

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Ecole Doctorale des génomes aux organismes

Thèse de Doctorat
Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Laetitia AUBRY

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Evry Val d'Essonne

**Exploration du potentiel thérapeutique des cellules
souches embryonnaires humaines pour la thérapie
cellulaire de la maladie de Huntington.**

Soutenue le 5 décembre 2008, devant le jury constitué de :

Pr Anne-Catherine BACHOUD-LEVI
Pr Stéphane VIVILLE
Pr Etienne-Emile BAULIEU
Pr Jeanine TORTAJADA
Dr Sandrine HUMBERT
Dr Marc PESCHANSKI
Dr Anselme PERRIER

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de Thèse
Co-directeur de Thèse



Sommaire

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Résumé	9
Abstract	10
Introduction	11
1. La maladie de Huntington.....	13
1.1. Signes cliniques et traitements symptomatiques.....	13
1.1.1. Signes cliniques.....	13
1.1.2. Traitements symptomatiques.....	14
1.2. Caractéristiques génétiques.....	14
1.3. Huntingtine et mécanismes physiopathologiques.....	16
1.3.1. Mécanismes associés au gain de fonction toxique.....	17
1.3.1.1. Dysfonctionnement mitochondrial et perturbations du métabolisme énergétique.....	18
1.3.1.2. Excitotoxicité.....	19
1.3.2. Mécanismes associés à la perte de fonction de la huntingtine sauvage.....	22
1.3.3. Hypothèse quant à la vulnérabilité préférentielle du corps strié.....	23
1.3.4. Conclusion sur la physiopathologie de la MH.....	24
1.4. Neuropathologie.....	25
1.4.1. Organisation structurale et fonctionnelle du striatum.....	25
1.4.1.1. Organisation cellulaire.....	26
1.4.1.2. Les neurones moyens épineux et la protéine DARPP-32.....	27
1.4.1.3. Organisation microstructurale.....	30
1.4.1.4. Afférences, efférences et fonction du striatum au sein des ganglions de la base.....	30
1.4.2. Anatomopathologie.....	33
2. Approches thérapeutiques de la maladie de Huntington.....	35
2.1. Approches pharmacologiques.....	35
2.2. Thérapie génique neuroprotectrice.....	36
2.3. Thérapie cellulaire de la maladie de Huntington.....	38
2.3.1. Modèles animaux pour les études de transplantation.....	39
2.3.2. Greffe de neurones striataux fœtaux : de la recherche expérimentale aux essais cliniques.....	41
2.3.2.1. Etudes expérimentales et pré-cliniques.....	41
2.3.2.2. Les essais cliniques.....	49
2.3.3. Sources alternatives de tissus donneurs.....	52
3. Cellules souches embryonnaires humaines et différenciation neuronale.....	55
3.1. Aspects cellulaires et moléculaires du développement striatal.....	55
3.1.1. Morphogenèse du télencéphale.....	56
3.1.1.1. Première étape du développement du SNC : rappel.....	56
3.1.1.2. Structure du télencéphale.....	58
3.1.2. Voies de signalisation impliquées dans le développement du télencéphale. ...	60
3.1.3. Facteurs de transcription mis en jeu dans le développement du télencéphale.	62

3.1.4.	Conclusion sur les aspects développementaux.....	64
3.2.	Les cellules souches embryonnaires humaines.	64
3.2.1.	Origine et dérivation des cellules hES.	64
3.2.2.	Caractérisation, propriétés et culture des cellules hES.	65
3.2.2.1.	Caractérisation des cellules hES.	65
3.2.2.2.	Propriétés des cellules hES	67
3.2.2.3.	Culture des cellules hES.....	70
3.2.3.	Induction, spécification et différenciation neurale des cellules hES.....	71
3.2.3.1.	Induction neurale des cellules hES <i>in vitro</i>	71
3.2.3.2.	Spécification et différenciation neurale des cellules hES <i>in vitro</i>	74
3.3.	Cadre législatif français et recherche sur l’embryon et les cellules hES.	77
4.	Problématique.....	78

Résultats 79

1.	Etude du potentiel de différenciation des cellules hES <i>in vitro</i> et dans un modèle rongeur de la maladie Huntington.	81
1.1.	Elaboration du protocole de différenciation permettant la production de progéniteurs striataux à partir de cellules hES <i>in vitro</i>	81
1.2.	Xéno-transplantation de progéniteurs de neurones striataux dérivés de cellules hES dans un modèle rongeur de la maladie de Huntington.	82
1.3.	Conclusion.....	83
2.	Optimisation du protocole d’induction neurale : produire plus efficacement des précurseurs neuraux d’une manière plus directement applicable aux essais cliniques.	85
2.1.	Induction neurale des cellules hES en milieu « N2B27 » <i>in vitro</i>	85
2.2.	Effets des inhibiteurs Noggin et SB431254 sur l’induction neurale des hES <i>in vitro</i>	86
2.3.	Conclusion.....	88

Discussion et perspectives 89

1.	Discussion 91
1.1.	Des cellules souches embryonnaires humaines aux populations striatales : Clefs de lecture de la production <i>in vitro</i> de greffons pour la thérapie cellulaire de la MH. 91
1.2.	Greffons neuraux issus de cellules hES : maturation striatale <i>in vivo</i> et perspectives thérapeutiques..... 95
1.3.	Surprolifération des greffons neuraux issus de cellules hES : un obstacle majeur de nature « pathologique » ou « physiologique » pour l’application clinique. 98
1.4.	Induction neurale : une nouvelle méthode de production de précurseurs neuraux plus efficace et rapide..... 101
1.5.	Neuroblastes fœtaux humains et progéniteurs dérivés de cellules hES : des limites des uns aux avantages des autres..... 103
2.	Perspectives..... 105

Références Bibliographiques 107

Annexes 125

Annexe 1 - Article 2.....	127
Evolutionary forces shape the human RFPL1, 2, 3 genes toward a role in neocortex development.	127
3. Annexe 2 – Article 3	129

2. Annexe 2 – Article 3	131
Improvement of Culture Conditions of Human Embryoid Bodies using a Controlled Perfused and Dialyzed Bioreactor System.	131
3. Annexe 3	133
Matériel et méthodes.	133

Liste des abréviations

AAV : Adeno-Associated Virus

AChE : Acétylcholinestérase

ADN(c) : Acide DésoxyriboNucléique (complémentaire)

AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

BET : Bromure d'Ethidium

BHK : Baby Hamster Kidney

BMP : Bone Morphogenic Protein

Calb : calbindine

CBP : CREB-Binding Protein

Cdk-5 : Cyclin-dependent kinase 5

ChAT : Choline Acétyltransférase

CNTF : Ciliary Neurotrophic Factor

CREB : cAMP Response Element-Binding

CSN : Cellules Souches Neurales

DARPP-32 : Dopamine and cAMP Regulated PhosphoProtein 32

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

dNTP : désoxy Nucléotide TriPhosphate

DPI : Diagnostic Préimplantatoire

Dkk-1 : Dickkopf-1

EBs : Embryoid Bodies (Corps embryoïdes)

EC : Embryonal Carcinoma

EGF : Epithelial Growth Factor

ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGF2 : basic FGF (bFGF)

Forse1 : forebrain surface embryonic antigen-1.

GABA : Acide γ -Amino-Butyrique

GABA_A : GABA de type A

GABA-T : GABA Transaminase

GAD : Glutamic Acid Decarboxylase
GCV : Ganciclovir
GDNF : Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GPe : Globus Pallidus externe
GPi : Globus Pallidus interne
GLT-1: Glutamate Transporter 1
GMP : Good Manufacturing Practice
HAP1 : Huntingtin Associated Protein 1
HDAC : Histone Déacétylase
hES : human Embryonic Stem
HNA : Human Nuclear Antigen
HNF : Human Neurofilaments
HSV1 : Herpes Simplex Virus type 1
HTS : High Throughput Screening
htt : huntingtine
htt-m : huntingtine mutée
IgG : Immunoglobuline G
iPS : induced Pluripotent Stem
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IVG : Interruption Volontaire de Grossesse
KSR : Knock-out Serum Replacement
LGE : Lateral Ganglion Eminence (Eminence ganglionnaire latérale)
LIF: Leukemia Inhibitory Factor
MACS : Magnetic Affinity Cell Sorting
MAP2 : Microtubule Associated Protein 2
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
MEK : MAP-kinase/ERK-kinase
mES : mouse Embryonic Stem
MGE : Medial Ganglion Eminence (Eminence ganglionnaire médiale)
MH : Maladie de Huntington
MS5 : Murine Stromal 5
MSN : Medium Spiny Neuron (neurones moyens épineux)
NADPH-d : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-diaphorase
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NCoR : Nuclear receptor corepressor
NMDA : N-Methyl-D-Aspartate

NOS : Nitric Oxide Synthase (monoxyde d'azote synthétase)
3-NP : 3-Nitropropionic Acid (acide 3-nitropropionique)
NR1 : N-methyl-D-aspartate R1
NR2B : N-methyl-D-aspartate R2B
NRSE : Neuron Restrictive Silencer Element
NST : Noyau sub-thalamique / Noyau sous-thalamique
NT3 : Neurotrophin-3
ORDT : Object Retrieval Detour Task
p53 : protéine 53
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF-A : Platelet-Derived Growth Factor-A
PET : Positron Emission Tomography (Tomographie par émission de positrons)
PFA : ParaFormaldéhyde
PKA : Protéine Kinase A
PP1 : Protéine phosphatase-1
PP-2A: Protéine phosphatase-2A
QA : acide quinolinique
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RA : acide rétinoïque
RE1/NRSE : Repressor Element 1/Neuron-Restrictive Silencer Element
REST : Repressor Element Silencing Transcription Factor
REST/NRSF : Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor/Neuron-Restrictive Silencer Factor
RT : Reverse Transcription
SAHA : SuberoylAnilide Hydroxamic Acid
SDIA : Stromal cell-Derived Inducing Activity
Shh : Sonic hedgehog
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC : Système Nerveux Central
SNc : Substance Noire *pars compacta*
SNr : Substance Noire *pars reticulata*
Sp1 : Specificity protein 1
SSEA-4 : Stage Specific Embryonic Antigen 4
STEP: Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase
STO : cellules stromales murines
SVZ : zone sous-ventriculaire
TAE : Tris-Acetate-EDTA

TAFII130 : TATA-binding protein-associated factor
TBP : TATA binding protein
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TFIID : TATA box-binding Factor
TGF- β : Tumor Growth Factor β
TH : Tyrosine Hydroxylase
TK : Thymidine Kinase
TRA : Tumour Rejection Antigen
Tuj1 : neuron-specific class III β -Tubulin.
VZ : zone ventriculaire
WGE : Whole Ganglion Eminence (Eminence ganglionnaire entière)
Wnt : Wingless/Int

Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative rare d'origine génétique, qui se traduit par une dégénérescence préférentielle des neurones GABAergiques moyens épineux (MSN) du striatum. Actuellement aucun traitement ne permet de guérir cette pathologie. Un essai clinique pilote réalisé il y a quelques années, fondé sur la greffe intracérébrale de neuroblastes provenant de fœtus humains issus d'IVG, a toutefois permis de remplacer les cellules lésées et de corriger pendant plusieurs années certains symptômes. Néanmoins, la logistique nécessaire pour accéder à ces cellules limite cette forme de thérapie cellulaire à un nombre de patients restreint. Il est donc apparu nécessaire d'identifier une source alternative de cellules capables de remplacer efficacement les tissus fœtaux. Les cellules souches embryonnaires humaines (hES) possèdent deux propriétés essentielles, l'autorenouvellement et la pluripotence, qui en font des candidats intéressants. L'objectif de mes travaux a été d'évaluer le potentiel thérapeutique de ces cellules, dans le contexte d'une approche de thérapie cellulaire expérimentale de la MH. Au cours de la première partie de ma thèse j'ai élaboré un protocole permettant d'orienter la différenciation des cellules hES vers un phénotype neuronal striatal. Ce protocole permet, *in vitro*, à partir de cellules hES la production efficace de populations neurales enrichies en progéniteurs striataux capables de se différencier en MSN. Une fois greffés dans un striatum lésé de rat, modèle de la MH, ces progéniteurs striataux peuvent survivre et se différencier en neurones qui expriment la protéine striatale DARPP-32, trois mois après implantation. Les cellules transplantées possèdent d'autre part un fort potentiel néoplasique, révélé au cours de ces expériences de xéno greffes. Ceci se traduit par la formation de tumeurs, résultantes de la présence de cellules neurales en prolifération, qui ne sont pas des tératomes. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces années de recherche démontre le fort potentiel de différenciation *in vitro*, mais aussi *in vivo*, des progéniteurs striataux issus de cellules hES en neurones MSN. Ces travaux apportent ainsi la démonstration que les cellules hES constituent une source cellulaire pertinente pour la thérapie cellulaire de la maladie de Huntington. Cependant, la mise en évidence du potentiel tumorigène de ces cellules souligne la nécessité de mettre en place des mesures spécifiques pour contrôler la prolifération *in vivo* des greffons issus de cellules hES, avant d'envisager toute application clinique.

