren O (2001a) Enhanced survival of porcine neural xenografts in mice lacking CD1d1, but no effect of NK1.1 depletion. *Cell Transplant* 10:295-304.
- Larsson LC, Frielingsdorf H, Mirza B, Hansson SJ, Anderson P, Czech KA, Strandberg M, Widner H (2001b) Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp Neurol* 172:100-114.
- Larsson LC, Corbascio M, Widner H, Pearson TC, Larsen CP, Ekberg H (2002) Simultaneous inhibition of B7 and LFA-1 signaling prevents rejection of discordant neural xenografts in mice lacking CD40L. *Xenotransplantation* 9:68-76.
- Larsson LC, Corbascio M, Pearson TC, Larsen CP, Ekberg H, Widner H (2003) Induction of operational tolerance to discordant dopaminergic porcine xenografts. *Transplantation* 75:1448-1454.
- Laschinger M, Vajkoczy P, Engelhardt B (2002) Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. *Eur J Immunol* 32:3598-3606.
- Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V (2001) Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochem Res* 26:1209-1216.
- Lavi E, Suzumura A, Murasko DM, Murray EM, Silberberg DH, Weiss SR (1988) Tumor necrosis factor induces expression of MHC class I antigens on mouse astrocytes. *J Neuroimmunol* 18:245-253.
- Lee SC, Liu W, Brosnan CF, Dickson DW (1994) GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia* 12:309-318.
- Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EN (2000) Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J Immunol* 164:1277-1285.
- Lee SM, Yune TY, Kim SJ, Kim YC, Oh YJ, Markelonis GJ, Oh TH (2004) Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF-alpha expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. *J Neurochem* 91:568-578.
- Lees AJ, Shaw KM, Kohout LJ, Stern GM, Elsworth JD, Sandler M, Youdim MB (1977) Deprenyl in Parkinson's disease. *Lancet* 2:791-795.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8514-8519.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22:2478-2486.
- Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D (2002) Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 73:1373-1381.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595.

- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-258.
- Leveille C, Chandad F, Al-Daccak R, Mourad W (1999) CD40 associates with the MHC class II molecules on human B cells. *Eur J Immunol* 29:3516-3526.
- Li L, Liu F, Salmonsens RA, Turner TK, Litofsky NS, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Jones SN, Recht LD, Ross AH (2002) PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation. *Mol Cell Neurosci* 20:21-29.
- Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA (2000) The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 12:522-527.
- Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 100:323-331.
- Lillien L, Raphael H (2000) BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development* 127:4993-5005.
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1105-1111.
- Lin S, Zhang Y, Dodel R, Farlow MR, Paul SM, Du Y (2001) Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 315:61-64.
- Linda H, Hammarberg H, Piehl F, Khademi M, Olsson T (1999) Expression of MHC class I heavy chain and beta2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. *J Neuroimmunol* 101:76-86.
- Lindvall O, Rehnström S, Brundin P, Gustavii B, Astedt B, Widner H, Lindholm T, Bjorklund A, Leenders KL, Rothwell JC, et al. (1989) Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 46:615-631.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247:574-577.
- Lindvall O, Bjorklund A (2004) Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1:382-393.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48:1583-1588.
- Litchfield TM, Whiteley SJ, Yee KT, Tyers P, Usherwood EJ, Nash AA, Lund RD (1997) Characterisation of the immune response in a neural xenograft rejection paradigm. *J Neuroimmunol* 73:135-144.
- Liu B (2006) Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. *Aaps J* 8:E606-621.
- Liu L, Zhang M, Jenkins C, MacPherson GG (1998) Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J Immunol* 161:1146-1155.
- Liu B, Gao HM, Hong JS (2003) Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect* 111:1065-1073.
- Locati M, Murphy PM (1999) Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 50:425-440.
- Loddick SA, Liu C, Takao T, Hashimoto K, De Souza EB (1998) Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 26:306-319.

- Logroschino G (2005) The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? *Environ Health Perspect* 113:1234-1238.
- Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3:932-942.
- Lou J, Dayer JM, Grau GE, Burger D (1996) Direct cell/cell contact with stimulated T lymphocytes induces the expression of cell adhesion molecules and cytokines by human brain microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 26:3107-3113.
- Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 181:115-129.

## M

---

- Mackenzie IR, Munoz DG (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology* 50:986-990.
- Madrazo I, Leon V, Torres C, Aguilera MC, Varela G, Alvarez F, Fraga A, Drucker-Colin R, Ostrosky F, Skurovich M, et al. (1988) Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 318:51.
- Maehlen J, Schroder HD, Klareskog L, Olsson T, Kristensson K (1988) Axotomy induces MHC class I antigen expression on rat nerve cells. *Neurosci Lett* 92:8-13.
- Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G (1981) Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem* 36:589-593.
- Malipiero UV, Frei K, Fontana A (1990) Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *J Immunol* 144:3816-3821.
- Mallat M, Houlgatte R, Brachet P, Prochiantz A (1989) Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev Biol* 133:309-311.
- Martin C, Melchior B, Nerriere-Daguin V, Naveilhan P, Soullillou JP, Brachet P (2005) Beta1 integrin as a xenoantigen in fetal porcine mesencephalic cells transplanted into the rat brain. *Cell Transplant* 14:527-536.
- Martino G, Pluchino S (2006) The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 7:395-406.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127.
- Martyn CN, Osmond C (1995) Parkinson's disease and the environment in early life. *J Neurol Sci* 132:201-206.
- Mason DW, Charlton HM, Jones AJ, Lavy CB, Puklavec M, Simmonds SJ (1986) The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* 19:685-694.
- Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, Masuzawa T, Suzuki H, Honda M, Yazaki Y, Watanabe E, Luoma J, Yla-Herttuala S, Fraser I, Gordon S, Kodama T (1996) Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3269-3274.

- Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M (1992) Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology* 76:209-216.
- Matter K, Balda MS (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:225-236.
- Matyszak MK, Perry VH (1996) The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 74:599-608.
- Matyszak MK, Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Stromal macrophages of the choroid plexus situated at an interface between the brain and peripheral immune system constitutively express major histocompatibility class II antigens. *J Neuroimmunol* 40:173-181.
- Mayer E, Fawcett JW, Dunnett SB (1993) Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons--II. Effects on nigral transplants in vivo. *Neuroscience* 56:389-398.
- Mayeux R (1990) Depression in the patient with Parkinson's disease. *J Clin Psychiatry* 51 Suppl:20-23; discussion 24-25.
- McCarty MF (2006) Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses* 67:251-269.
- McColl SR (2002) Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol* 80:489-496.
- McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM (2001) Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol* 169:219-230.
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71.
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD (2005) Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:335-339.
- McMenamin PG (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholmount preparations. *J Comp Neurol* 405:553-562.
- McMenamin PG, Wealthall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B (2003) Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res* 313:259-269.
- Melchior B, Remy S, Nerriere-Daguin V, Heslan JM, Soullou 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.
- Melchior B, Nerriere-Daguin V, Laplaud DA, Remy S, Wiertelowski S, Neveu I, Naveilhan P, Meakin SO, Brachet P (2003) Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependent neuroprotection. *Exp Neurol* 183:367-378.
- Melchior B, Nerriere-Daguin V, Degauque N, Brouard S, Guillet M, Soullou JP, Brachet P (2005) Compartmentalization of TCR repertoire alteration during rejection of an intrabrain xenograft. *Exp Neurol* 192:373-383.
- Menei P, Pean JM, Nerriere-Daguin V, Jollivet C, Brachet P, Benoit JP (2000) Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage. *Exp Neurol* 161:259-272.
- Mennicken F, Maki R, de Souza EB, Quirion R (1999) Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci* 20:73-78.

- 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.
- Mi H, Haeberle H, Barres BA (2001) Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci* 21:1538-1547.
- Milner R, Campbell IL (2002) The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res* 69:286-291.
- Mirjany M, Ho L, Pasinetti GM (2002) Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 301:494-500.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82-86.
- Montero-Menei CN, Sindji L, Pouplard-Barthelaix A, Jehan F, Denechaud L, Darcy F (1994) Lipopolysaccharide intracerebral administration induces minimal inflammatory reaction in rat brain. *Brain Res* 653:101-111.
- Moore TM, Stuart GL, Eisler RM, Franchina JJ (2003) The effects of relationship aversive female partner behavior on attributions and physiological reactivity of verbally aggressive and non-aggressive males. *Violence Vict* 18:95-106.
- Mor G, Gutierrez LS, Eliza M, Kahyaoglu F, Arici A (1998) Fas-fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am J Reprod Immunol* 40:89-94.
- Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, Von Andrian UH (2003) Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424:88-93.
- Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B (2006) Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138:869-878.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88:287-298.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138-146.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
- Moss DW, Bates TE (2001) Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur J Neurosci* 13:529-538.
- Mouradian MM (2002) Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* 58:179-185.
- Murphy KM, Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.

## N

---

- Nadarajah B, Makarenkova H, Becker DL, Evans WH, Parnavelas JG (1998) Basic FGF increases communication between cells of the developing neocortex. *J Neurosci* 18:7881-7890.
- Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, Shortman K (2006) Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7:663-671.
- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001) Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65:322-331.
- Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
- Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H (1995) Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269:549-552.
- Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H (1997) Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med* 185:305-316.
- Neveu I, Jehan F, Houlgatte R, Wion D, Brachet P (1992) Activation of nerve growth factor synthesis in primary glial cells by phorbol 12-myristate 13-acetate: role of protein kinase C. *Brain Res* 570:316-322.
- Newman TA, Galea I, van Rooijen N, Perry VH (2005) Blood-derived dendritic cells in an acute brain injury. *J Neuroimmunol* 166:167-172.
- Nguyen VT, Benveniste EN (2000) Involvement of STAT-1 and its family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J Biol Chem* 275:23674-23684.
- Ni HT, Merica RR, Spellman SR, Wang JM, Low WC (2000) Visualization of antigen-specific T cell activation in vivo in response to intracerebral administration of a xenopeptide. *Exp Neurol* 164:362-370.
- Nikcevic KM, Gordon KB, Tan L, Hurst SD, Kroepfl JF, Gardinier M, Barrett TA, Miller SD (1997) IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J Immunol* 158:614-621.
- Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, Jr., Lozano AM, Penn RD, Simpson RK, Jr., Stacy M, Wooten GF (2003) Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60:69-73.

## O

---

- Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, Rodriguez ME, Martinez-Lage JM (1989) Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 39:11-19.
- Odeberg J, Piao JH, Samuelsson EB, Falci S, Akesson E (2005) Low immunogenicity of in vitro-expanded human neural cells despite high MHC expression. *J Neuroimmunol* 161:1-11.
- Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S, Melamed E, Bernard R, Bernard O (1998) Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5789-5794.
- Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Tanuma N, Matsumoto Y (1997) Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation: tolerance induction by anti-T-cell antibodies. *J Neurosci Res* 48:385-396.

- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:403-414.
- Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ (1977) The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1:409-417.
- Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916-3924.
- Olsson T, Kristensson K, Ljungdahl A, Maehlen J, Holmdahl R, Klareskog L (1989) Gamma-interferon-like immunoreactivity in axotomized rat motor neurons. *J Neurosci* 9:3870-3875.
- Orr CF, Rowe DB, Halliday GM (2002) An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 68:325-340.
- Osman M, Tortorella M, Londei M, Quarantino S (2002) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 105:73-82.
- Ostenfeld T, Caldwell MA, Prowse KR, Linskens MH, Jauniaux E, Svendsen CN (2000) Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation. *Exp Neurol* 164:215-226.
- Ourednik J, Ourednik V, Lynch WP, Schachner M, Snyder EY (2002) Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nat Biotechnol* 20:1103-1110.

## **P**

---

- Pakzaban P, Isacson O (1994) Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience* 62:989-1001.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404.
- Panek RB, Lee YJ, Itoh-Lindstrom Y, Ting JP, Benveniste EN (1994) Characterization of astrocyte nuclear proteins involved in IFN-gamma- and TNF-alpha-mediated class II MHC gene expression. *J Immunol* 153:4555-4564.
- Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E (1999) Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285:1236-1241.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Pashenkov M, Soderstrom M, Huang YM, Link H (2002) Cerebrospinal fluid affects phenotype and functions of myeloid dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 128:379-387.
- Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H (2001) Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 124:480-492.
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 3:282-286.
- Pedersen EB, Poulsen FR, Zimmer J, Finsen B (1995) Prevention of mouse-rat brain xenograft rejection by a combination therapy of cyclosporin A, prednisolone and azathioprine. *Exp Brain Res* 106:181-186.

- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326.
- Perry VH (1998) A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol* 90:113-121.
- Perry VH (2000) Persistent pathogens in the parenchyma of the brain. *J Neurovirol* 6 Suppl 1:S86-89.
- Perry VH, Newman TA, Cunningham C (2003) The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4:103-112.
- Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesser ML (1990) The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:850-859.
- Petrova PS, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire A, Shridhar V, Smith DI, Kelly J, Durocher Y, Commissiong JW (2004) Discovering novel phenotype-selective neurotrophic factors to treat neurodegenerative diseases. *Prog Brain Res* 146:168-183.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL (2003) Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-414.
- Playford ED, Brooks DJ (1992) In vivo and in vitro studies of the dopaminergic system in movement disorders. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 4:144-171.
- Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G (2005) Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 436:266-271.
- Piccini P, Lindvall O, Bjorklund A, Brundin P, Hagell P, Ceravolo R, Oertel W, Quinn N, Samuel M, Rehncrona S, Widner H, Brooks DJ (2000) Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 48:689-695.
- Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA (1986) Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137:1893-1896.
- Polazzi E, Contestabile A (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13:221-242.
- Poltorak M, Freed WJ (1989) Immunological reactions induced by intracerebral transplantation: evidence that host microglia but not astroglia are the antigen-presenting cells. *Exp Neurol* 103:222-233.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Linington C, Duncan ID (2002) Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol* 51:215-223.
- Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J (2003) Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol* 53:731-742.
- Prat A, Biernacki K, Becher B, Antel JP (2000) B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:129-136.

- Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH (1996) Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 149:2055-2066.
- Pryce G, Male D, Campbell I, Greenwood J (1997) Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro. *J Neuroimmunol* 75:84-94.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M (2004) MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 36:375-379.

## Q

---

- Quintero EM, Willis L, Singleton R, Harris N, Huang P, Bhat N, Granholm AC (2006) Behavioral and morphological effects of minocycline in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1093:198-207.

## R

---

- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
- Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R (2002) Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *Faseb J* 16:1274-1276.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3:569-581.
- Rao K, Lund RD (1989) Degeneration of optic axons induces the expression of major histocompatibility antigens. *Brain Res* 488:332-335.
- Rascol O (1999) [Arguments in favor of early treatment of Parkinson's disease with dopaminergic agonists]. *Rev Neurol (Paris)* 155:35-42.
- Redmond DE, Jr., Naftolin F, Collier TJ, Leranath C, Robbins RJ, Sladek CD, Roth RH, Sladek JR, Jr. (1988) Cryopreservation, culture, and transplantation of human fetal mesencephalic tissue into monkeys. *Science* 242:768-771.
- Redwine JM, Buchmeier MJ, Evans CF (2001) In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. *Am J Pathol* 159:1219-1224.
- 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.
- Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21:479-483.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361-367.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Reynolds BA, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13.

- 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.
- Ricaurte GA, Yuan J, Hatzidimitriou G, Cord BJ, McCann UD (2002) Severe dopaminergic neurotoxicity in primates after a common recreational dose regimen of MDMA ("ecstasy"). *Science* 297:2260-2263.
- Richardson RM, Broaddus WC, Holloway KL, Fillmore HL (2005) Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. *Brain Res* 1032:11-22.
- Risau W, Engelhardt B, Wekerle H (1990) Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J Cell Biol* 110:1757-1766.
- Risau W, Wolburg H (1990) Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 13:174-178.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17:942-964, table of contents.
- Rodriguez SC, Olguin AM, Miralles CP, Viladrich PF (2006) Characteristics of meningitis caused by Ibuprofen: report of 2 cases with recurrent episodes and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 85:214-220.
- Rosenstiel P, Lucius R, Deuschl G, Sievers J, Wilms H (2001) From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech* 54:18-25.
- Rosser AE, Tyers P, Dunnett SB (2000) The morphological development of neurons derived from EGF- and FGF-2-driven human CNS precursors depends on their site of integration in the neonatal rat brain. *Eur J Neurosci* 12:2405-2413.
- Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-242.
- Rosler K, Neuchrist C, Kitz K, Scheiner O, Kraft D, Lassmann H (1992) Expression of leucocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier (BBB). *J Neurosci Res* 31:365-374.
- Rothwell NJ (1997) Cytokines and acute neurodegeneration. *Mol Psychiatry* 2:120-121.
- Rouach N, Glowinski J, Giaume C (2000) Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149:1513-1526.
- Rozovsky I, Finch CE, Morgan TE (1998) Age-related activation of microglia and astrocytes: in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. *Neurobiol Aging* 19:97-103.
- Rubin LL, Staddon JM (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22:11-28.
- Rubin LL, Barbu K, Bard F, Cannon C, Hall DE, Horner H, Janatpour M, Liaw C, Manning K, Morales J, et al. (1991) Differentiation of brain endothelial cells in cell culture. *Ann N Y Acad Sci* 633:420-425.
- Ryan ME, Ashley RA (1998) How do tetracyclines work? *Adv Dent Res* 12:149-151.
- Ryu JK, Kim J, Cho SJ, Hatori K, Nagai A, Choi HB, Lee MC, McLarnon JG, Kim SU (2004) Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol Dis* 16:68-77.

## S

---

- Sad S, Marcotte R, Mosmann TR (1995) Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8<sup>+</sup> T cells into cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2:271-279.
- Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6295-6300.
- Satoh J, Lee YB, Kim SU (1995) T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture. *Brain Res* 704:92-96.
- Sauer H, Frodl EM, Kupsch A, ten Bruggencate G, Oertel WH (1992) Cryopreservation, survival and function of intrastriatal fetal mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 90:54-62.
- Sauer H, Fischer W, Nikkhah G, Wiegand SJ, Brundin P, Lindsay RM, Bjorklund A (1993) Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Res* 626:37-44.
- Schapira AH (1994) Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal. *Mov Disord* 9:125-138.
- Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A (1986) Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res* 374:110-118.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491-502.
- 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.
- Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR (1999a) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22:295-299.
- Schwartz M, Cohen I, Lazarov-Spiegler O, Moalem G, Yoles E (1999b) The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair. *J Mol Med* 77:713-717.
- Schwartz RH (1996) Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184:1-8.
- Seaberg RM, van der Kooy D (2003) Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* 26:125-131.
- Sedgwick JD, Ford AL, Foulcher E, Airriess R (1998) Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating T cell blasts. *J Immunol* 160:5320-5330.
- Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7438-7442.
- Sedgwick JD, Mossner R, Schwender S, ter Meulen V (1991) Major histocompatibility complex-expressing nonhematopoietic astroglial cells prime only CD8<sup>+</sup> T lymphocytes: astroglial cells as perpetuators but not initiators of CD4<sup>+</sup> T cell responses in the central nervous system. *J Exp Med* 173:1235-1246.
- Seki T, Arai Y (1993) Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 13:2351-2358.

- Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF (1990) Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 144:129-135.
- Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F (2000) Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 157:1991-2002.
- Sergent-Tanguy S, Michel DC, Neveu I, Naveilhan P (2006) Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation. *J Neurosci Res* 83:1515-1524.
- Serot JM, Bene MC, Foliguet B, Faure GC (2000) Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium. *J Neuroimmunol* 105:115-119.
- Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS (1998) Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 95:229-234.
- Sherman LA, Chattopadhyay S (1993) The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 11:385-402.
- Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M, Kohsaka S (1991) Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett* 123:229-231.
- Shin DH, Lee E, Kim HJ, Kim S, Cho SS, Chang KY, Lee WJ (2002) Fas ligand mRNA expression in the mouse central nervous system. *J Neuroimmunol* 123:50-57.
- Shinoda M, Giacobini M, Schmidt-Kastner R, Trok K, Olson L (1996a) Differential immune responses to fetal intracranial spinal cord and cortex cerebri grafts. *Exp Brain Res* 110:223-234.
- Shinoda M, Hudson JL, Stromberg I, Hoffer BJ, Moorhead JW, Olson L (1996b) Microglial cell responses to fetal ventral mesencephalic tissue grafting and to active and adoptive immunizations. *Exp Neurol* 141:173-180.
- Shortman K, Naik SH (2007) Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7:19-30.
- Shoulson I (1998) DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. *Ann Neurol* 44:S160-166.
- Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ (1998) How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10:581-587.
- Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN (1994) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol* 51:209-220.
- Shrikant P, Weber E, Jilling T, Benveniste EN (1995) Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J Immunol* 155:1489-1501.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36:348-355.
- Sinclair SR, Fawcett JW, Dunnett SB (1999) Dopamine cells in nigral grafts differentiate prior to implantation. *Eur J Neurosci* 11:4341-4348.
- Siveke JT, Hamann A (1998) T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 160:550-554.
- Sladek JR, Jr., Collier TJ, Elsworth JD, Roth RH, Taylor JR, Redmond DE, Jr. (1998) Intraatrial grafts from multiple donors do not result in a proportional increase in survival of dopamine neurons in nonhuman primates. *Cell Transplant* 7:87-96.