Abstract

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative monogenic disorder resulting primarily in selective loss of GABAergic medium spiny striatal neurons (MSN). There is no known treatment to cure this pathology. Recent clinical trials consisting in transplanting human fetal striatal tissue into the striatum of HD patients resulted in the substitution of lost cells and lead to functional benefits lasting several years. However, application of this treatment to a large number of patients is restricted because the source and the processing of fetal cells are limiting factors. Thus, it appeared to be necessary to identify an alternative source of cells suitable to replace efficiently fetal tissue. Human embryonic stem (hES) cells, because they are self-renewable and pluripotent, are prime candidates. The aim of my work was to evaluate the therapeutic potential of hES cells for cell therapy of HD in a experimental paradigm. Through the first part of my thesis I have designed a protocol to direct the differentiation of hES cells toward a striatal neuronal fate. This protocol allows the production from hES cells of striatal progenitors that are able to differentiate in MSN *in vitro*. Once transplanted into the lesioned striatum of rats these progenitors can survive and differentiate in neurons that express the striatal protein DARPP-32, in less than three months after transplantation. On the other hand this xenografting experiments revealed that grafted cells have an extensive proliferation capacity. While less mature neural grafted cells expanded considerably in the host brain, no teratoma formation was observed. All the *in vitro* and *in vivo* data demonstrate that hES cells differentiation can be efficiently direct to a cell population relevant for cell therapy of HD. However the neoplastic potential of the grafted cells underlines specific precautionary action on the path to the clinic, allowing for blocking cells proliferation if need be.

Introduction

1. La maladie de Huntington.

Tout au long du XIX^e siècle, des médecins ont attiré l'attention sur des formes cliniques de chorée à caractère héréditaire apparaissant chez l'adulte. Ce n'est toutefois qu'en 1872 qu'un jeune médecin américain, Georges Huntington, a décrit très précisément l'une d'entre elles. La maladie de Huntington (MH, aussi dénommée « chorée de Huntington ») est une maladie neurodégénérative rare, associée à une mutation localisée dans le gène codant pour la protéine huntingtine (htt). Les mécanismes physiopathologiques, induits par la protéine mutée, entraînent une dégénérescence préférentielle des neurones GABAergiques moyens épineux du striatum (MSN, pour Medium Spiny Neuron). Cette pathologie est la plus fréquente des maladies neurodégénératives par expansion de polyglutamine. Sa prévalence est d'environ 6,2 pour 100000 en Europe (Les cahiers d'Orphanet août 2008, numéro1), dont près de 6000 sujets atteints en France. La MH survient chez l'adulte, aux environs de 35-50 ans, et plus rarement chez l'enfant. Apparaissant de manière insidieuse et progressive, elle est fatale en 10 à 20 ans, le malade s'éteignant, souvent par cachexie, dans un tableau de démence totale et de rigidité posturale. Bien qu'actuellement aucun traitement autre que symptomatique ne soit disponible pour cette pathologie, la prise en charge des patients et de leur famille permet d'améliorer considérablement leur vie quotidienne.

1.1. Signes cliniques et traitements symptomatiques.

1.1.1. Signes cliniques.

Les premiers signes cliniques de la MH apparaissent généralement entre 35 et 50 ans. Des formes juvéniles (se déclarant avant 20 ans) et tardives (pouvant démarrer à 80 ans) ont néanmoins été rapportées. L'évolution de la maladie semble d'autant plus lente qu'elle débute tardivement (Mahant et al., 2003). Le tableau clinique de la MH associe principalement trois types de désordres : moteurs (chorée, dystonie, bradykinésie, troubles de la marche et de l'équilibre), cognitifs (troubles de la planification, de l'attention et troubles mnésiques) et psychiatriques (anxiété, dépression, irritabilité, agressivité, désinhibition). La perte de poids est aussi une des caractéristiques de cette pathologie. D'autres signes, moins fréquemment rencontrés et non spécifiques (épilepsie, troubles du sommeil ou incontinence), peuvent enrichir ce tableau. La sévérité, l'évolution ainsi que la séquence d'apparition des divers symptômes présentent une variabilité interindividuelle importante pouvant rendre difficile le diagnostic. Généralement, un individu est considéré comme symptomatique dès l'apparition des premiers désordres moteurs, se traduisant classiquement par des mouvements involontaires de la face, des doigts, des pieds et du thorax (Folstein et al., 1986). Initialement légers et fugaces, les mouvements choréiques s'intensifient au cours du temps jusqu'à atteindre un plateau souvent suivi d'une régression. Bien qu'étant un bon outil diagnostique, la chorée ne reflète pas toujours la symptomatologie de la maladie dont elle est parfois absente, comme c'est le cas pour les formes

juvéniles (Walker, 2007). A un stade plus avancé de la maladie, la chorée laisse souvent place progressivement à d'autres troubles moteurs tels que la bradykinésie, la dystonie ou la rigidité.

Bien que le début de la phase symptomatique soit défini par l'apparition des premiers dysfonctionnements moteurs, des désordres cognitifs peuvent apparaître jusqu'à 10 ans avant cette période. Discrètes, voire inexistantes au début de la pathologie, les atteintes cognitives se présentent initialement comme des difficultés d'attention, de concentration, des troubles mnésiques, ou encore une lenteur d'idéation. Au premier plan des signes traduisant une détérioration intellectuelle se trouve également une atteinte des fonctions exécutives (planification, réalisation de tâches complexes au quotidien). La dégradation cognitive progresse peu à peu et s'enrichit de nombreux autres symptômes tels que des troubles du langage ou de la perception visuo-spatiale.

La symptomatologie psychiatrique est plus hétérogène, fluctuant au cours de la maladie, et pouvant apparaître plus de 20 ans avant les mouvements choréiques. Elle inclut généralement des troubles de l'humeur tels que la dépression, l'anxiété, l'apathie ou l'irritabilité. Des troubles comportementaux, caractérisés par l'agressivité, la désinhibition ou encore des conduites addictives sont également fréquemment observés. Les changements du caractère et de la personnalité s'aggravent souvent au cours de la pathologie. Enfin, les atteintes psychiatriques peuvent conduire les patients au suicide, dont le taux est nettement plus élevé que dans la population générale.

1.1.2. Traitements symptomatiques.

Les traitements symptomatiques, bien que limités, sont d'une aide considérable dans la prise en charge des patients puisqu'ils permettent de préserver pendant de nombreuses années leur autonomie. Ce type d'approche est le plus couramment utilisé et doit être adapté à chaque patient. En effet, l'hétérogénéité symptomatique entre patients impose l'élaboration d'un traitement personnalisé en fonction du symptôme le plus gênant. En France, bien qu'ils soient de moins en moins utilisés, les neuroleptiques constituent l'approche pharmacologique la plus répandue dans une indication antichoréique. En ce qui concerne les troubles psychiatriques et du comportement, le traitement administré implique généralement des neuroleptiques, des antidépresseurs, des antipsychotiques, ou encore des anxiolytiques. Bien qu'il existe un certain nombre de composés chimiques permettant d'améliorer les symptômes moteurs et psychiatriques, très peu d'études ont à ce jour mis en évidence des principes actifs capables de retarder le déclin des fonctions cognitives. D'autres traitements incluant des compléments alimentaires, une rééducation posturale ou de la coordination pneumophonique pour atténuer les troubles de la déglutition, ou encore des myorelaxants sont également utilisés.

1.2. Caractéristiques génétiques.

La maladie de Huntington est une maladie génétique autosomique dominante à pénétrance complète. La mutation causale de la MH fut identifiée en 1993. Elle est caractérisée par une répétition

de triplets CAG localisée dans l'exon 1 du gène *IT-15* ou *HD*, situé sur le chromosome 4 (locus 4p16.3) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Ce gène code pour une protéine ubiquitaire de 350 kDa, la huntingtine (htt), qui ne possède pas d'homologie particulière avec d'autres protéines connues. L'expansion de triplets CAG se traduit au niveau de la protéine par une région polyglutamine anormalement longue dans la partie N-terminale de la htt. Les individus sains présentent un nombre de CAG inférieur à 35. Les formes adultes communes de la maladie se caractérisent par des répétitions allant de 41 à 50 triplets, tandis que des répétitions plus longues sont généralement associées à des formes sévères juvéniles voire infantiles. Il est à noter que la pénétrance est incomplète entre 36 et 40 répétitions. Il existe par ailleurs une corrélation inverse entre le nombre de répétitions CAG sur l'allèle muté et l'âge de début de la maladie (Andrew et al., 1993 ; Wexler et al., 2004) (Figure 1). Ceci s'observe clairement dans les familles où une augmentation de la taille de la mutation au fil des générations se traduit par un déclenchement plus précoce de la maladie dans les jeunes générations, tout particulièrement lors d'une transmission paternelle de la MH (Zuhlke et al., 1993 ; Ranen et al., 1995). Ce phénomène, nommé anticipation, trouve son origine dans l'instabilité somatique et germinale des répétitions. Le nombre des répétitions de triplets CAG est le déterminant majeur de la sévérité de la pathologie et compte pour environ 70% dans la variabilité de l'âge d'apparition des premiers symptômes. Néanmoins, des facteurs génétiques ou environnementaux influencent également l'âge auquel se déclare la maladie (Imarisio et al., 2008).

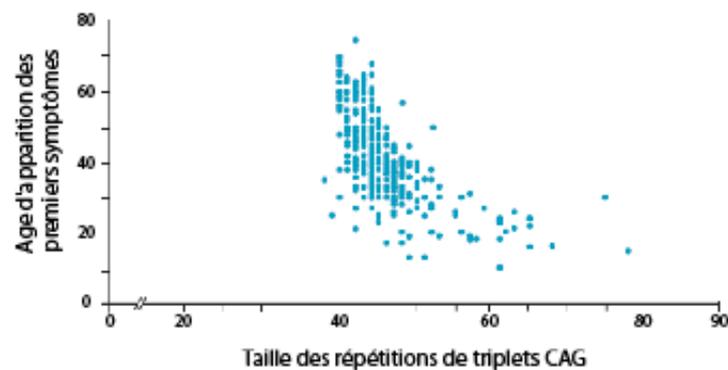


Figure 1 : Graphique illustrant une corrélation inverse entre le nombre de répétitions CAG sur l'allèle muté et l'âge de début de la maladie (Walker, 2007).

La découverte du gène responsable de la maladie a permis la mise en place d'un diagnostic génétique présymptomatique chez l'adulte et, plus récemment, prénatal. Lorsque le diagnostic est réalisé dans le cadre d'une fécondation *in vitro*, on parle alors de diagnostic préimplantatoire (DPI) (Figure 2). Le DPI permet d'identifier les embryons porteurs du gène muté et ainsi de n'implanter dans l'utérus de la mère que les embryons sains (Durr and Viville, 2007). Une technique d'exclusion allélique permet par ailleurs à des couples de donner naissance à des enfants non porteurs du gène muté sans connaître leur statut génétique (Sermon et al., 2002).

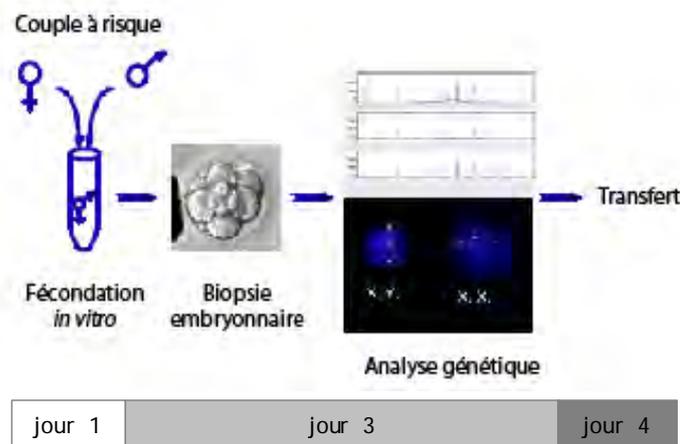


Figure 2 : Procédure d'un diagnostic préimplantatoire (de Dr Moutou et Pr Viville, pris en ligne sur [Http://www.huntington.asso.fr/pdf/FHE_PDF-86.pdf](http://www.huntington.asso.fr/pdf/FHE_PDF-86.pdf)).