- Slavin AJ, Soos JM, Stuve O, Patarroyo JC, Weiner HL, Fontana A, Bikoff EK, Zamvil SS (2001) Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. *J Clin Invest* 108:1133-1139.
- Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartweg EA, Cepko CL (1992) Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68:33-51.
- Snyder BJ, Olanow CW (2005) Stem cell treatment for Parkinson's disease: an update for 2005. *Curr Opin Neurol* 18:376-385.
- Sobel RA, Blanchette BW, Bhan AK, Colvin RB (1984) The immunopathology of experimental allergic encephalomyelitis. II. Endothelial cell Ia increases prior to inflammatory cell infiltration. *J Immunol* 132:2402-2407.
- Soderstrom K, O'Malley J, Steece-Collier K, Kordower JH (2006) Neural repair strategies for Parkinson's disease: insights from primate models. *Cell Transplant* 15:251-265.
- Sommer L, Rao M (2002) Neural stem cells and regulation of cell number. *Prog Neurobiol* 66:1-18.
- Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD (1998) Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids* 14:69-74.
- Soos JM, Ashley TA, Morrow J, Patarroyo JC, Szente BE, Zamvil SS (1999) Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. *Int Immunol* 11:1169-1179.
- Steinman RM, Nussenzweig MC (2002) Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:351-358.
- Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W (2005) Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist* 11:308-322.
- Stoll G, Trapp BD, Griffin JW (1989) Macrophage function during Wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J Neurosci* 9:2327-2335.
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2000) Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:561-574.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1989) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol* 105:115-126.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581.
- Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT (1998) Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol* 152:74-87.
- Studer L, Tabar V, McKay RD (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1:290-295.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627.
- Suk K (2004) Minocycline suppresses hypoxic activation of rodent microglia in culture. *Neurosci Lett* 366:167-171.
- Sullivan AM, Pohl J, Blunt SB (1998) Growth/differentiation factor 5 and glial cell line-derived neurotrophic factor enhance survival and function of dopaminergic grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 10:3681-3688.
- Sumitran S, Liu J, Czech KA, Christensson B, Widner H, Holgersson J (1999) Human natural antibodies cytotoxic to pig embryonic brain cells recognize novel non-Gal $\alpha$ 1,3Gal-based xenoantigens. *Exp Neurol* 159:347-361.
- Sumitran S, Anderson P, Widner H, Holgersson J (1999a) Porcine embryonic brain cell cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Cell Transplant* 8:601-610.

- Sumitran-Holgersson S, Brevig T, Widner H, Holgersson J (2003) Activated porcine embryonic brain endothelial cells induce a proliferative human T-lymphocyte response. *Cell Transplant* 12:637-646.
- Suter T, Biollaz G, Gatto D, Bernasconi L, Herren T, Reith W, Fontana A (2003) The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur J Immunol* 33:2998-3006.
- Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD (2000) Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 105:223-231.
- Svendsen CN, Caldwell MA (2000) Neural stem cells in the developing central nervous system: implications for cell therapy through transplantation. *Prog Brain Res* 127:13-34.
- Svendsen CN, Clarke DJ, Rosser AE, Dunnett SB (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.
- Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmioli S, Dunnett SB (1997) Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 148:135-146.
- Szymanska A, Biernaskie J, Laidley D, Granter-Button S, Corbett D (2006) Minocycline and intracerebral hemorrhage: influence of injury severity and delay to treatment. *Exp Neurol* 197:189-196.

## T

---

- Tambur AR, Roitberg B (2005) Immunology of the central nervous system. *Neurol Res* 27:675-678.
- Tan L, Gordon KB, Mueller JP, Matis LA, Miller SD (1998) Presentation of proteolipid protein epitopes and B7-1-dependent activation of encephalitogenic T cells by IFN-gamma-activated SJL/J astrocytes. *J Immunol* 160:4271-4279.
- Tang FI, Tien LT, Zhou FC, Hoffer BJ, Wang Y (1998) Intranigral ventral mesencephalic grafts and nigrostriatal injections of glial cell line-derived neurotrophic factor restore dopamine release in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Exp Brain Res* 119:287-296.
- Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, Langston JW (1999) Parkinson disease in twins: an etiologic study. *Jama* 281:341-346.
- Taupin P, Gage FH (2002) Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69:745-749.
- Taylor AW, Streilein JW (1996) Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation* 3:112-118.
- Taylor JR, Elsworth JD, Sladek JR, Jr., Collier TJ, Roth RH, Redmond DE, Jr. (1995) Sham surgery does not ameliorate MPTP-induced behavioral deficits in monkeys. *Cell Transplant* 4:13-26.
- Terrazzino S, Bauleo A, Baldan A, Leon A (2002) Peripheral LPS administrations up-regulate Fas and FasL on brain microglial cells: a brain protective or pathogenic event? *J Neuroimmunol* 124:45-53.
- Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA (2000) Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res* 873:225-234.
- Thobois S, Delamarre-Damier F, Derkinderen P (2005) Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin Neurol Neurosurg* 107:269-281.

- Thompson L, Barraud P, Andersson E, Kirik D, Bjorklund A (2005) Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J Neurosci* 25:6467-6477.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J (2001) Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 21:2580-2588.
- Tikka TM, Koistinaho JE (2001) Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166:7527-7533.
- Togo T, Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Iseki E, Kosaka K (2000) Expression of CD40 in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Brain Res* 885:117-121.
- Tomas-Camardiel M, Rite I, Herrera AJ, de Pablos RM, Cano J, Machado A, Venero JL (2004) Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 16:190-201.
- Town T, Nikolic V, Tan J (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* 2:24.
- Tran PB, Ren D, Veldhouse TJ, Miller RJ (2004) Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 76:20-34.
- Traugott U, Lebon P (1988) Interferon-gamma and Ia antigen are present on astrocytes in active chronic multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 84:257-264.
- Trifilo MJ, Lane TE (2004) The CC chemokine ligand 3 regulates CD11c+CD11b+CD8alpha- dendritic cell maturation and activation following viral infection of the central nervous system: implications for a role in T cell activation. *Virology* 327:8-15.
- Trinite B, Voisine C, Yagita H, Josien R (2000) A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* 165:4202-4208.
- Truckenmiller ME, Bonneau RH, Norbury CC (2006) Stress presents a problem for dendritic cells: corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. *Brain Behav Immun* 20:210-218.
- Tsicopoulos A, Hamid Q, Varney V, Ying S, Moqbel R, Durham SR, Kay AB (1992) Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol* 148:2058-2061.
- Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, Chaudhuri A, Forbes R, Hawkins CP, Hughes RA, Palace J, Sharrack B, Swingler R, Young C, Moseley IF, MacManus DG, Donoghue S, Miller DH (1999) The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology* 53:466-472.

## U

---

- Ulvestad E, Williams K, Bo L, Trapp B, Antel J, Mork S (1994) HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology* 82:535-541.

## V

---

- Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B (2001) Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J Clin Invest* 108:557-565.
- Vass K, Lassmann H, Wekerle H, Wisniewski HM (1986) The distribution of Ia antigen in the lesions of rat acute experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)* 70:149-160.
- Vass K, Lassmann H (1990) Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol* 137:789-800.
- Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S (1993) bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11:951-966.
- Vidovic M, Sparacio SM, Elovitz M, Benveniste EN (1990) Induction and regulation of class II major histocompatibility complex mRNA expression in astrocytes by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol* 30:189-200.
- Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R (2002) Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284-2291.

## W

---

- Wada H, Noguchi Y, Marino MW, Dunn AR, Old LJ (1997) T cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12557-12561.
- Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z (2004) Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem* 279:19948-19954.
- Wang L, Lu XF, Lu YR, Liu J, Gao K, Zeng YZ, Li SF, Li YP, Cheng JQ, Tan WD, Wan L (2006) Immunogenicity and immune modulation of osteogenic differentiated mesenchymal stem cells from Banna minipig inbred line. *Transplant Proc* 38:2267-2269.
- Weber F, Meinl E, Aloisi F, Nevinny-Stickel C, Albert E, Wekerle H, Hohlfeld R (1994) Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis. *Brain* 117 (Pt 1):59-69.
- Weiss JM, Berman JW (1998) Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *J Neuroimmunol* 91:190-197.
- Weiss RA (1999) Xenografts and retroviruses. *Science* 285:1221-1222.
- Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ (1996) Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol* 6:275-288.
- Wennberg L, Czech KA, Larsson LC, Mirza B, Bennet W, Song Z, Widner H (2001) Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation* 71:1797-1806.
- Whitehouse PJ, Hedreen JC, White CL, 3rd, Price DL (1983) Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson disease. *Ann Neurol* 13:243-248.
- Victorin K, Brundin P, Gustavii B, Lindvall O, Bjorklund A (1990a) Reformation of long axon pathways in adult rat central nervous system by human forebrain neuroblasts. *Nature* 347:556-558.
- Victorin K, Brundin P, Sauer H, Lindvall O, Bjorklund A (1992) Long distance directed axonal growth from human dopaminergic mesencephalic neuroblasts implanted along

- the nigrostriatal pathway in 6-hydroxydopamine lesioned adult rats. *J Comp Neurol* 323:475-494.
- Victorin K, Clarke DJ, Bolam JP, Brundin P, Gustavii B, Lindvall O, Bjorklund A (1990b) 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.
- Widner H, Moller G, Johansson BB (1988) Immune response in deep cervical lymph nodes and spleen in the mouse after antigen deposition in different intracerebral sites. *Scand J Immunol* 28:563-571.
- Wilbanks GA, Streilein JW (1992) Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 22:1031-1036.
- Williams K, Jr., Ulvestad E, Cragg L, Blain M, Antel JP (1993) Induction of primary T cell responses by human glial cells. *J Neurosci Res* 36:382-390.
- Williams KC, Dooley NP, Ulvestad E, Waage A, Blain M, Yong VW, Antel JP (1995) Antigen presentation by human fetal astrocytes with the cooperative effect of microglia or the microglial-derived cytokine IL-1. *J Neurosci* 15:1869-1878.
- Williams KC, Zhao RW, Ueno K, Hickey WF (1996) PECAM-1 (CD31) expression in the central nervous system and its role in experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *J Neurosci Res* 45:747-757.
- Wolff JA, Fisher LJ, Xu L, Jinnah HA, Langlais PJ, Iuvone PM, O'Malley KL, Rosenberg MB, Shimohama S, Friedmann T, et al. (1989) Grafting fibroblasts genetically modified to produce L-dopa in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9011-9014.
- Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW (1984) Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 310:688-691.
- Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, Charlton HM (1996) Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience* 70:775-789.
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22:1763-1771.

## X

---

- Xiao BG, Zhang GX, Ma CG, Link H (1996) Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1)-mediated inhibition of glial cell proliferation and down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are interrupted by interferon-gamma (IFN-gamma). *Clin Exp Immunol* 103:475-481.

## Y

---

- Yamada S, DePasquale M, Patlak CS, Cserr HF (1991) Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am J Physiol* 261:H1197-1204.
- Yan Q, Matheson C, Lopez OT (1995) In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 373:341-344.
- Yang L, Matthews RT, Schulz JB, Klockgether T, Liao AW, Martinou JC, Penney JB, Jr., Hyman BT, Beal MF (1998) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci* 18:8145-8152.

- Yang J, Bernier SM, Ichim TE, Li M, Xia X, Zhou D, Huang X, Strejan GH, White DJ, Zhong R, Min WP (2003) LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity. *J Leukoc Biol* 74:438-447.
- Yeager MP, DeLeo JA, Hoopes PJ, Hartov A, Hildebrandt L, Hickey WF (2000) Trauma and inflammation modulate lymphocyte localization in vivo: quantitation of tissue entry and retention using indium-111-labeled lymphocytes. *Crit Care Med* 28:1477-1482.
- Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG (2006) Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke* 37:1087-1093.
- Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2:502-511.
- Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15769-15774.
- Yurek DM (1998) Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of dopaminergic neurons in transplants of fetal ventral mesencephalic tissue. *Exp Neurol* 153:195-202.
- Yurek DM, Lu W, Hipkens S, Wiegand SJ (1996) BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons. *Exp Neurol* 137:105-118.

## Z

- 
- Zhang ET, Richards HK, Kida S, Weller RO (1992) Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 83:233-239.
- Zhang GX, Baker CM, Kolson DL, Rostami AM (2000) Chemokines and chemokine receptors in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 6:3-13.
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417:74-78.
- Zipp F, Martin R, Lichtenfels R, Roth W, Dichgans J, Krammer PH, Weller M (1997) Human autoreactive and foreign antigen-specific T cells resist apoptosis induced by soluble recombinant CD95 ligand. *J Immunol* 159:2108-2115.
- Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, Karman J, Sandor M, Fabry Z (2007) Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases. *J Immunol* 178:520-529.

# *ANNEXE*

# Long-Lasting Coexpression of Nestin and Glial Fibrillary Acidic Protein in Primary Cultures of Astroglial Cells With a Major Participation of Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> Cells in Cell Proliferation

Solène Sergent-Tanguy,<sup>1-3</sup> Delphine C. Michel,<sup>1-3</sup> Isabelle Neveu,<sup>1-3</sup>  
and Philippe Naveilhan<sup>1-3\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U643, Nantes, France

<sup>2</sup>Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>3</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

Nestin, a currently used marker of neural stem cells, is transiently coexpressed with glial fibrillary acidic protein (GFAP) during development and is induced in reactive astrocytes following brain injury. Nestin expression has also been found in cultures of astroglial cells, but little is known about the fate and the mitotic activity of nestin-expressing cells in this *in vitro* model. The present study reveals a long-lasting expression of nestin in primary cultures of astroglial cells derived from the rat brain. Over 70% of the cells were nestin<sup>+</sup> at 12 weeks, with a large majority coexpressing the GFAP astrocytic marker. Time-course analyses supported a transition from a nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> to a nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> phenotype over time, which was further increased by cell cycle arrest. Interestingly, double staining with Ki67 revealed that over 90% of cycling cells were nestin<sup>+</sup> whereas only 28% were GFAP<sup>+</sup> in a population consisting of almost equivalent numbers of nestin<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup> cells. These observations indicated that nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells are actively engaged in mitotic activity, even after 2 weeks *in vitro*. Part of these cells might have retained properties of neural stem cells, insofar as 10% of cells in a primary culture of glial cells were able to generate neurospheres that gave rise to both neurons and astrocytes. Further studies will be necessary to characterize fully the proliferating cells in primary cultures of glial cells, but our present results reveal a major contribution of the nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells to the increase in the number of astrocytes, even though nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells proliferate also. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** central nervous system; flow cytometry; gene expression; *in vitro*; intermediate filaments; cell marker

For a long time, astroglial cells have been considered simply as a form of glue and as having a very passive role in the central nervous system (CNS). This,

however, is not the case; astroglial cells are in fact involved in many aspects of neural functions. Astroglial cells are recognized not only by their morphology and their localization but also by their expression of a particular intermediate filament (IF), the glial fibrillary acidic protein (GFAP). This IF protein of 53 kDa is a major component of the astrocyte cytoskeleton and is subjected to sequential remodeling during development, as are other IFs. Around birth, GFAP progressively replaces vimentin, an IF expressed during early developmental stages by immature astroglial cells (Dahl et al., 1981b; Bignami et al., 1982). Nestin has also been found in immature astroglial cells (Kalman and Ajtai, 2001). This 220-kDa IF protein, discovered as the antigen recognized by the monoclonal antibody Rat 401 in rodents (Hockfield and McKay, 1985), is strongly expressed at the prenatal stage by neuroepithelial cells, radial glia, germinal matrix cells, and vascular cells (Lendahl et al., 1990; Dahlstrand et al., 1992, 1995). Its expression subsequently decreases as the brain develops, but it can still be detected in endothelial and certain subventricular cells in the adult brain.

In the developing rat neocortex, a switch in the expression of intermediate filaments has been described in astroglial cells (Kalman and Ajtai, 2001). Indeed, the

The last two authors contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: "Therapeutic Stem Cells" Program (AFM/INSERM); and Contract grant sponsor: "AVENIR" Program (INSERM).

\*Correspondence to: Philippe Naveilhan, INSERM U643, 30 bd. Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France.

E-mail: philippe.naveilhan@univ-nantes.fr

Received 12 September 2005; Revised 21 December 2005; Accepted 15 February 2006

Published online 12 April 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20846

high expression of nestin at P0 is followed by the appearance of GFAP 1 week later. The synthesis of GFAP subsequently increases as the level of nestin protein decreases. The biological significance of this switch remains to be fully determined, but, nestin is currently used as a marker of neural stem cells (NSC) and progenitors (NPC), whereas astroglial cells are identified mainly by GFAP. Of note is a transient coexpression of nestin and GFAP not only during brain development (Messam et al., 2000; Wei et al., 2002) but also in regions such as the subventricular zone (SVZ; Doetsch et al., 1997, 1999) or at the sites of brain lesions (Clarke et al., 1994; Frisen et al., 1995; Lin et al., 1995; Duggal et al., 1997; Holmin et al., 1997; Krum and Rosenstein, 1999; Nakamura et al., 2004) in the adult CNS. These observations suggested a role of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells as NSC or a contribution of these cells to the formation of glial scar. Interestingly, Ernst and Christie (2005) recently showed that the expression of nestin did not predict an active state of proliferation. Indeed, nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells present in the unlesioned neocortex are not actively engaged in mitotic activity, although reactive astrocytes that express nestin in response to injury are mitotically active. Such an observation is of major importance for studies of neurogenesis or neuropathology, and, surprisingly, nothing is known about the fate and the proliferating ability of nestin<sup>+</sup> cells in primary cultures of astroglial cells, an *in vitro* model of astrogliosis. Previous studies have reported an increase in GFAP expression over time in culture and the ability of GFAP<sup>+</sup> cells to proliferate in cultures of astroglial cells (Rohl et al., 2003). Here, we show a long-lasting expression of nestin in astroglial cell cultures derived from the rat brain, together with an increase in number of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells over time. Our results also reveal that most cycling cells express nestin but not GFAP, suggesting a major contribution of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells to the increased number of astrocytes even after 15 days *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

Every effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used. Animals were manipulated in compliance with our institutional guidelines.

### Cell Culture

All the culture reagents were from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) except when otherwise indicated. Primary cultures of astroglial cells were established from the cortex of newborn rats as previously described (Neveu et al., 1993; Sergent-Tanguy et al., 2003). Cortices freed of meninges were incubated with 0.25% of trypsin for 15 min at 37°C. After addition of 10% fetal calf serum (FCS), tissues were exposed to 10 µg/ml of DNase I for 10 min before mechanical trituration. Aggregates were removed by decantation and cells were further purified of small debris by centrifugation. Cells were resuspended and plated at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in poly-L-ornithine-coated (PORN) dishes (5 µg/ml). Cells

were grown in basal culture medium composed of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/Ham's F12 (1/1, v/v), 33 mM glucose, 5 mM HEPES (pH 7.2), 5 µg/ml streptomycin, and 5 UI/ml penicillin, supplemented with 10% FCS (serum-supplemented medium) for the indicated period of time. HiB5 cells were grown as previously described (Renfranz et al., 1991).

### Treatment With Mitogens

To investigate the presence of NSC in primary cultures of glial cells, 2-week-old cultures were dissociated with 0.25% trypsin. The cells were then centrifuged, resuspended in serum-free medium, and treated as follows. A portion of the cells (control cells) was plated into PORN dishes (5 µg/ml) and grown in serum-supplemented medium. Another portion (mitogen-treated cells) was plated into uncoated dishes and grown in basal culture medium + N2 supplement (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), referred to as *defined medium*, supplemented with 10 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF). Proliferating cells were labeled by adding 10 µg/ml of bromodeoxyuridine (BrdU; Roche, Basel, Switzerland). One week later, untreated and mitogen-treated cells were collected and plated into PORN dishes (50 µg/ml) at  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. The cells were then incubated overnight in serum-supplemented medium before being transferred to defined medium for 10 days. Capacity of the cells to form neurospheres under mitogen treatment was quantitatively estimated by plating  $1 \times 10^4$  cells in 10-cm<sup>2</sup> plates and growing them for 1 week in 3 ml of defined medium supplemented with 10 ng/ml FGF-2 and 10 ng/ml EGF.

### Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-GFAP (Sigma-Aldrich; 1/800), rabbit polyclonal anti-GFAP (Dako, Trappes, France; 1/500), mouse monoclonal antinestin [rat 401; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA; 1/1,000], mouse monoclonal anti-Ki67 (Novocastra Laboratories, Newcastle, United Kingdom; 1/200), mouse monoclonal anti-BrdU (DSHB; 1/100), mouse monoclonal anti-β-tubulin isotype III (Tuj-1; Sigma-Aldrich; 1/1,000), and rabbit polyclonal anti-HuB (Chemicon, Temecula, CA; 1/100).

Astroglial cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min at room temperature (RT), washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), and incubated for 30 min at RT in 1× PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA), 0.1% Triton, and 10% normal goat serum (NGS). The cells were subsequently exposed to primary antibodies diluted in the same buffer overnight at 4°C, washed three times and incubated for 2 hr at RT with fluorescein (FITC)- or phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse IgG or FITC-conjugated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, United Kingdom; 1/200) diluted in PBS-4% BSA.

To detect proliferating cells, cells were incubated for 30 min at 37°C with an anti-BrdU antibody diluted 1/100 in a solution of 1× PBS, 4% BSA, and 1% MgCl<sub>2</sub> supplemented with 1 µg/ml DNase I. After three washes, the cells were

incubated for a further 30 min at 37°C with FITC-conjugated anti-mouse IgG (1/200 in PBS-4% BSA). The cells were then fixed with 4% PFA before undergoing a second round of immunocytochemistry as described above.

For cell cycle staining, the cells were incubated overnight at 4°C with a monoclonal anti-Ki67 antibody (1/200). Thereafter, the cells were rinsed and incubated with anti-IgG antibodies coupled to peroxidase. Revelation was performed by using diaminobenzidine (DAB; Vector, Peterborough, United Kingdom) in the presence of NiCl<sub>2</sub>, giving a black staining. After peroxidase inactivation, a second staining with anti-GFAP or anti-nestin antibodies was performed under the same conditions except that the revelation was carried out with DAB to give a brown staining. Ki67<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> and Ki67<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> cells therefore displayed a black nuclei and a brown cytoplasm. The percentage of Ki67<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> and Ki67<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> cells was determined on DAB/DAB-nickel staining, but immunocytochemistry was performed with PE- and FITC-conjugated secondary antibodies for the illustrations.