1.3. Huntingtine et mécanismes physiopathologiques.

La huntingtine est une protéine ubiquitaire dont l'expression est cependant plus importante dans le cerveau et les testicules (Li et al., 1993 ; Strong et al., 1993). Son rôle physiologique de même que l'implication de sa forme mutée dans la MH ne sont à ce jour pas entièrement compris. Néanmoins, les nombreux travaux réalisés au cours de ces dernières années ont permis d'élucider certaines fonctions de la htt normale et mutée et de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de la MH (Borrell-Pages et al., 2006 ; Imarisio et al., 2008 ; Roze et al., 2008). La neurotoxicité de la htt-mutée (htt-m) s'exerce par de nombreux mécanismes, non exclusifs, qui résultent soit d'un gain de fonction toxique de la protéine mutée, soit, comme cela a été démontré plus récemment, d'une perte de fonctions normales de la protéine sauvage. Le chapitre suivant a pour objectif d'aborder succinctement les principaux mécanismes identifiés à ce jour (Figure 3). Deux d'entre eux, le phénomène d'excitotoxicité et l'atteinte du métabolisme mitochondrial, sont à la base du développement des modèles animaux dit phénotypiques de la maladie, modèles que j'ai utilisés au cours de mes travaux de recherche. Ces mécanismes feront par conséquent l'objet d'une attention toute particulière.

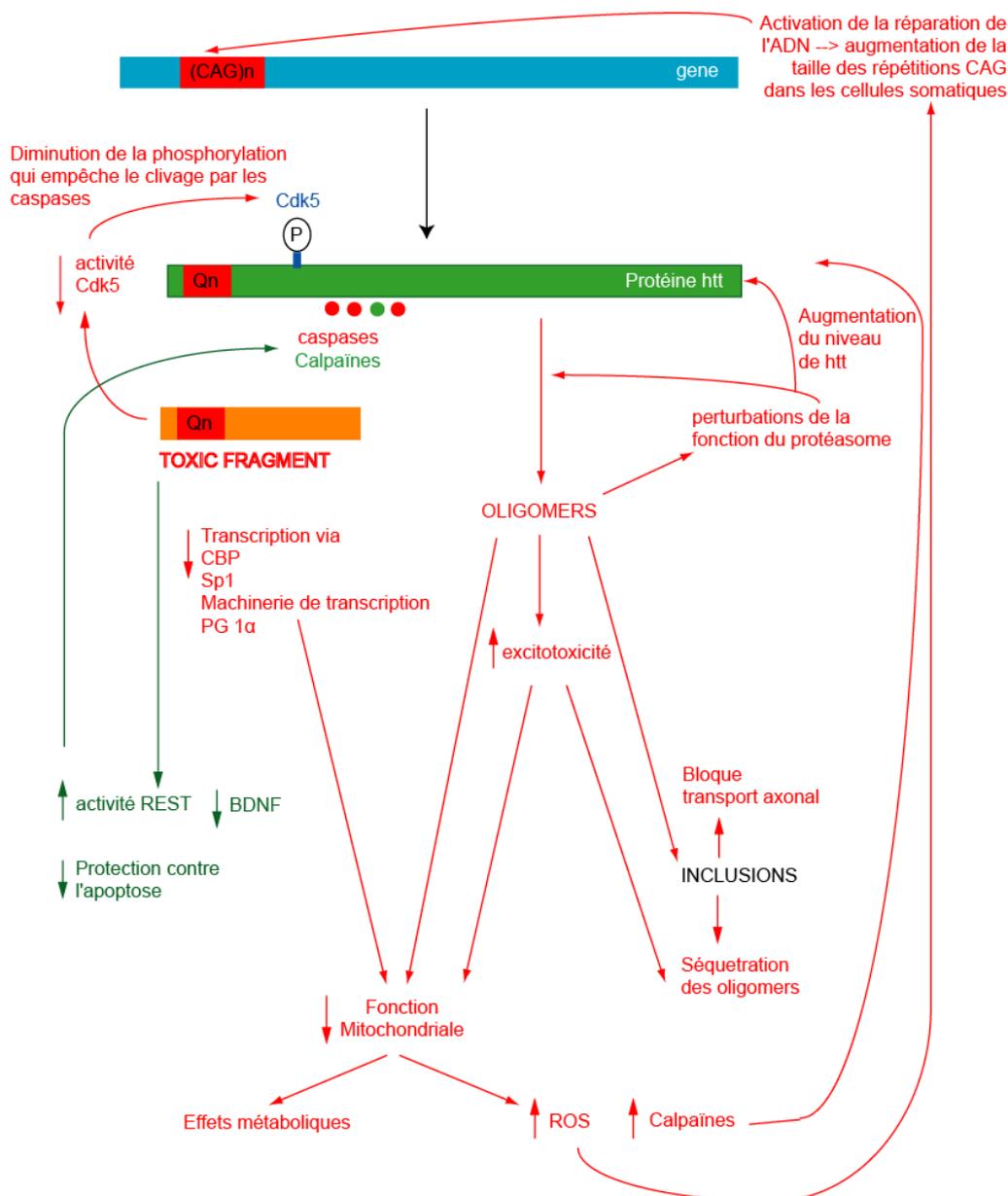


Figure 3 : Principaux dysfonctionnements induits par la mutation de la protéine huntingtine. La huntingtine mutée peut être clivée par les calpaïnes ce qui résulte en la production de fragments toxiques. Ces derniers sont impliqués dans de nombreux mécanismes physiopathologiques conduisant à la mort neuronale. Cdk5, cyclin-dependent kinase 5 ; htt, huntingtine ; Qn, polyglutamine. (adapté de Imarisio et al., 2008).

1.3.1. Mécanismes associés au gain de fonction toxique.

Longtemps, l'hypothèse d'un gain de fonction toxique de la htt-m a été la seule considérée. A ce jour de nombreux effets délétères associés à l'expression de la protéine mutée ont été identifiés. Les principaux mécanismes mis en évidence entraînent des perturbations de la fonction du protéasome, de la machinerie transcriptionnelle, du transport axonal, de la fonction mitochondriale ou encore des phénomènes d'excitotoxicité.

Des observations, réalisées dans des modèles transgéniques murins de la MH et dans des cerveaux de patients *post-mortem*, ont mis en évidence la présence d'agrégats (ou inclusions)

protéiques. Ces agrégats sont essentiellement constitués de fragments de htt-m contenant l'expansion anormale de polyglutamine. Les fragments de htt-m, résultant d'un processus protéolytique incomplet, possèdent une structure tridimensionnelle modifiée qui favorise leur agrégation. Une fois formés, les agrégats, ubiquitinylés et insolubles, ne peuvent être dégradés par le protéasome et s'accumulent dans la cellule. La présence d'inclusions neuritique, cytoplasmique et nucléaire est en effet une caractéristique de la pathologie. À ce jour, le rôle joué par ces agrégats dans la pathogénèse de la MH - *i.e.* protecteur ou délétère - reste sujet à controverse. Par ailleurs, l'incapacité du protéasome à éliminer les agrégats de htt-m reflète un dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome. Cette altération serait une conséquence directe de la présence de la protéine mutée. Les mécanismes par lesquels cette dernière agit pour inhiber ce système sont actuellement débattus.

La capacité de la htt-m à déréguler l'expression génique apparaît comme un point clef dans la physiopathologie de la MH. Plusieurs études ont démontré, dans des modèles de souris transgéniques et des cerveaux de patients analysés *post-mortem*, une perturbation de l'expression de nombreux gènes correspondant par exemple à des neuropeptides, des récepteurs, des protéines de signalisation intracellulaires, ou encore des protéines impliquées dans le transport axonal ou la réponse au stress. Cette perturbation est en grande partie due à la localisation nucléaire de la htt-m. Elle affecterait ainsi le fonctionnement de divers modulateurs transcriptionnels tels que des activateurs (p53, specificity protein 1 (Sp1), des régulateurs (CA150), des co-répresseurs (NCoR) ou co-activateurs (CBP), ou encore des facteurs de la machinerie (TBP, TFIID, TAFII130) ou de remodelage de la chromatine. Des perturbations du trafic neuronal trouvent également leur origine dans l'hypothèse du gain de fonction. En effet, les agrégats neuritiques de htt-m peuvent créer un encombrement stérique qui bloque la circulation des vésicules de transport et des organelles dans les neurites (Trushina et al., 2004). Ils peuvent également séquestrer des protéines impliquées dans le transport axonal, telle que HAP1 (Huntingtin Associated Protein 1) (Li et al., 1998 ; McGuire et al., 2006). Enfin, des perturbations mitochondriales et des phénomènes d'excitotoxicité sont également impliqués dans la physiopathologie de la MH et sont détaillés ci-dessous.

1.3.1.1. Dysfonctionnement mitochondrial et perturbations du métabolisme énergétique.

Dans de nombreuses maladies neurodégénératives, un trouble du métabolisme et plus spécifiquement un dysfonctionnement mitochondrial a été impliqué. Plusieurs observations cliniques et expérimentales suggèrent qu'il en est de même dans la MH. À titre d'exemple, des investigations *post-mortem* réalisées sur des cerveaux (Gu et al., 1996 ; Browne et al., 1997) et sur des fragments de tissus musculaires (Arenas et al., 1998 ; Turner et al., 2007) de patients atteints par la MH ont permis d'identifier un déficit de la chaîne respiratoire, notamment au niveau des complexes I et II/III. Un déficit de synthèse d'ATP et une diminution de la phosphocréatine au niveau musculaire ont également été mis en évidence chez les patients. De plus, l'utilisation de l'acide 3-nitropropionique (3-

NP), une toxine qui inhibe l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, sur des animaux permet de détruire sélectivement les neurones du striatum et de créer ainsi des modèles phénotypiques de la maladie (Brouillet and Hantraye, 1995 ; Palfi et al., 1996). Au niveau moléculaire, l'expression de la htt-m induit une diminution de l'expression et de la fonctionnalité du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (Benchoua et al., 2006). De plus, la dopamine, neuromodulateur majoritairement trouvé dans le striatum, joue un rôle aggravant dans ce processus. Ainsi, cette dernière, *via* l'activation du récepteur dopaminergique post-synaptique de type D2, diminue de manière additive l'expression du complexe II, entraînant de ce fait une vulnérabilité accrue des neurones striataux aux perturbations mitochondriales (Benchoua et al., 2008). Une hyperactivité transglutaminase (Dedeoglu et al., 2002 ; Bailey and Johnson, 2005), ou encore des perturbations de la transcription de gènes mitochondriaux responsables du fonctionnement de la chaîne respiratoire (Cui et al., 2006 ; Weydt et al., 2006), sont des mécanismes déclenchés par la htt-m et impliqués dans le dysfonctionnement de la mitochondrie et des troubles du métabolisme conduisant à la mort neuronale. Une des voies possibles qui conduit à la dégénérescence des neurones implique le calcium ; elle est détaillée dans la partie qui suit. Bien que le rôle des troubles du métabolisme mitochondrial ait pu ainsi être établi, les mécanismes impliqués restent encore mal connus.

1.3.1.2. Excitotoxicité.

C'est au début des années 1970, suite aux travaux de James Olney, que le concept d'excitotoxicité a fait sa première apparition (Olney and Sharpe, 1969 ; Olney et al., 1971). L'excitotoxicité est un processus pathologique qui implique une augmentation anormale du calcium intracellulaire induisant une cascade d'événements responsables de la dégénérescence neuronale (Figure 4). Ce phénomène peut être la conséquence soit d'une augmentation de glutamate extracellulaire, on parle alors d'excitotoxicité directe, soit d'un dysfonctionnement mitochondrial, on parle dans ce cas d'excitotoxicité indirecte (Brouillet et al 2000). De nombreux travaux ont suggéré qu'en raison d'une distribution très large des acides aminés excitateurs dans le cerveau, ce mécanisme physiopathologique pouvait être impliqué, plus ou moins spécifiquement, dans de nombreuses affections neurologiques telles que les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson ou enfin la maladie de Huntington.