### Flow Cytometry

Flow cytometry analyses were performed according to a previously described protocol (Sergent-Tanguy et al., 2003). Astroglial cells were detached with 0.5% trypsin, washed, and triturated to a single cell suspension in PFN buffer (1× PBS supplemented with 2% FCS and 0.1% sodium azide). Cells were then transferred into 96-well U-bottom microtiter plates, fixed in 2% PFA for 20 min on ice, washed, and incubated in PBS-0.5% saponin for 20 min on ice. After three washes in PBS-0.1% saponin, cells were incubated for 30 min on ice with primary antibodies directed against GFAP (1/800), 3CB2 (1/500), nestin (1/1,000),  $\beta$ -tubulin isotype III (1/3,000), or RIP (1/500) in PBS containing 0.1% saponin. After a further three washes, the cells were incubated for 30 min with an FITC anti-mouse IgG or IgM (1/200) diluted in PBS-0.1% saponin. The cells were then washed in PBS-0.1% saponin and resuspended in PFN prior to FACS analyses.

For CD31 analyses, single cell suspensions were prepared as described above except that saponin was omitted in all the steps. The cells were first incubated for 30 min with an anti-CD31 antibody (TLD-3A12; BiotAtlantic, Nantes, France) and then with an FITC-conjugated anti-mouse IgG (1/200).

Cellular fluorescence was measured immediately after staining with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with an argon laser emission of 488 nm. FITC was identified by using a 530-nm bandpass filter. Analysis was performed in CellQuest software (Becton Dickinson). A primary gate based on physical parameters [forward and side light scatter (FSC and SSC, respectively)] was set to exclude dead cells or debris. The background level was estimated by omitting the primary antibody.

### Western Blot

Cells were washed briefly with PBS and scraped in one volume of lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% NP40, 100  $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 1  $\mu$ g/ml aprotinin]. Proteins were cleared of cell debris by centrifugation at 12,000g

for 2 min (4°C). Protein concentration was determined using the BCA protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). The lysates were stored in aliquots at -80°C.

Protein samples (10  $\mu$ g) were incubated at 100°C for 2 min in loading buffer (lysis buffer + comassie blue + dithiothreitol) before being separated by SDS-PAGE on 4% stacking and 10% running gels. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting at 400 mA (30 min) in blot buffer (25 mM Tris, 150 mM glycine, and 10% methanol). The membranes were blocked for 30 min in PBS-0.1% Tween-5% nonfat dry milk at room temperature, washed three times with PBS-Tween, and incubated with primary antibodies (anti-GFAP or anti-nestin) for 1 hr at RT. After three washes in PBS-Tween, the membranes were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibodies at RT for 1 hr and developed by using the ECL chemiluminescence procedure.

## RESULTS

### Long-Lasting Expression of Nestin in Primary Astroglial Cell Cultures

The temporal expression of IFs was analyzed in primary cultures of astroglial cells grown in serum-supplemented medium. The percentage of cells expressing nestin or GFAP was determined from the day after plating (week 0) until 12 weeks (weeks 1–12). The phenotypic profile of the cells was examined by flow cytometry. As expected, the percentage of cells immunoreactive for GFAP increased continuously over the culture period (Fig. 1A). One day after plating, 24.5%  $\pm$  2.0% of the cells were GFAP<sup>+</sup>. This number doubled rapidly; 49.4%  $\pm$  0.4% of the cells were immunopositive for GFAP at 2 weeks. This percentage further increased, reaching a plateau at 8 weeks with 78.3%  $\pm$  2.14% of GFAP<sup>+</sup> cells. In contrast to GFAP, a high proportion of cells was found to express nestin during the first 2 weeks of culture. Indeed, 67.2%  $\pm$  1.0% and 76.5%  $\pm$  5.6% of the cells were nestin<sup>+</sup> the day after plating (week 0) and after 1 week (week 1) *in vitro*, respectively (Fig. 1B). This percentage slightly decreased during the following 2–6 weeks, but, surprisingly, 79.3%  $\pm$  2.3% of the cells were immunoreactive for nestin at 8 weeks. The cells were grown in serum-supplemented medium for 4 more weeks to favor their maturation. However, 78% of the cells were still nestin<sup>+</sup> at 12 weeks, a percentage similar to the number of nestin<sup>+</sup> cells at 1 week (76.5%; Fig. 1B). Transfer into defined medium with or without 5  $\mu$ M of forskolin for 4 days before analyses, did not provoke any significant decrease in the amount of nestin<sup>+</sup> cells (data not shown). These time-dependent variations in the expression of GFAP ( $P = 0.0001$ ) and nestin ( $P = 0.0024$ ) were all statistically different (one-way ANOVA).

### Verification of Nestin Staining by Western Blot

The large number of nestin<sup>+</sup> cells at 8–12 weeks prompted us to verify the specificity of the staining. Western blot analyses were performed with samples prepared from 2-week-old glial cell cultures. With the anti-

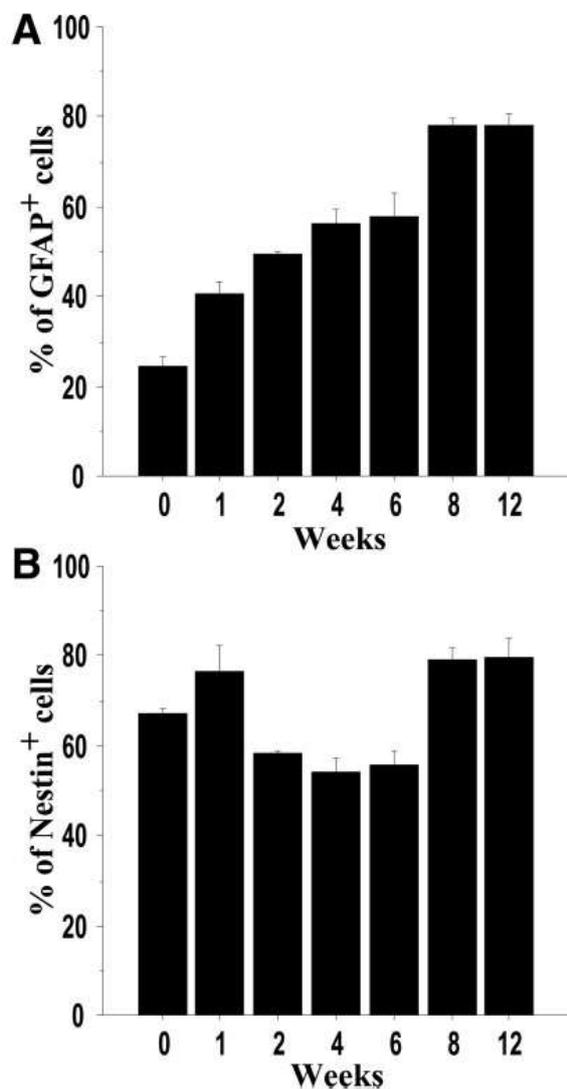


Fig. 1. Percentage of GFAP<sup>+</sup> (A) and nestin<sup>+</sup> (B) cells in primary cultures of astroglial cells. Time-course studies. Cells were cultured in FCS-supplemented medium, and the number of cells expressing GFAP or nestin was estimated by flow cytometry 1 day after plating (week 0) or at 1, 2, 4, 6, 8, and 12 weeks in vitro. Values are means  $\pm$  SEM, n = 3.

nestin antibody rat 401, a band of 220 kDa was detected (Fig. 2A). The band exhibited the same running pattern as protein extract isolated from HiB5, a cell line known to express nestin (Renfranz et al., 1991). The analyses also revealed the presence of a 55-kDa band corresponding to GFAP. This band was found in 2-week-old glial cell cultures but not in the HiB5 protein extract, in accordance with the lack of GFAP expression by this cell line.

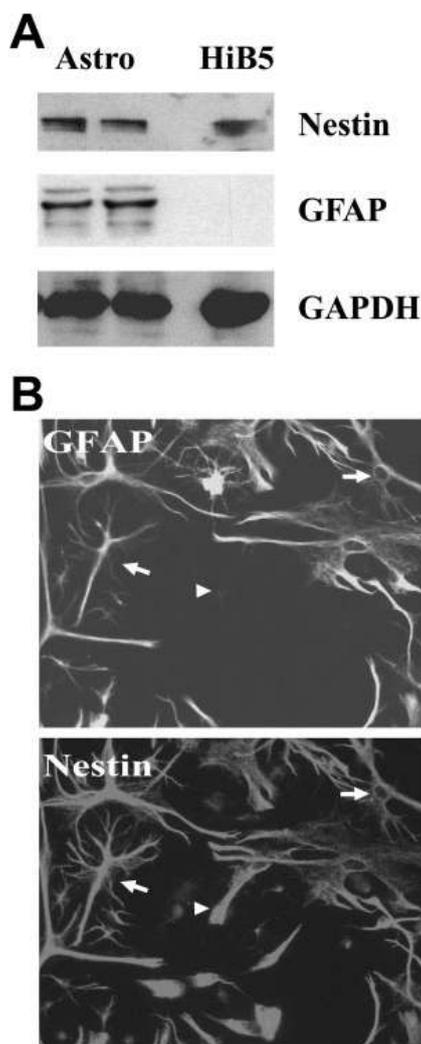


Fig. 2. Verification of nestin and GFAP expression in 2-week-old primary cultures of astroglial cells. **A:** Western blot. The cells were grown for 2 weeks in FCS-supplemented medium before being lysed, and the protein extracts were separated on 10% SDS-PAGE gels. Western blot analyses were performed with antibodies raised against nestin and GFAP. HiB5, a cell line known to express nestin but not GFAP, was used as a control. **B:** Immunocytochemistry. The cells were fixed with 4% PFA and sequentially immunostained with antibodies directed against GFAP and nestin. Arrows, nestin<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup> cells; arrowhead, nestin<sup>+</sup>GFAP<sup>-</sup> cell.

#### Coexpression of Nestin and GFAP in Primary Cultures of Astroglial Cells

Because of the long-lasting expression of nestin in primary cultures of rat glial cells, double-staining immunocytochemistry was performed to determine whether this IF was expressed by GFAP<sup>+</sup> cells. The photos in

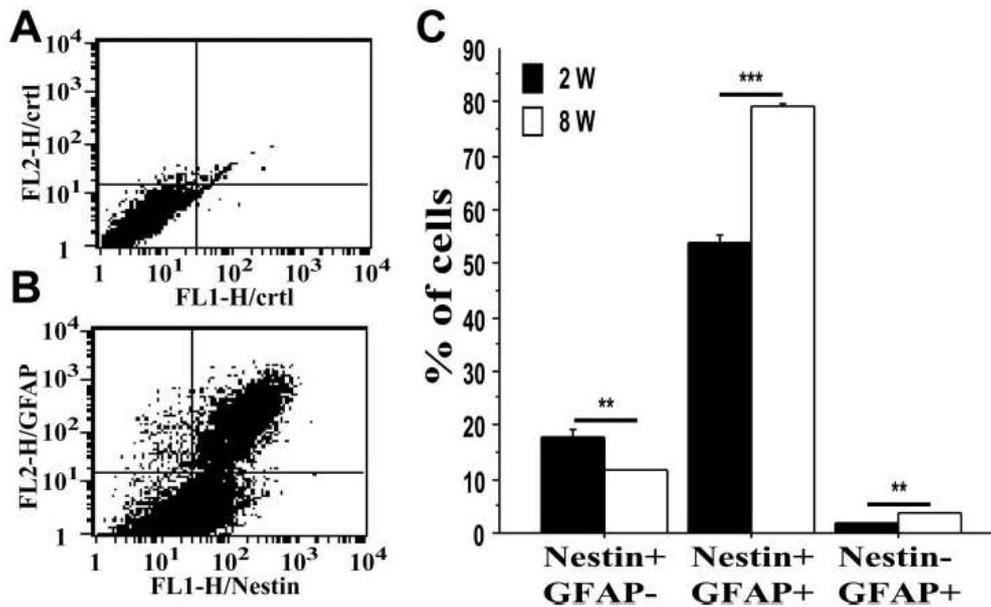


Fig. 3. Percentage of nestin<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup> cells in primary cultures of astroglial cells. The cells were grown for 2 or 8 weeks in serum-supplemented medium, prior to detachment with trypsin, fixation, and sequential labeling with antibodies directed against nestin (FL1-H)

and GFAP (FL2-H). The number of single- or double-immunopositive cells was estimated by flow cytometry (B) and plotted (C). The background level was estimated with secondary antibodies (A). Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

Figure 2B (arrows) clearly show double-labeled cells, staining positive for nestin and GFAP at 2 weeks in vitro. Quantification with two-color flow cytometry indicated that  $46.7\% \pm 2.3\%$  of the cells were nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>. Very few cells ( $2.3\% \pm 0.2\%$ ) expressed only GFAP, whereas  $23\% \pm 1.7\%$  of the cells were nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> (Fig. 3). Later in the culture, a significant decrease in the number of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells was observed, together with an increase in the number of nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells (Fig. 3), although the major changes concerned the nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cell population, in that  $79.4\% \pm 0.2\%$  of the cells expressed both IFs at 8 weeks in vitro. Because nestin was reported to be expressed by brain endothelial cells, we searched for an eventual presence of these cells in primary cultures of glial cells by using an antibody directed against CD31, a marker of endothelial cells. However, no CD31<sup>+</sup> cell was detected as determined by flow cytometry ( $0.68 \pm 0.12$ ,  $n = 3$ ).

#### Blockade of Cell Division Increases the Number of Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> Cells

The decrease in the percentage of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells over time in culture prompted us to determine whether these cells were the actively dividing population in primary cultures of glial cells. Cultures were then treated with 100 nM of AraC, and immunocytochemistry was performed to determine whether blockade of cell division led to a down-regulation of nestin expression.

Surprisingly, a 3-day treatment with the antimetabolic drug did not inhibit the expression of nestin but selectively decreased the number of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells and increased the percentage of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells (Fig. 4C). The 3-D representation clearly shows a decrease in the peak corresponding to nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells in AraC-treated cultures (arrow, Fig. 4B) compared with control cells (Fig. 4A).

#### Most Cycling Cells Express Nestin but Not GFAP

For correlation of the expression of nestin and GFAP with the quiescent or proliferating state of the cells, immunocytochemistry was performed with an antibody raised against Ki67, a nuclear protein expressed in the late G1, S, G2, and M phases, which labels proliferating cells in the rat (Gerlach et al., 1997). The results indicate that  $17.2\% \pm 2.8\%$  (value  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ) of the total cell population were immunopositive for Ki67 at 2 weeks. Strikingly, only  $27.8\% \pm 3.1\%$  of these Ki67<sup>+</sup> cells were GFAP<sup>+</sup>, whereas  $92.4\% \pm 1.8\%$  were nestin<sup>+</sup> (Fig. 5).

#### Formation of Neurospheres From Cells Derived From Primary Glial Cell Cultures

Because of the long-lasting expression of nestin, we analyzed the capacity of cells derived from primary cultures of rat glial cells to form neurospheres upon treatment with mitogen and to differentiate into neurons.

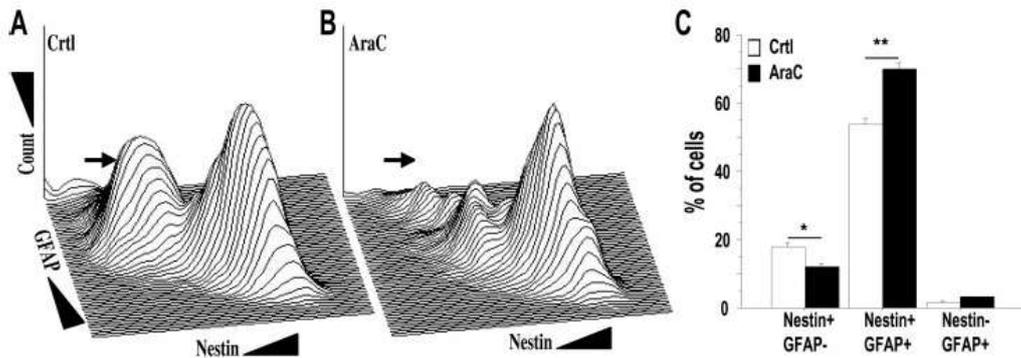


Fig. 4. Effect of cell cycle arrest on the number of GFAP<sup>+</sup> and nestin<sup>+</sup> cells. Two-week-old primary cultures of astroglial cells were treated for 3 days with 100 nM of AraC (solid bars) or vehicle (open bars). The cells were detached using trypsin, fixed, and labeled with antibodies directed against nestin or GFAP. Analyses were performed by two-color flow cytometry. C: Percentage of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>,

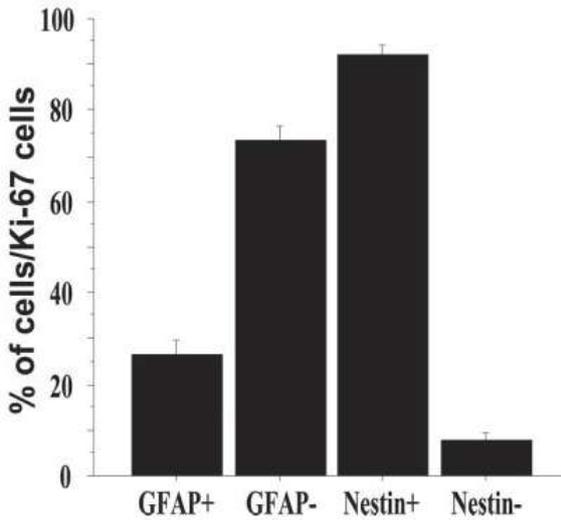
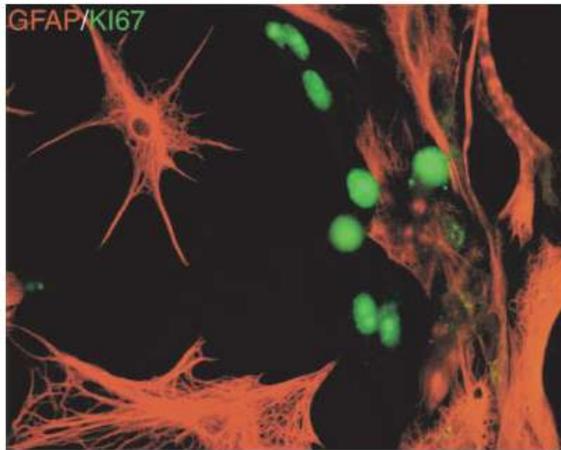
nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, and nestin<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells in primary astroglial cell cultures treated with vehicle (Ctrl) or AraC. Values are the means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . A,B: 3-D representation of two-color flow cytometry of cells treated with vehicle (A) or AraC (B). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , unpaired  $t$ -test, means  $\pm$  SEM.

For this purpose, 2-week-old primary cultures were dissociated and plated in the absence or presence of EGF/FGF-2 as indicated in the Materials and Methods. Control cells grown for 1 week in PORN-coated plates in serum-supplemented medium formed a cell monolayer. In contrast, cells cultured with mitogens in uncoated dishes formed neurospheres (data not shown). Eventual changes in the capacity of forming neurospheres over time in culture were evaluated by comparing the number of neurospheres in 2- and 4-week-old glial cell cultures treated with EGF/FGF-2. The results indicated a significantly lower percentage ( $6\% \pm 1\%$ ,  $n = 3$ ) of neurospheres in 4-week-old cultures compared with 2-week-old cultures ( $9.7\% \pm 0.7\%$ ,  $n = 3$ ). The multipotencies of control and mitogen-treated cells were then analyzed by placing the cells in differentiating conditions. The cells were collected, plated into PORN-coated dishes, incubated overnight in serum-supplemented medium, and grown in defined medium for 10 days. Immunocytochemistry and flow cytometry analyses indicated a high number of nestin<sup>+</sup> cells in cultures derived from control cells ( $72\% \pm 0.7\%$ ; Figs. 6, 7). The expression of GFAP was restricted to a rather small number of cells ( $23.7\% \pm 0.5\%$ ), and Tuj-1<sup>+</sup> cells were occasionally detected (less than  $0.5\% \pm 0.2\%$ ). Higher numbers ( $85.6\% \pm 0.9$ ) of nestin<sup>+</sup> cells were observed in cultures derived from mitogen-treated cells compared with control cells. More importantly, 2.5- and 8.4-fold increases in the number of GFAP<sup>+</sup> and Tuj-1<sup>+</sup> cells, respectively, were also noted, insofar as  $58.7\% \pm 1.7\%$  of GFAP<sup>+</sup> cells and  $4.2\% \pm 0.4\%$  of Tuj-1<sup>+</sup> cells were detected in cultures derived from cells forming neurospheres (Fig. 6). These Tuj-1<sup>+</sup> cells were newly generated neurons; approximately 50% expressed BrdU when nucleotide was added to the medium during the mitogen treatment (Fig. 7B, arrows). The appearance of newly generated neurons was confirmed by using an antibody directed

against HuB, another neuronal marker (Fig. 7C). Finally, we checked the capacity of individual neurosphere to generate both astrocytic and neuronal cell types under differentiating conditions. The results indicated that  $82.7\% \pm 3.3\%$  of the neurospheres gave rise to both neurons and astrocytes, whereas  $17.3\% \pm 3.3\%$  generated only astrocytes ( $n = 4$ ).