L'excitotoxicité directe est déclenchée par le glutamate, principal acide aminé excitateur utilisé dans le système nerveux central (SNC), et de façon plus générale par ses analogues structuraux, tels que l'acide kaïnique, l'acide iboténique, ou l'acide quinolinique. Lorsqu'elles sont en trop forte concentration, ces excitotoxines induisent une hyperactivation des récepteurs ionotropiques au glutamate, et plus spécifiquement des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) en ce qui concerne la MH. Cette activation accrue entraîne l'ouverture du canal calcique associé à ces récepteurs, déclenchant ainsi une entrée massive et non contrôlée de calcium dans l'espace intracellulaire. L'augmentation du calcium entraîne alors l'activation d'une cascade excitotoxique impliquant de

nombreuses voies biochimiques, notamment enzymatiques (caspases, calpaïnes), et conduit finalement à la mort neuronale (Figure 4). Le calcium est un second messager nécessaire à de multiples événements cellulaires, tels que la synthèse d'ATP ou l'apoptose, et dont l'homéostasie intracellulaire est rigoureusement contrôlée notamment par les mitochondries. Un dysfonctionnement mitochondrial peut donc également être responsable d'une perturbation de l'homéostasie calcique. En effet, une atteinte mitochondriale et le déficit énergétique qui en découle induit une dépolarisation partielle de la membrane neuronale et l'activation du canal calcique associé aux récepteurs NMDA. Cette activation déclenche de la même manière que décrit précédemment une cascade excitotoxique, mais cette fois-ci indépendante d'une augmentation anormale de glutamate extracellulaire, aboutissant à la mort neuronale (Figure 4). Cette excitotoxicité indirecte provoque à son tour une aggravation des perturbations mitochondriales et l'apparition d'un phénomène auto-entretenu de neurodégénérescence.

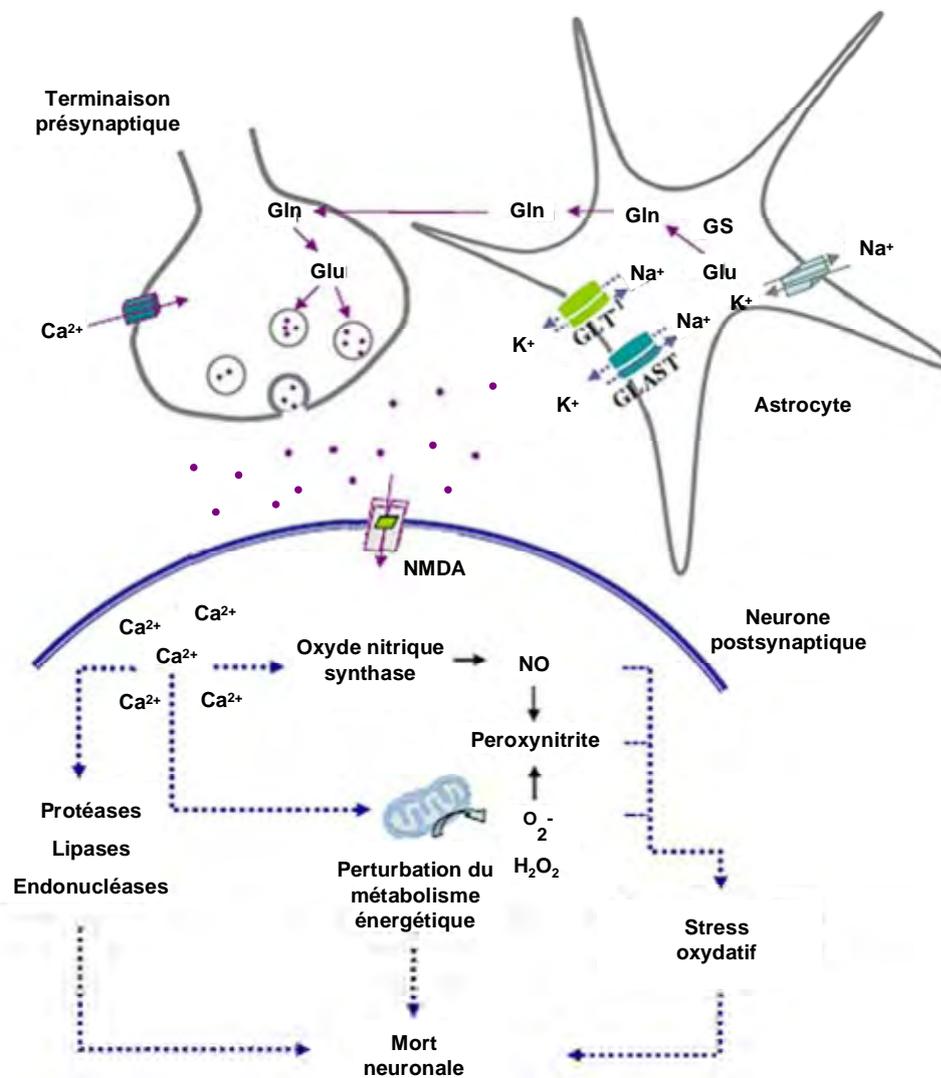


Figure 4 : Mécanismes impliqués dans l'excitotoxicité. Une augmentation de la concentration extracellulaire du glutamate (Glu) entraîne une hyperactivation des récepteurs ionotropiques de ce neurotransmetteur, notamment des récepteurs NMDA. Il en résulte l'ouverture du canal calcique associé et une élévation persistante

de la concentration intracellulaire de calcium. Cette augmentation calcique déclenche une série d'activations enzymatiques, la production de radicaux libres (espèces réactives oxygénées (O_2^- , H_2O_2) et nitrées (NO)), ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial entraînant un arrêt progressif de la production d'ATP. La conjonction de ces événements intracellulaires conduit à la dégénérescence neuronale. Le glutamate est éliminé de la fente synaptique par les astrocytes qui le recapturent via les transporteurs GLAST et GLT-1. Une perturbation de ces transporteurs contribue à l'accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire. Une atteinte mitochondriale indépendante, liée par exemple à la présence de la Htt mutée, peut entraîner, du fait d'un déficit énergétique, une dépolarisation partielle de la membrane neuronale et induire l'ouverture du canal calcique associé aux récepteurs ionotropiques. Ceci conduit selon le même processus que décrit précédemment à la mort de la cellule (excitotoxicité dite indirecte). (adapté de (Estrada Sanchez et al., 2008)).

C'est en étudiant chez des rongeurs l'effet d'une hyperstimulation striatale des récepteurs NMDA par des agonistes glutamatergiques, tels que l'acide kainique et l'acide quinolinique, que l'hypothèse du rôle de l'excitotoxicité dans la MH a vu le jour. En effet, ces molécules, et plus particulièrement l'acide quinolinique, induisent après administration intrastriatale une dégénérescence spécifique des MSN semblable à celle observée dans la MH (Coyle and Schwarcz, 1976 ; Beal et al., 1986). L'implication du glutamate dans les processus physiopathologiques de la MH est cependant restée longtemps spéculative. Cette hypothèse a été étayée par l'observation comparative de lésions excitotoxiques produites chez l'animal et de lésions striatales présentes dans des cerveaux de patients examinés *post-mortem* (DiFiglia, 1990). Par ailleurs, de nombreuses études réalisées sur des modèles cellulaires et animaux de la maladie, ont mis en évidence une sensibilité accrue des neurones striataux au phénomène d'excitotoxicité (Roze et al 2008). Ainsi, dans des modèles murins ou dans des cerveaux de patients analysés *post-mortem*, il a été observé une augmentation de la libération de glutamate et d'acide quinolinique par les neurones corticaux projetant sur le striatum. D'autres études suggèrent que la htt-m pourrait modifier les courants post-synaptiques excitateurs en agissant au niveau des récepteurs NMDA, et plus particulièrement sur ceux exprimant les sous-unités NR1 et NR2B, enrichies à la surface des MSN. Les mécanismes identifiés à ce jour impliqueraient, entre autres, une augmentation du nombre de ces récepteurs à la surface cellulaire, ou encore, une augmentation de leur activation et de leur sensibilité par le biais, notamment, de phénomènes de phosphorylation. De plus, le phénomène d'excitotoxicité pourrait être potentialisé par une perturbation de la recapture du glutamate par les astrocytes au niveau de la fente synaptique. En effet, une diminution de l'expression du transporteur glutamatergique astrocytaire GLT-1 a été mise en évidence dans le striatum de patients *post-mortem* ainsi que dans des modèles murins et cellulaires. Enfin, dans différents modèles de la MH, il a été démontré une perturbation de l'homéostasie calcique (Hansson et al., 2001 ; Seong et al., 2005 ; Rockabrand et al., 2007). Dans ce cas, la htt-m interagirait avec les membranes mitochondriales et perturberait de cette façon les flux calciques au niveau de la mitochondrie (Panov et al., 2002 ; Panov et al., 2005 ; Oliveira et al., 2007). Ceci entraînerait alors un

arrêt progressif de la production d'ATP au sein des neurones striataux ce qui déclencherait le processus d'excitotoxicité indirecte.

Il apparaît donc que la perturbation de l'homéostasie calcique, passant par un phénomène d'excitotoxicité directe ou indirecte, est un mécanisme majeur de la pathogénèse cellulaire observée dans la MH.

1.3.2. Mécanismes associés à la perte de fonction de la huntingtine sauvage.

Une des hypothèses, plus récemment admise et pouvant expliquer la neurotoxicité de la htt-m, est fondée sur l'idée d'une perte de fonctions normales de la protéine sauvage. En effet, la htt possède un certain nombre de fonctions neuroprotectrices qu'elle n'exerce plus lorsqu'elle est mutée. Cet effet neuroprotecteur, démontré dans différents modèles cellulaires, s'exerce entre autres par une activité anti-apoptotique (Cattaneo et al., 2001). Celle-ci se traduit notamment par l'inhibition de la voie des caspases (Rigamonti et al., 2001). En situation pathologique, cette fonction est altérée. Elle entraîne ainsi une augmentation de la mort neuronale. La htt sauvage peut également promouvoir la survie neuronale en intervenant dans la régulation de la transcription du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Ce dernier est un facteur neurotrophique produit par les neurones du cortex, qui le délivrent dans le striatum, où il est essentiel à la survie et à la différenciation des neurones striataux. En interagissant avec le répresseur transcriptionnel REST/NRSF (Repressor Element-1 Silencing Transcription factor/Neuron-Restrictive Silencer Factor), la htt séquestre ce dernier dans le cytoplasme et empêche ainsi sa fixation à la séquence RE1/NRSE (Repressor Element 1/Neuron-Restrictive Silencer Element) (Figure 5). Cette séquence est située dans la région promotrice de nombreux gènes neurones-spécifiques dont celui codant pour le BDNF. Par son interaction avec REST/NRSF la htt prévient donc l'inhibition de l'expression du BDNF. Or, la htt-m perd cette fonction de séquestration de REST/NRSF ce qui permet sa translocation dans le noyau et une répression de l'expression, entre autres, du BDNF (Zuccato et al., 2007 ; Zuccato et al., 2001 ; Zuccato et al., 2003) (Figure 5). Dans les neurones, le transport actif, qu'il soit rétrograde ou antérograde, est un processus vital pour la cellule. Par le biais de moteurs moléculaires, il assure la communication entre le soma, siège notamment de la synthèse protéique, et les terminaisons axonales. Dans la MH, des dysfonctions du transport axonal ont clairement été impliquées dans le développement de la pathologie. Cette perturbation du trafic neuronal trouve entre autres son origine dans la perte de fonction de la huntingtine. Ainsi, la perte d'interaction entre la htt sauvage, la protéine HAP1, et la sous-unité p150^{glued} de la dynactine, est corrélée à une diminution de l'interaction des moteurs moléculaires avec les microtubules ce qui ralentit, notamment, le transport vésiculaire du BDNF (Gauthier et al., 2004). *In fine*, la perturbation de l'expression ainsi que du transport du BDNF aboutissent à une mort cellulaire accrue. Les mécanismes liés à une perte de fonction « pro-survie » de la protéine sauvage jouent donc, contrairement à ce qui à longterm a été envisagé, un rôle important dans la physiopathologie de la MH.