## DISCUSSION

In the present paper, we report on the long-lasting expression of nestin in primary cultures of astroglial cells derived from rat cerebral hemispheres. Typically, nestin expression is expected to decrease while cell progenitors differentiate and acquire a mature phenotype. Experiments performed in vitro on human neural progenitors have shown that nestin is down-regulated, reaching undetectable levels within 12 days, a decrease that is accompanied by the appearance of  $\beta$ -tubulin and GFAP (Carpenter et al., 1999). However, in astrocyte monolayers derived from the mouse cerebral cortex and cultured for 10 days in serum-containing medium, more than 95% of the cells were found to express nestin (Laywell et al., 2000). Here, we show an expression of nestin over 12 weeks in primary cultures of rat astroglial cells. One hypothesis is that the lack of growth factor or inadequate cellular environment prevents the full differentiation of astrocytes in vitro (Mi et al., 2001; Zhou et al., 2001; Schmidt-Kastner and Humpel, 2002). However, this long-lasting expression is reminiscent of that observed for vimentin, and, as previously shown in well-differentiated cultures of astroglial cells (Chiu et al., 1981; Schnitzer et al., 1981; Ciesielski-Treska et al., 1988; Bignami and Dahl, 1989), an expression of vimentin for up to 8 weeks was observed under our culture conditions (data not shown). Such long-lasting expression of vimentin and nestin may be due to the fact that



astroglial cells in culture exhibit many features of reactive glial cells (Wu and Schwartz, 1998). Indeed, as with vimentin (Dahl et al., 1981a; Pixley and de Vellis, 1984), nestin has been detected in reactive astroglial cells in several experimental models of brain lesions in the adult rat (Clarke et al., 1994; Duggal et al., 1997; Holmin et al., 1997; Krum and Rosenstein, 1999), and, in some cases, nestin-immunoreactive astroglial cells have been observed for up to 1–13 months following injury to the CNS (Frisen et al., 1995; Lin et al., 1995; Nakamura et al., 2004). The exact biological significance of nestin reappearance and GFAP up-regulation in reactive astroglial cells is not yet known, but modifications in IF composition have been suggested to be important for the changes in cell shape that accompany astrogliosis. The transient coexpression of nestin and GFAP during brain development (Messam et al., 2000; Wei et al., 2002) or after brain injury probably confers astroglial cells with particular properties that remain to be defined.

In the present study, we showed that arrest of cell division increased the percentage of cells coexpressing the two IFs. Complementary analyses with Ki67 indicated that 17% of the culture were actively cycling and that over 90% of these proliferating cells expressed nestin, whereas only 28% were immunoreactive for GFAP in a total population, consisting of almost equivalent numbers of nestin<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup> cells. Changes in the phosphorylation state of GFAP occur during mitosis (for review see Inagaki et al., 1994), but such variations cannot explain the low percentage of cycling cells expressing GFAP, because the antibodies that we used labeled both its unphosphorylated and phosphorylated forms. Another possibility is a cell-cycle-dependent synthesis of GFAP, a hypothesis supported by the work of Rolland et al. (1990), who showed a rapid turnover of GFAP in proliferating astroglial cells, whereas mature cells exhibit a much more stable expression. The fast-decaying pool of GFAP has been suggested to have a role in cell division, whereas the stable pool is thought to be implicated more in the stabilization of the shape and integrity of mature astroglial cell processes (Rolland et al., 1990). The expression of a fast-decaying pool of GFAP in astroglial cell cultures during the first 2 weeks might then explain the low numbers of ki67<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells that we observed. Alternatively, the nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells might have a lower rate of proliferation than the nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells. The low number of cell divisions in C6 cells overexpressing GFAP (Toda et al., 1994, 1999) supports such a possibility. In addition, GFAP<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> B cells located in the adult SVZ were reported

Fig. 5. Characterization of cycling cells in primary cultures of astroglial cells. Two-week-old primary cultures of astroglial cells grown in serum-supplemented medium were fixed, immunostained with anti-Ki67 antibodies and then labeled with antibodies directed against GFAP (A) or nestin (B). The percentage of Ki67<sup>+</sup> cells expressing GFAP or nestin was determined and plotted (C). Values are mean ± SEM, n = 5–6.

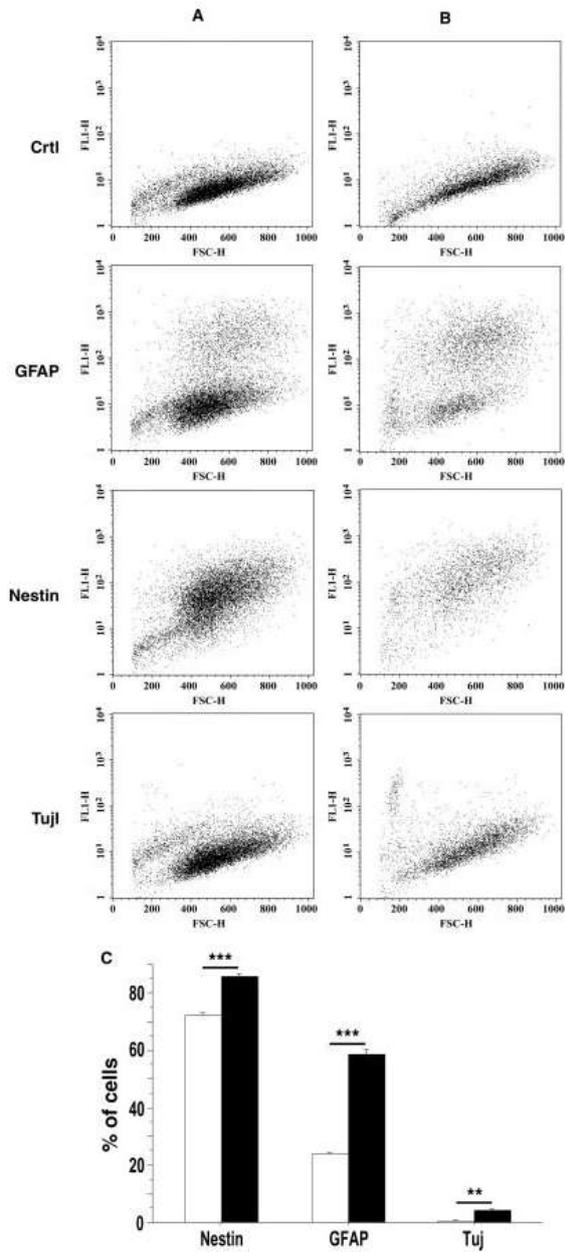


Fig. 6. Effect of mitogen treatment on cells derived from primary cultures of astroglial cells. Primary cultures were processed and treated (B) or not (A) with EGF and FGF-2 as described in Materials and Methods. Cells derived from untreated and mitogen-treated cultures were then characterized by flow cytometry using antibodies raised against Tuj-1, GFAP, and nestin. Quantitative analysis are plotted in C (control, open bars; EGF/FGF treatment, solid bars). The background level was estimated with secondary antibodies. Values are mean  $\pm$  SEM, n = 3.

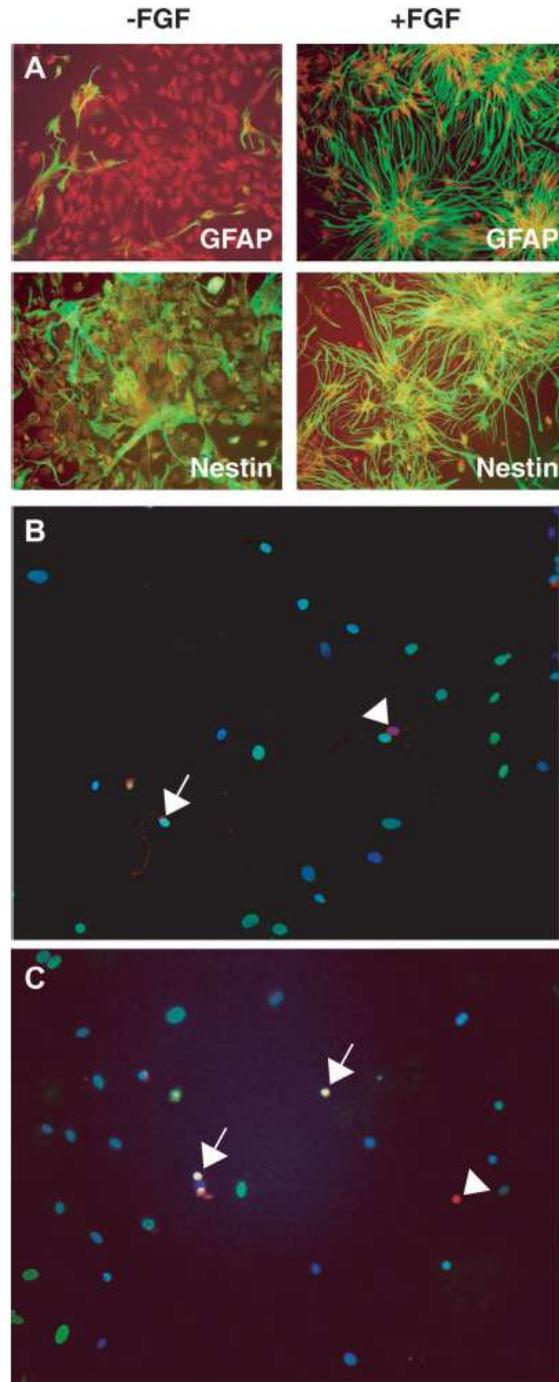


Figure 7.

as slowly proliferating cells, whereas type C cells that expressed nestin but not GFAP were described as rapidly dividing immature precursors (Doetsch et al., 1997, 1999).

The presence of nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells in astroglial cultures suggested the presence of cells that might have retained properties of NSCs, such as the capacity of proliferation upon treatment with mitogen and the possibility of generating neurons and astroglial cells as shown in mice (Laywell et al., 2000). Here, we show that about 10% of the cells in 2-week-old cultures generate neurospheres following exposure to FGF-2/EGF and that more than 80% of these neurospheres give rise to both astrocytes and neurons under differentiating conditions. These observations emphasize the multipotent character of the neurosphere-forming cells, which is further confirmed by the presence of newly formed neurons as indicated by the detection of BrdU<sup>+</sup>/Tuj-1<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup>/HuB<sup>+</sup> cells when the neurospheres are placed under differentiating conditions. Whether the neurosphere-forming cells correspond to the nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells remains to be determined, but, if so, only 40% retain properties of NSCs. Alternatively, cell-forming neurospheres might be derived from GFAP-expressing cells (Laywell et al., 2000), in that astroglial cells derived from the brain of embryonic or adult mice exhibit NSC properties upon contact with particular environmental factors (Doetsch et al., 1999; Laywell et al., 2000; Skogh et al., 2001). As we have shown in the present study, primary cultures of astroglial cells contained cells that retained properties of NSC; however, this observation does not mean that these cells are the ones that generate GFAP<sup>+</sup> cells under standard conditions of astrocyte cultures. Indeed, NSCs are usually grown in serum-free medium supplemented with mitogens, and nothing is known about their proliferative capacity in serum-supplemented medium.

Further studies will be necessary to characterize fully the nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells present in primary cultures of astroglial cells, but our present work has revealed that over 75% of the cells still expressed nestin at 12 weeks in vitro. We have also provided the first evidence that nestin<sup>+</sup> cells are mitotically active in standard conditions of astroglial cell cultures. Finally, we showed that

nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> cells and nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells are both capable of proliferating in 2-week-old cultures, but the former contribute more to the increase in cell number, insofar as most cycling cells express nestin but not GFAP.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are particularly grateful to Dr. Philippe Brachet and Prof. Jean-Paul Soulillou for their support and encouragement. We also thank Joanna Ashton-Chess for editing the manuscript. The nestin monoclonal antibody was developed by Susan Hockfield and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa Department of Biological Sciences. S.S.-T. and D.C.M. were supported by fellowships from INSERM/Région Pays de Loire.

#### REFERENCES

- Bignami A, Dahl D. 1989. Vimentin-GFAP transition in primary dissociated cultures of rat embryo spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 7:343-357.
- Bignami A, Raju T, Dahl D. 1982. Localization of vimentin, the non-specific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. In vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev Biol* 91:286-295.
- Carpenter MK, Cui X, Hu Z-y, Jackson J, Sherman S, Seiger A, Wahlberg LU. 1999. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol* 158:265-278.
- Chiu FC, Norton WT, Fields KL. 1981. The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J Neurochem* 37:147-155.
- Ciesielski-Treska J, Goetschy JF, Ulrich G, Aunis D. 1988. Acquisition of vimentin in astrocytes cultured from postnatal rat brain. *J Neurocytol* 17:79-86.
- Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Tumer DA. 1994. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* 5:1885-1888.
- Dahl D, Bignami A, Weber K, Osborn M. 1981a. Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration: localization of vimentin, the fibroblastic 100-A filament protein, in normal and reactive astrocytes. *Exp Neurol* 73:496-506.
- Dahl D, Rueger DC, Bignami A, Weber K, Osborn M. 1981b. Vimentin, the 57 000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur J Cell Biol* 24:191-196.
- Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. 1992. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 52:5334-5341.
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. 1995. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 84:109-129.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Duggal N, Schmidt-Kastner R, Hakim AM. 1997. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 768:1-9.

Fig. 7. Characterization of secondary cultures prepared from mitogen-treated primary cultures of glial cells. **A:** Photomicrographs showing immunofluorescent staining for GFAP or nestin. Secondary cultures prepared from mitogen-treated cells (+EGF/FGF-2) or control cells (-EGF/FGF-2) and maintained for 2 weeks in differentiating conditions were labeled with antibodies directed against GFAP or nestin (green). Nuclei were stained with propidium iodide (red). **B,C:** Photomicrographs showing immunofluorescent staining for neuronal markers. Mitogen-treated cells (+EGF/FGF-2) were incubated with BrdU for 7 days and replated into PORN-coated dishes under differentiating conditions for 2 weeks. Triple staining was performed with anti-BrdU antibodies (green), DAPI (blue), and then antibodies directed against Tuj-I (red; B) or HuB (red; C). Merged micrograph are presented (B,C). Arrows indicate BrdU<sup>+</sup> neurons; arrowheads correspond to BrdU<sup>-</sup> neurons.

- Emst C, Christie BR. 2005. The putative neural stem cell marker, nestin, is expressed in heterogeneous cell types in the adult rat neocortex. *Neuroscience* (in press).
- Frisen J, Johansson CB, Torok C, Risling M, Lendahl U. 1995. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131:453–464.
- Gerlach C, Golding M, Lanue L, Alison MR, Gerdes J. 1997. Ki-67 immunoreactivity is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest* 77:697–698.
- Hockfield S, McKay RD. 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5:3310–3328.
- Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T. 1997. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* 9:65–75.
- Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. 1994. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* 4:239–243.
- Kalman M, Ajtai BM. 2001. A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin. *Int J Dev Neurosci* 19:101–108.
- Krum JM, Rosenstein JM. 1999. Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *Exp Neurol* 160:348–360.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. 2000. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13883–13888.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595.
- Lin RC, Matesic DF, Marvin M, McKay RD, Brustle O. 1995. Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis* 2:79–85.
- Messam CA, Hou J, Major EO. 2000. Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Exp Neurol* 161:585–596.
- Mi H, Haerberle H, Barres BA. 2001. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci* 21:1538–1547.
- Nakamura T, Miyamoto O, Auer RN, Nagao S, Itano T. 2004. Delayed precursor cell markers expression in hippocampus following cold-induced cortical injury in mice. *J Neurotrauma* 21:1747–1755.
- Neveu I, Jehan F, Jandrot-Perrus M, Wion D, Brachet P. 1993. Enhancement of the synthesis and secretion of nerve growth factor in primary cultures of glial cells by proteases: a possible involvement of thrombin. *J Neurochem* 60:858–867.
- Pixley SK, de Vellis J. 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* 317:201–209.
- Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RD. 1991. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 66:713–729.
- Rohl C, Held-Feindt J, Sievers J. 2003. Developmental changes of parameters for astrogliosis during cultivation of purified cerebral astrocytes from newborn rats. *Brain Res Dev Brain Res* 144:191–199.
- Rolland B, Le Prince G, Fages C, Nunez J, Tardy M. 1990. GFAP turnover during astroglial proliferation and differentiation. *Brain Res Dev Brain Res* 56:144–149.
- Schmidt-Kastner R, Humpel C. 2002. Nestin expression persists in astrocytes of organotypic slice cultures from rat cortex. *Int J Dev Neurosci* 20:29–38.
- Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. 1981. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol* 90:435–447.
- Sergent-Tanguy S, Chagneau C, Neveu I, Naveilhan P. 2003. Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population. *J Neurosci Methods* 129:73–79.
- Skogh C, Eriksson C, Kokaia M, Meijer XC, Wahlberg LU, Victorin K, Campbell K. 2001. Generation of regionally specified neurons in expanded glial cultures derived from the mouse and human lateral ganglionic eminence. *Mol Cell Neurosci* 17:811–820.
- Toda M, Miura M, Asou H, Toya S, Uyemura K. 1994. Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by glial fibrillary acidic protein cDNA transfection. *J Neurochem* 63:1975–1978.
- Toda M, Miura M, Asou H, Sugiyama I, Kawase T, Uyemura K. 1999. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Res* 24:339–343.
- Wei LC, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS. 2002. Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Brain Res Dev Brain Res* 139:9–17.
- Wu VW, Schwartz JP. 1998. Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J Neurosci Res* 51:675–681.
- Zhou R, Wu X, Skalli O. 2001. TGF- $\alpha$  induces a stationary, radial-glia like phenotype in cultured astrocytes. *Brain Res Bull* 56:37–42.

### **Les réactions immunes dans les xénogreffes intracérébrales : mécanisme et prévention.**

La transplantation de neurones fœtaux d'origine humaine est une des stratégies thérapeutiques envisagées pour compenser les pertes cellulaires survenant lors de maladies neurodégénératives. Les problèmes éthiques et l'accès limité à ces neurones limitent le développement de cette approche et font apparaître la transplantation de neuroblastes porcins (NBp) comme une alternative intéressante, même si les problèmes de rejet restent à maîtriser. Pour comprendre et tenter de contrôler ce phénomène, nous avons utilisé comme modèle la greffe de NBp dans le striatum de rat. Dans ce modèle, le rejet des NBp intervient 5 à 7 semaines post-greffe et est accompagné d'une infiltration massive du greffon par des cellules microgliales/macrophages et des lymphocytes T (LT). La survie prolongée des NBp observée après un traitement par la minocycline suggère un rôle important du processus inflammatoire dans le rejet. Cet antibiotique pourrait notamment intervenir en limitant l'activation de certaines cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans les jours qui suivent la greffe. Outre les cellules microgliales activées, nos analyses ont révélé la présence d'autres CPA au sein de la greffe. Ces cellules appelées cellules dendritiques (CD) sont présentes dès 3 jours après l'opération. Les CD étant les seules cellules capables d'initier une réponse immune spécifique via l'activation de LT naïfs, elles pourraient jouer un rôle majeur dans l'initiation du processus de rejet. De plus, la co-localisation des CD et des LT au sein de la greffe à J42 ouvre la possibilité d'une restimulation locale des LT par les CD pour induire un rejet rapide des cellules greffées. Un des derniers points étudiés concerne l'intérêt des précurseurs neuraux porcins (PNp) comme source cellulaire. La survie prolongée des PNp dans un striatum de rat comparativement à des NBp suggère que la greffe de ces précurseurs permettrait de minimiser la réaction de rejet lors d'une xénogreffe dans le système nerveux central en plus de traitements immunosuppresseurs locaux ou systémiques.

**MOTS CLES : Xénotransplantation, Maladie de Parkinson, Réponse immunitaire, Cellules souches, lymphocytes T, cellules microgliales, cellules dendritiques.**

---

### **Immune response in case of intracerebral xenografts : mechanism and prevention**

Transplantation of human fetal neurons is an interesting restorative approach for central nervous system (CNS) disorders such as Parkinson's disease. However, the limited accessibility to human embryonic neurons and the ethical problems regarding their use impair the development of this approach. In this context, porcine neuroblasts (pNB) appear as an interesting source of transplantable cells, even if the rejection problems remain to be solved. To understand and control the rejection mechanisms occurring in the CNS, we used as a model, the transplantation of pNB into the rat striatum. In this model, the pNB are rejected within 5 to 7 weeks and the phenomenon is accompanied by T cell infiltration and microglial cell activation. The long survival of pNB in case of treatment of the rats with minocycline suggests an important role of the inflammatory reaction in the rejection processes. This antibiotic may intervene by reducing the activation of antigen presenting cells (APC) just after cell grafting. Besides the activated microglial cells, our analyses reveal the presence of other APC inside the graft. These cells called dendritic cells (DC) are present as soon as 3 days post-grafting. Since they are the only cells capable of initiating a specific immune response by priming naïve T cells in deep cervical ganglia, they may have a major role in the initiation of rejection processes. In addition, the co-localisation of DC and T cells in the graft at day 42 raises the possibility of a local restimulation of T cells by DC, inducing a rapid rejection of xenogeneic cells. In the last point our studied concerns the advantage of using porcine neural precursor cells (pNPC) as a source of transplantable cells. The longer survival of pNPC in the rat striatum as compared to pNB suggests that the transplantation of these precursors might be one way to reduce the rejection process in case of intracerebral xenografting in addition to local or systemic immunosuppressive treatments.

**KEY WORDS: Xenotransplantation, Parkinson's disease, Immune response, Stem cells, T cells, microglial cells, dendritic cells.**