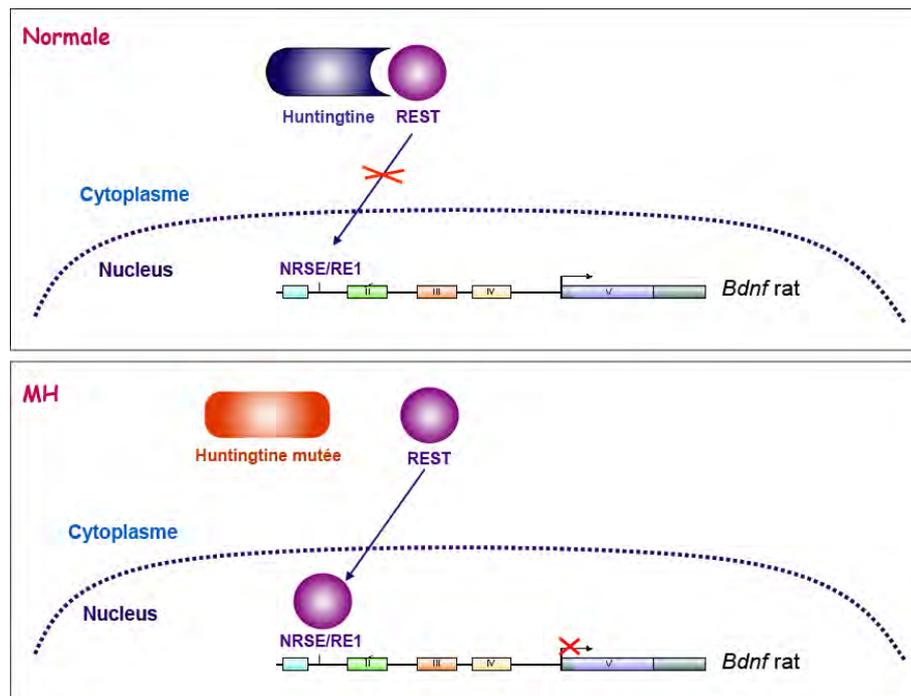


Figure 5 : Dérégulations transcriptionnelles et perte de fonction de la htt dans la MH : exemple du gène *Bdnf*.

1.3.3. Hypothèse quant à la vulnérabilité préférentielle du corps strié.

Comme nous l'avons expliqué, le gain de fonction toxique ainsi que la perte de fonction normale de la htt sont à l'origine d'une multitude de perturbations et de dysfonctionnements moléculaires, responsables de la physiopathologie de la MH. Bien que quelques mécanismes aient été élucidés, il reste encore beaucoup de questions en suspens, notamment quant à la vulnérabilité préférentielle du striatum. Les neurones striataux ne sont pas particulièrement enrichis en htt-m. Cependant, certains des mécanismes abordés ci-dessus permettent d'ores et déjà d'émettre des hypothèses quant à l'atteinte privilégiée des MSN. Le corps strié, de part sa localisation et son rôle au sein du cerveau, est une région riche en innervations glutamatergiques et dopaminergiques. Ainsi, au cours de la pathologie, la dérégulation de la transmission du glutamate induisant le phénomène d'excitotoxicité, ou une innervation dopaminergique importante, perturbant notamment le métabolisme énergétique, peuvent expliquer en partie la susceptibilité striatale. De plus, le striatum reçoit de nombreuses afférences corticales pourvoyeuses de support trophique. Les altérations de production et de transport du BDNF cortical induit par la présence de la htt-m pourraient également rendre compte de la dégénérescence privilégiée des MSN. Un manque de support trophique ainsi que d'abondantes innervations glutamatergiques et dopaminergiques pourraient ainsi expliquer la vulnérabilité préférentielle du corps strié (Figure 6).

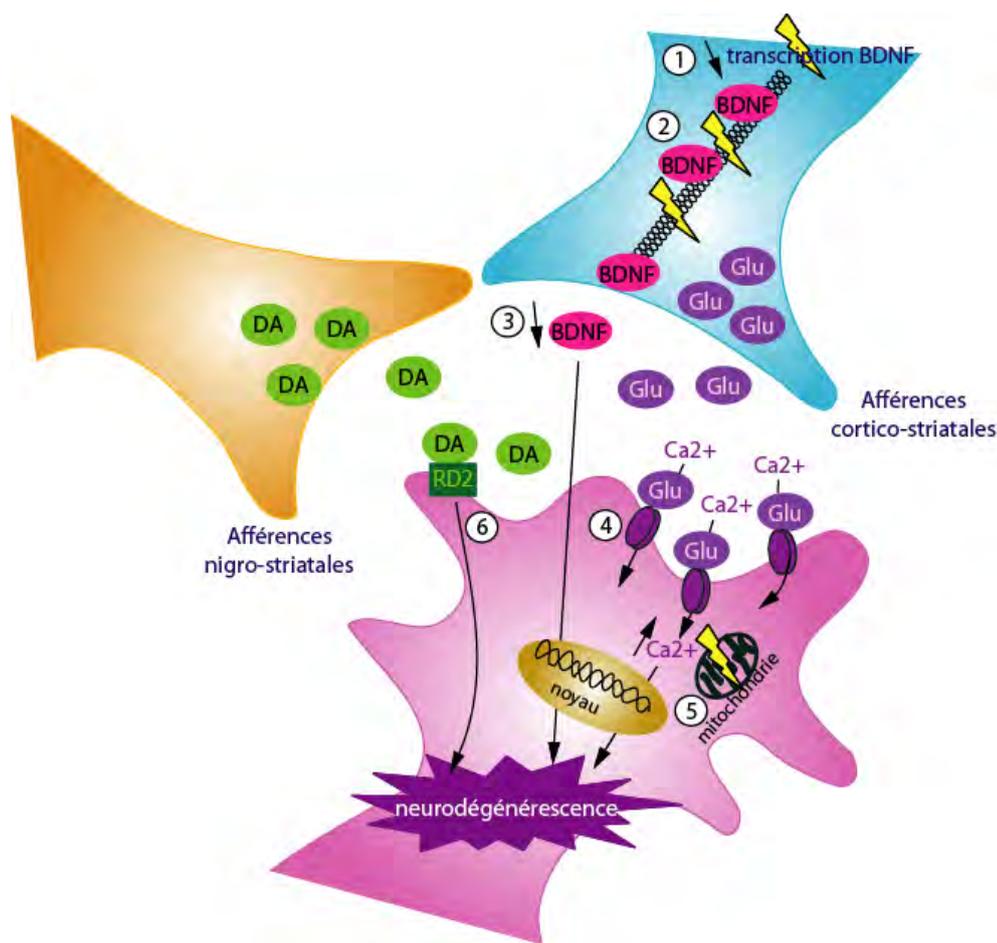


Figure 6 : Vulnérabilité striatale dans la MH. La diminution de la libération du facteur neurotrophique BDNF au niveau des voies corticostriatales (3) est consécutive à (1) une diminution de la transcription du gène codant le BDNF et (2) à une perturbation du transport vésiculaire du BDNF. La libération de glutamate (Glu) par les afférences corticales entraîne (4) une excitotoxicité dans les neurones striataux consécutive à une élévation persistante de la concentration intracellulaire de calcium. Un dysfonctionnement de la mitochondrie (5) entraînant une diminution des substrats énergétiques participe à l'affaiblissement des neurones striataux. La dopamine (DA) libérée par les afférences nigrales (6) participe à la neurodégénérescence striatale (adapté de Roze et al., 2008).

1.3.4. Conclusion sur la physiopathologie de la MH.

La MH apparaît ainsi résulter à la fois d'une perte de fonction « pro-survie » de la htt sauvage mais aussi d'un gain de fonction toxique de la protéine mutée. Les mécanismes mis en jeu sont multiples et impliquent principalement une dérégulation transcriptionnelle, une excitotoxicité accrue, des troubles du métabolisme énergétique, et des altérations du transport axonal et du fonctionnement synaptique. Malgré les progrès importants réalisés à ce jour dans la compréhension de la physiopathologie de la MH, de nombreuses questions restent posées.

1.4. Neuropathologie.

1.4.1. Organisation structurale et fonctionnelle du striatum.

Les hémisphères cérébraux renferment en leur sein un certain nombre de structures sous-corticales désignées collectivement par le terme de ganglions de la base. Ces structures sont le noyau caudé, le putamen, le pallidum ou globus pallidus (subdivisé en un segment interne (GPi) et un segment externe (GPe)), le noyau sous-thalamique (NST) ainsi que la substance noire, pars compacta (SNc) et pars reticulata (SNr) (Figure 7). Ces différentes régions sont interconnectées par de multiples boucles complexes et étroitement reliées au cortex et au thalamus. Le système des ganglions de la base interviendrait ainsi dans le contrôle des fonctions motrices, cognitives et limbiques. L'ensemble formé par le noyau caudé et le putamen est dénommé striatum ou néostriatum par opposition au paléostriatum désignant le pallidum. L'organisation macrostructurale de l'ensemble putaminocaudal est complexe (Figure 8). Chez les primates le noyau caudé et le putamen sont séparés par la capsule interne tandis que chez le rat ils apparaissent comme une masse unique traversée par les fibres du cortex cérébral. Etant donné l'atteinte préférentielle du striatum dans la MH, il apparaît important dans le cadre d'une thérapie cellulaire, visant à remplacer les neurones détruits et les connexions perdues, de connaître l'organisation structurale et fonctionnelle du corps strié. Les paragraphes qui suivent ont pour objectif d'apporter une vue d'ensemble de la composition cellulaire, des afférences et des efférences, ainsi que de la fonction du striatum.

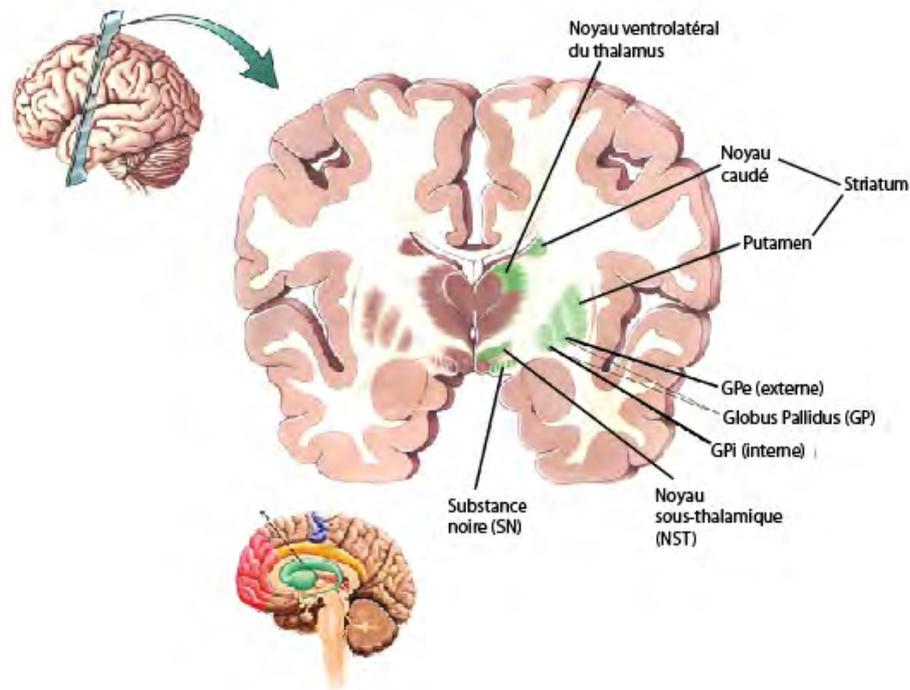


Figure 7 : Coupe coronale d'un cerveau humain illustrant l'organisation des ganglions de la base.

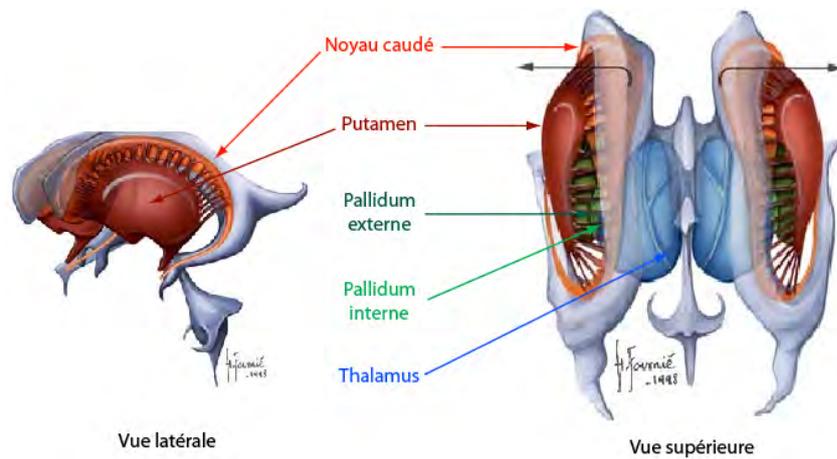


Figure 8 : Représentation tridimensionnelle du striatum.

1.4.1.1. Organisation cellulaire.

Histologiquement, le striatum est constitué de deux groupes principaux de neurones que l'on peut distinguer d'après la présence ou l'absence d'épines sur leurs dendrites. Les épines dendritiques sont des petites protrusions de la membrane plasmique sur lesquelles font synapses les afférences corticostriatales et nigrostriatales.

Les neurones épineux sont de taille moyenne (10-16 μ m) (MSN) et représentent environ 90-95% de la population neuronale du striatum (Handley et al., 2006) (Figure 9). Ce sont des neurones dits Golgi de type II, de projections, et qui synthétisent le neurotransmetteur GABA (acide gamma-amino butyrique).

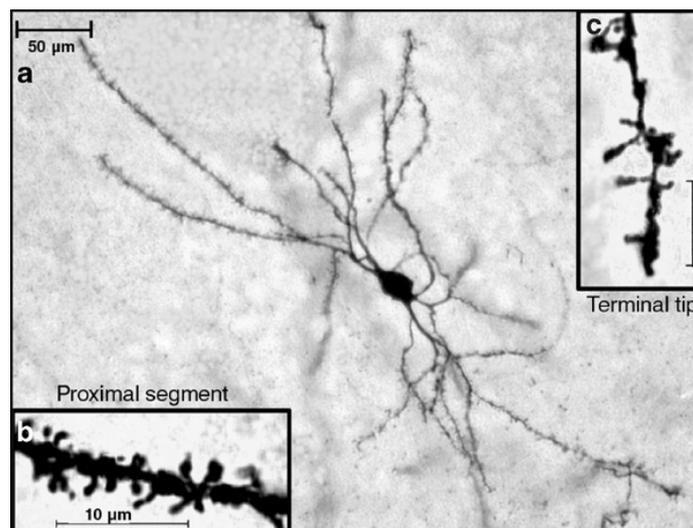


Figure 9 : Photo d'un neurone moyen épineux (MSN) du striatum de rat adulte par la coloration de Golgi. (a) image illustrant l'arborisation dendritique importante du MSN. Exemple d'un segment proximal dendritique (b) et d'une terminaison dendritique distale (c) illustrant la présence de nombreuses épines (Li et al., 2003).

Le GABA est le principal acide aminé inhibiteur du système nerveux central. Il est synthétisé à partir d'acide glutamique par une enzyme : la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase), et est catabolisé par une autre enzyme : la GABA transaminase (GABA-T), dont l'activité peut être inhibée par l'acide valproïque (un médicament antiépileptique). Le schéma de la biosynthèse du GABA fait appel à deux isoformes de la GAD. Ces deux isoformes, nommés GAD 65 et GAD 67, sont issus de deux gènes différents. Leurs masses moléculaires sont très proches et leurs séquences en acides aminés montrent qu'elles ont le même site actif. Cependant, elles diffèrent par leur localisation cellulaire : la GAD 65 a une localisation préférentiellement axonale tandis que la GAD 67 est plutôt somato-dendritique. Le neurotransmetteur GABA exerce ses effets par l'intermédiaire de deux types de récepteurs : les récepteurs canaux GABA-A à réponse rapide, et les récepteurs GABA-B couplés aux protéines G à réponse plus lente. Par ailleurs, les MSN sont très riches en DARPP-32 (Dopamine-and cAMP-Regulated PhosphoProtein, Mr 32,000) et en calbindine (Calb). Selon leurs cibles privilégiées et leurs caractéristiques neurochimiques ils peuvent être divisés en deux types : 1- les neurones contenant de l'enképhaline, exprimant le sous-type D2 des récepteurs dopaminergiques et le récepteur A_{2A} de l'adénosine, et projetant sur le GPe, et 2- ceux renfermant de la substance P et de la dynorphine, exprimant le sous-type D1 des récepteurs dopaminergiques et ciblant le GPi et la SNr.

Les neurones non épineux, de taille moyenne ou grande, représentent moins de 10% de la population neuronale striatale et constituent les interneurons du corps strié (Jain et al., 2001). La diversité morphologique et neurochimique de ces interneurons est plus importante que celles des neurones épineux de projection, et a conduit à les classer en 4 catégories :

- ceux de taille moyenne contenant du GABA et de la calrétinine (10-35 µm);
- ceux de taille moyenne contenant du GABA et de la parvalbumine (10-35 µm) ;
- ceux de taille moyenne contenant du GABA, de la somatostatine, de la nicotinamide adénine dinucléotide diaphorase (NADPH-d), le neuropeptide Y et du monoxyde d'azote synthétase (NOS) (10-35 µm);
- ceux de grande taille contenant entre autres de la choline acétyltransférase (ChAT) et de l'acétylcholinestérase (AChE) (20-50 µm) (Wu and Parent, 2000 ; Jain et al., 2001).

Les interneurons jouent un rôle essentiel dans l'organisation fonctionnelle du striatum, notamment en modulant et en contrôlant les contacts synaptiques des neurones de projections.

1.4.1.2. Les neurones moyens épineux et la protéine DARPP-32.

Les neurones moyens épineux du striatum sont enrichis en une phosphoprotéine essentielle à leur fonctionnement : la protéine DARPP-32. Cette dernière constitue une protéine clef de la voie de signalisation dopaminergique, qui module le flux d'informations à travers le striatum ainsi que la plasticité des synapses corticostriatales. Ce contrôle de l'état d'excitabilité des MSN se fait *via* deux

sous-types de récepteurs couplés aux protéines G : les récepteurs dopaminergiques D1 et D2. Selon l'état de phosphorylation de la protéine DARPP-32, dépendant de la voie AMPc (adénosine monophosphate cyclique)/PKA (Protéine Kinase A), des effets biochimiques différents sont produits. Ainsi, lorsqu'elle est phosphorylée sur la thréonine 34 par la PKA, elle-même activée par l'AMPc en réponse à la stimulation des récepteurs D1, la protéine DARPP-32 inhibe la protéine phosphatase-1 (PP1). L'inhibition de la PP1 se répercute à plusieurs niveaux. Elle permet l'augmentation de la phosphorylation de MEK (MAPK/ERK kinase), activée par la voie glutamatergique, et entraîne ainsi la phosphorylation de ERK (Extracellular signal Regulated Kinase). De plus, elle empêche la déphosphorylation de ERK par la tyrosine phosphatase STEP (striatal-enriched tyrosine phosphatase) (Valjent et al., 2005) (Figure 10). L'inhibition de la PP1 par la protéine DARPP-32 permet également une augmentation de la phosphorylation de récepteurs, tels que les récepteurs NMDA, AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate), et GABA_A (Acide γ -Amino-Butyrique de type A), et des canaux calciques associés. Il résulte de cette cascade d'événements l'activation de gènes nécessaire à l'activité des MSN. Au contraire, lorsque la protéine DARPP-32 est phosphorylée par la cycline dépendante kinase-5 (Cdk-5) sur la thréonine 75 elle inhibe la PKA (Fisone et al., 2007). La PKA peut par ailleurs activer la protéine phosphatase-2A (PP-2A) qui a pour rôle de déphosphoryler la DARPP-32 sur la thréonine 75, et ainsi empêcher l'inhibition de la PKA. Par ailleurs, des études récentes rapportent qu'après activation du récepteur D1 il s'en suit une accumulation de la protéine DARPP-32 dans le noyau. En inhibant la PP1, la protéine DARPP-32 permettrait ainsi la régulation de la phosphorylation de l'histone H3, modulant par là même l'expression de certains gènes dans les MSN (Stipanovich et al., 2008). Dans les neurones striatopallidaux, la dopamine inhibe la PKA *via* le récepteur D2, tandis que l'adénosine l'active *via* le récepteur A_{2A} (Figure 10). De plus l'activation du récepteur D2 inhiberait la voie ERK (Bertran-Gonzalez et al., 2008). La dopamine *via* la protéine DARPP-32 pourrait ainsi contrôler l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'activité des MSN tels que c-Fos, la substance P ou encore la dynorphine.

Bien que la dopamine soit l'un des signaux contrôlant l'état de phosphorylation de la protéine DARPP-32, son expression est indépendante de la voie dopaminergique. Ainsi la transcription et/ou la traduction de la protéine DARPP-32 pourrait être régulée par des molécules telles que le BDNF, l'acide rétinoïque ou l'œstrogène. Une étude récente a ainsi démontré que le BDNF augmente la transcription et la traduction de la protéine DARPP-32 (Bogush et al., 2007).

En conclusion, la protéine DARPP-32 apparaît comme une protéine essentielle à la modulation de l'activité des MSN régulée par la voie dopaminergique.

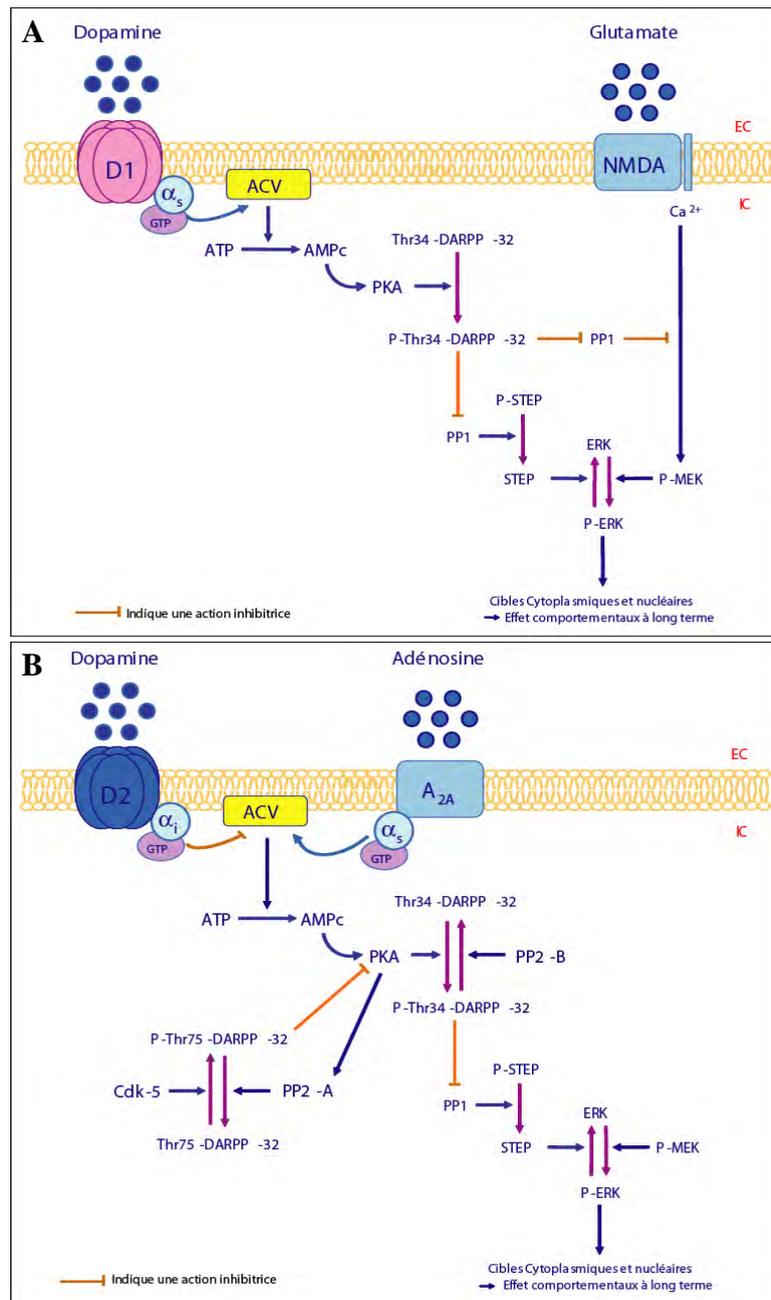


Figure 10 : Représentation schématique du rôle de la protéine DARPP-32 dans les neurones moyens épineux du striatum. (A) Rôle dans les neurones striataux exprimant le récepteur dopaminergique D1. L'activation de ERK résulte de l'action concomitante du glutamate et de la dopamine. Les récepteurs D1 activent l'adénylyl cyclase de type V (ACV) par l'intermédiaire d'une protéine G hétérotrimérique comprenant la sous-unité α_s (α_s). La protéine kinase (PKA) activée par l'AMP cyclique (AMPc) phosphoryle entre autre la thréonine 34 (Thr34) de la protéine DARPP-32 qui inhibe ainsi la protéine phosphatase 1 (PP1). L'inhibition de la PP1 a deux effets : elle favorise la phosphorylation de ERK en maintenant la tyrosine phosphatase STEP sous forme phosphorylée inactive, et elle augmente l'activation de MEK. L'activation de ERK requiert par ailleurs une stimulation des récepteurs NMDA du glutamate. Il résulte l'activation de gènes nécessaire à l'activité des neurones striataux. (B) Rôle dans les neurones striataux exprimant le récepteur dopaminergique D2. L'activation de ERK résulte de l'action concomitante du glutamate et de la dopamine. Les récepteurs D2 activent l'adénylyl cyclase de type V (ACV) par l'intermédiaire d'une protéine G hétérotrimérique comprenant la sous-unité α_i (α_i). La protéine kinase (PKA) activée par l'AMP cyclique (AMPc) phosphoryle entre autre la thréonine 34 (Thr34) de la protéine DARPP-32 qui inhibe ainsi la protéine phosphatase 1 (PP1). L'inhibition de la PP1 a deux effets : elle favorise la phosphorylation de ERK en maintenant la tyrosine phosphatase STEP sous forme phosphorylée inactive, et elle augmente l'activation de MEK. L'activation de ERK requiert par ailleurs une stimulation des récepteurs NMDA du glutamate. Il résulte l'activation de gènes nécessaire à l'activité des neurones striataux.

Contrairement au récepteur A_{2A} à l'adénosine, le récepteur D2 à la dopamine inhibe la production d'AMPc. Le résultat de ces actions antagonistes aboutit à différents états de phosphorylation de la protéine DARPP-32. Lorsque la protéine DARPP-32 est phosphorylée sur la thréonine 75 (P-Thr75-DARPP-32), par la cycline kinase-5 (Cdk-5), elle inhibe la PKA. Il en résulte une déphosphorylation des protéines cibles impliquées dans le contrôle de l'activité des neurones striataux. Au contraire, lorsqu'elle est phosphorylée sur la thréonine 34 (P-Thr34-DARPP-32) la protéine DARPP-32 inhibe la protéine PP-1 et permet par conséquent la phosphorylation des protéines cibles. (Protéine phosphatase-2A (PP-2A) ; protéine phosphatase-2B (PP-2B)) (adapté de Valjent 2005 et Fisone et al., 2007).

1.4.1.3. Organisation microstructurale.

L'organisation microstructurale striatale se fait selon deux compartiments distincts de part leur composition neurochimique et leurs connexions anatomiques : les striosomes et la matrice. Les striosomes correspondent à des îlots (patches) pauvres en calbindine et en AChE contrairement à la matrice qui en est riche (Graybiel and Ragsdale, 1978 ; Gerfen, 1985). Les striosomes sont également caractérisés par l'expression de récepteurs aux opiacés, de la substance P et de la dynorphine (Jain et al., 2001). Quant à la matrice, elle exprime de la somatostatine. Les MSN sont localisés dans les deux compartiments (Vonsattel and DiFiglia, 1998). La matrice représente 85% du volume striatal tandis que les striosomes en occupent 15% (Graybiel and Ragsdale, 1978 ; Graybiel, 1990). Cette organisation microstructurale a une importance fonctionnelle au niveau des ganglions de la base puisque l'organisation des connexions striatales suit aussi ce schéma striosomes/matrice (Graybiel, 1990 ; Gerfen, 1992). Les afférences reçues par la matrice proviennent principalement du thalamus ainsi que des régions associatives et sensori-motrices du cortex (préfrontales, temporales et pariétales) (Gerfen, 1984 ; Donoghue and Herkenham, 1986). Les striosomes sont essentiellement innervés par des fibres afférentes issues du cortex orbital et des régions limbiques (cingulaires et amygdaliennes) (Gerfen, 1984 ; Donoghue and Herkenham, 1986). Les efférences matricielles réunissent principalement les neurones qui projettent sur le pallidum et la SNr (Graybiel and Ragsdale, 1979 ; Gerfen et al., 1987). Quant aux fibres efférentes des striosomes, elles projettent essentiellement sur la SNc (Graybiel and Ragsdale, 1979 ; Gerfen et al., 1987).

1.4.1.4. Afférences, efférences et fonction du striatum au sein des ganglions de la base.

Le striatum reçoit massivement des afférences de trois sources principales : le cortex, le thalamus et la substance noire. Les afférences corticostriées proviennent de la plupart des régions du cortex cérébral et sont de nature excitatrice glutamatergique (Divac et al., 1977 ; McGeer et al., 1977). La projection thalamostriée est issue principalement des noyaux intralaminaires et utilise également le glutamate comme neurotransmetteur (van der Kooy, 1979). Les afférences nigrostriatales émanent de la SNc. Elles ont pour neurotransmetteur la dopamine. Enfin, on note aussi l'existence d'afférences

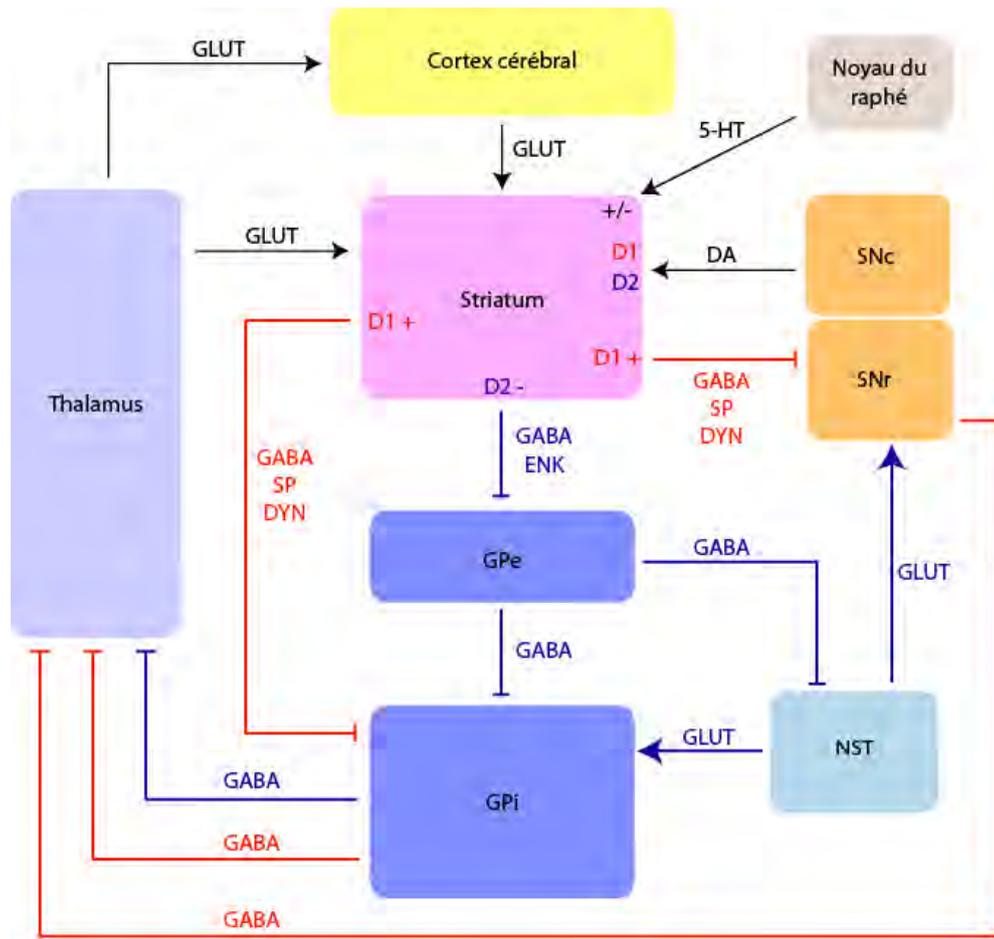
sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé (Figure 11). L'ensemble putaminocaudal émet principalement des projections GABAergiques inhibitrices vers le pallidum (GPe et GPi) et la SNr.

Les ganglions de la base jouent un rôle fondamental dans la motricité. Ils sont ainsi impliqués dans la planification, l'initiation, et l'exécution des mouvements, ainsi que dans la performance lors de l'apprentissage moteur (Graybiel, 1995 ; Graybiel et al., 1994). La conception actuelle de l'organisation fonctionnelle du circuit moteur met en jeu deux voies distinctes et antagonistes. On distingue ainsi, selon la cible préférentielle des efférences striatales, la voie directe et la voie indirecte. Grâce à ces deux circuits fonctionnels, le striatum peut après intégration des signaux afférents, moduler l'activité du GPi et de la SNr.

Dans la voie directe, les MSN ont pour co-transmetteur la substance P et la dynorphine. Ils envoient des projections sur les neurones du GPi et de la SNr. Ces derniers possèdent une activité tonique inhibitrice, de type GABAergique, sur le thalamus empêchant son activation. Lorsque les MSN sont activés, ils inhibent transitoirement les neurones du GPi et de la SNr provoquant ainsi une désinhibition du thalamus. Ce dernier peut alors exercer son activité excitatrice sur le cortex moteur (Figure 11).

Dans la voie indirecte, les MSN utilisent l'enképhaline comme co-transmetteur et innervent le GPe. Le GPe projette sur le GPi et le NST et exerce une activité tonique inhibitrice de type GABAergique. Le NST, quant à lui, envoie des efférences glutamatergiques excitatrices au GPi et à la SNr. Dans cette voie, l'activation des neurones striataux induit une inhibition du GPe, ce qui permet une levée de l'inhibition du NST et, par conséquent, une activation du GPi et de la SNr. Il en résulte finalement une inhibition renforcée du thalamus et par voie de conséquence du cortex moteur (Figure 11). La voie indirecte modulerait ainsi la voie directe.

Par ailleurs, ces deux voies peuvent être régulées par les neurones dopaminergiques de la SNc. Cette régulation se fait *via* les récepteurs dopaminergiques D1 (localisés au niveau des neurones qui expriment la substance P) et D2 (situés au niveau des neurones qui expriment l'enképhaline). Lorsque les récepteurs D1 sont activés par la dopamine libérée par les projections nigrostriées, la voie directe est stimulée. A l'inverse lorsque les récepteurs D2 sont activés, la voie indirecte est inhibée. La conséquence générale de la libération de dopamine par les projections de la SNc est donc une réduction de l'inhibition thalamique qui induit une augmentation de l'excitation du cortex moteur (Figure 11).



- | | |
|---|---------------------------------------|
| D1 : récepteur D1 à la dopamine | GPI : Globus pallidus interne |
| D2 : récepteur D2 à la dopamine | NST : noyau sous-thalamique |
| DA : Dopamine | SNc : Substance noire pars compacta |
| DYN : Dynorphine | SNr : Substance noire pars reticulata |
| ENK : Enképhaline | SP : Substance P |
| GABA : Acide gama-amino-butérique | — : voie directe |
| 5-HT : 5-Hydroxytryptamine (sérotonine) | — : voie indirecte |
| GLUT : Glutamate | → : activation |
| GPe : Globus pallidus externe | — : inhibition |

Figure 11 : Schéma illustrant les principales connexions au sein des ganglions de la base, et plus particulièrement les voies directes et indirectes. (adapté de Atlas de neurosciences humaines de Netter: neuroanatomie, neurophysiologie, De David L Felten, Ralph F Józefowicz, Frank Henry Netter, Traduit par Nathalie Kubis, Illustré par Frank Henry Netter, Publié par Masson, 2006).

Comme nous venons de le voir, le striatum constitue un véritable centre d'intégration et de régulation des informations afférentes aux ganglions de la base. En plus de leur rôle essentiel dans le contrôle de l'activité motrice, les ganglions de la base interviendraient également, selon l'aire corticale impliquée, dans la régulation des fonctions sensori-motrices, oculomotrices, associatives et limbiques (Alexander et al., 1986 ; Parent and Hazrati, 1995). Son implication dans ces nombreuses fonctions cérébrales permet d'établir une corrélation entre son atteinte et les symptômes observés dans la MH.

1.4.2. Anatomopathologie.

Sur le plan neuropathologique, la caractéristique la plus précoce et la plus marquée de la MH est l'atrophie bilatérale du corps strié (Vonsattel et al., 1985). La corrélation de l'évolution clinique et des données neuropathologiques, obtenues après étude *post-mortem* du striatum de patients atteints de la MH, a conduit à une classification de la maladie en 5 grades de sévérité (0 à 4) (Vonsattel et al., 1985) (Figure 12 A). Dans les formes avancées les plus communes l'atrophie affecte 60% du striatum et peut atteindre jusqu'à 90% dans les formes infantiles.

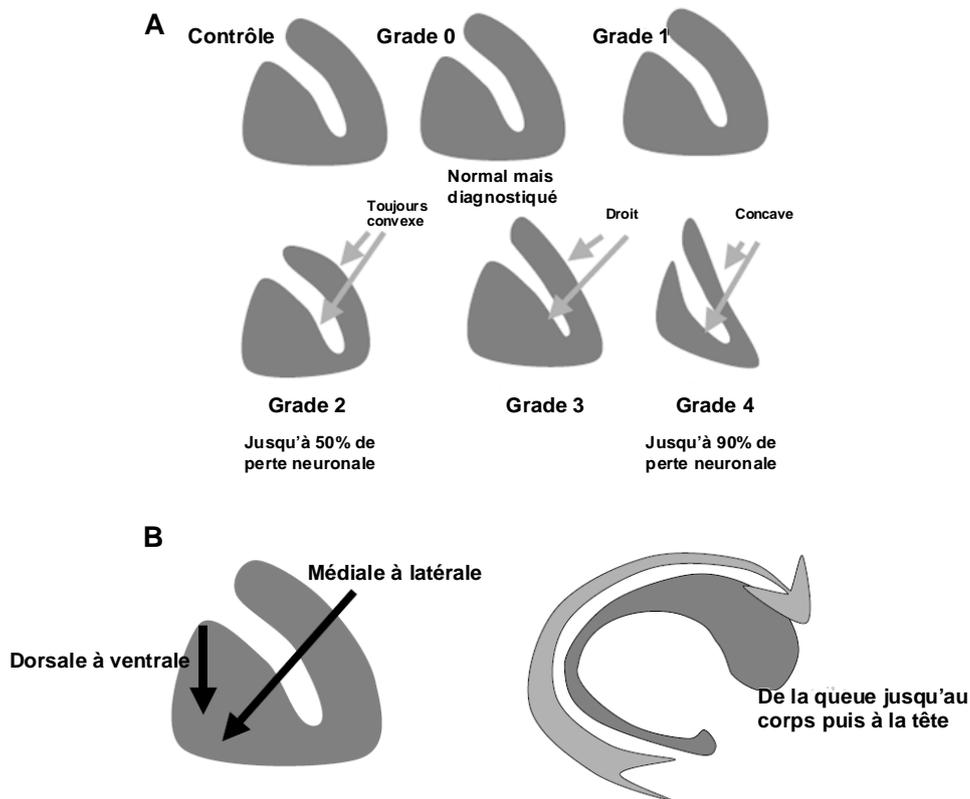


Figure 12 : Schéma illustrant : (A) les stades de l'atrophie striatale et (B) les gradients dorso-ventral, medio-ventral et caudo-rostral de l'atrophie (adapté de Charles Duyckaerts).

La pathologie du noyau caudé est généralement plus étendue et apparaît plus précocement que celle du putamen. La destruction neuronale, lente et progressive, suit un gradient d'évolution selon plusieurs axes : dorso-ventral, antéro-postérieur et médio-latéral. Initialement, une atteinte des régions postérieures du putamen (qui progresse vers l'avant) s'accompagne d'une dégénérescence de la région dorso-médiane du striatum (qui s'étend progressivement vers les régions ventrales et latérales) (Figure 12 B). Le développement de techniques d'imagerie cérébrale fonctionnelle, telles que l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) ou encore la tomographie par émission de positrons (PET), ont permis de démontrer que l'atrophie peut survenir 11 ans, pour le noyau caudé, et 9 ans, pour le putamen, avant les premiers signes cliniques (Aylward et al., 2004). Grâce à ces techniques, il

semblerait que la perte de volume striatal prend place bien avant le début de la période symptomatique (Kunig et al., 2000 ; Paulsen et al., 2004).

Au niveau microstructural, on observe une dégénérescence préférentielle des MSN. Ceux qui expriment l'enképhaline sont particulièrement plus vulnérables que ceux qui expriment la substance P (Walker, 2007). Les interneurons striataux semblent quant à eux relativement épargnés. Au niveau moléculaire, la diminution en DARPP-32, en GABA, en GAD et en GABA T au niveau du striatum est une des modifications neurochimiques les plus précoces (Bibb et al., 2000 ; Bogush et al., 2007). Cette diminution s'accompagne également d'une réduction en calcineurine et en calbindine, en récepteurs à l'adénosine et en récepteurs à la dopamine. Par ailleurs, la mort neuronale s'associe dès les premiers stades de la pathologie à une importante activation microgliale (Sapp et al., 2001). D'un point de vue fonctionnel, la perte des projections GABA/enképhaline du striatum sur le GPe entraîne une désinhibition de ce dernier qui provoque une inhibition accrue du noyau sub-thalamique et du GPi (par la voie indirecte). Il en résulte donc une désinhibition des efférences thalamiques à destination des cellules corticales : ce qui pourrait expliquer la chorée.

À mesure que le corps strié dégénère, des changements apparaissent dans d'autres régions cérébrales qui lui sont connectées. Ainsi, le cortex cérébral (essentiellement les couches III, V et VI), le globus pallidus (jusqu'à 40% de perte axonale dans les formes les plus évoluées), le noyau subthalamique, les régions thalamiques, le cervelet, le système limbique, et la substance noire (pars reticulata) connaissent également une dégénérescence progressive. Par ailleurs, une caractéristique anatomopathologique résultante de l'atrophie striatale est l'élargissement des ventricules latéraux de 2 à 10 fois la taille normale (de la Monte et al., 1988) (Figure 13).

En conclusion, le développement des techniques d'imageries fonctionnelles et les données qui en résultent ont permis d'établir une corrélation entre l'atrophie des différentes régions cérébrales nommées ci-dessus, et plus particulièrement du striatum, et le déclin fonctionnel progressif des patients.

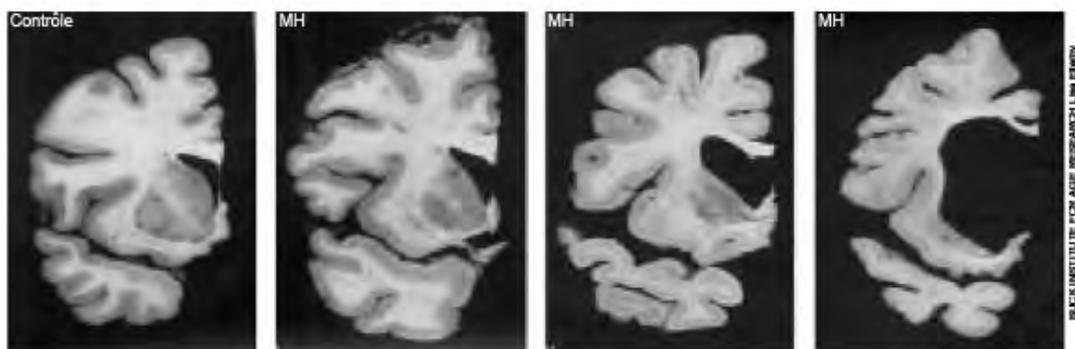


Figure 13 : Coupes coronales de cerveaux de patients atteints de la maladie de Huntington illustrant la dégénérescence cérébrale: à gauche, une coupe de cerveau sain, et, en allant vers la droite, des coupes indiquant la progression de la neurodégénérescence.

2. Approches thérapeutiques de la maladie de Huntington.

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif ou permettant de stopper l'évolution de la MH. Cependant trois voies thérapeutiques complémentaires, dont les concepts et les méthodes diffèrent, sont actuellement envisagées. La première, cible des mécanismes physiopathologiques de la MH au moyen de composés pharmacologiques afin d'empêcher la neurodégénérescence. La seconde, dont l'objectif rejoint celui de l'approche précédente, tend à promouvoir la survie neuronale par un apport trophique (thérapie génique neuroprotectrice). Et enfin, la dernière voie thérapeutique explorée vise à remplacer les neurones détruits par des neurones sains (thérapie cellulaire substitutive).

2.1. Approches pharmacologiques.

L'utilisation d'agents pharmacologiques pour le traitement de la MH s'appuie sur les progrès considérables réalisés dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de la dégénérescence neuronale (Borrell-Pages et al., 2006 ; Handley et al., 2006). L'objectif de cette approche expérimentale est de cibler ces mécanismes au moyen de composés pharmacologiques déjà connus, afin d'empêcher la mort des neurones. Les travaux déjà réalisés ont permis d'identifier un grand nombre de molécules potentiellement thérapeutiques. Parmi celles-ci, la cystamine, et plus particulièrement son analogue la cystéamine, est un candidat potentiel du fait de son rôle neuroprotecteur. Ces molécules induisent une augmentation de l'expression d'une protéine chaperonne et une inhibition d'une transglutaminase résultant en une élévation du taux de BDNF dans le cerveau (Borrell-Pages et al., 2006). Etant donné l'importance de la perte d'acétylation des histones dans la MH, la dérégulation transcriptionnelle constitue également une cible importante. Une solution serait donc d'inhiber l'activité des histones déacétylases (HDAC). Des études ont ainsi rapporté, dans des modèles animaux, un effet neuroprotecteur et des améliorations comportementales après administration d'inhibiteur de l'HDAC tel que le SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) (Steffan et al., 2001 ; Hockly et al., 2003 ; Handley et al., 2006). De plus, une étude récente a démontré que l'inhibition de l'HDAC6 par la trichostatine A induit une augmentation de l'acétylation de l'alpha-tubuline permettant ainsi un meilleur transport vésiculaire du BDNF (Dompierre et al., 2007). D'autres molécules sont également testées pour leur capacité à inhiber l'excitotoxicité (remacemide, riluzole), la toxicité de la htt-m (FK506), le déficit métabolique lié à une activité réduite de la mitochondrie (CoQ10, créatine), ou encore la mort cellulaire par apoptose (minocycline) (Handley et al., 2006 ; Borrell-Pages et al., 2006). Parmi les nombreuses molécules étudiées un certain nombre ont fait ou font l'objet d'essais cliniques de phase I (Table 1). Cependant, malgré le nombre important de composés pharmacologiques testés les résultats des essais thérapeutiques restent jusqu'à présent décevants.

Composé pharmaceutique	Mode d'action	Références
CoQ10	Augmente l'activité mitochondriale, propriété anti-oxydante, antagoniste du récepteur NMDA	Huntington Study Group, 2001
Créatine	Augmente la production énergétique cellulaire	Tabrizi et al., 2003
Cystéamine (Cystagon)	Inhibiteur de transglutaminase et de la caspase-3, antioxydant, augmente le BDNF	Dubinsky 2006
LAX-101	Inhibiteur de caspases et de phospholipases, pourrait augmenter l'activité mitochondriale	Puri et al. 2005
Lamotrigine	Bloque le récepteur de la glutamine	Kremer et al. 1999
Memantine	Antagoniste du récepteur NMDA	Beister 2004
Minocycline	Inhibiteur de caspase, antiapoptotique	Bonelli et al., 2003 ; Huntington Study Group, 2004 ; Thomas et al. 2004
Rémacemide	Antagoniste du récepteur NMDA	Kiebertz et al. 1996 ; Huntington Study Group, 2001
Riluzole	Antagoniste du glutamate	Huntington Study Group, 2003

Table 1 : Principaux agents pharmacologiques ayant fait ou faisant l'objet d'essais cliniques (adapté de Handley et al., 2006 et Borrell-Pages et al., 2006).

Les approches décrites ci-dessus sont basées sur l'utilisation de molécules thérapeutiques non toxiques déjà connues. Mais une autre stratégie, envisagée beaucoup plus récemment, tend à identifier de nouveaux composés pharmacologiques par criblage à haut débit (HTS pour High-Throughput Screening). Cette approche consiste à évaluer *in vitro* la capacité de nouvelles molécules à agir sur des biomarqueurs d'une maladie, telle que la formation d'agrégats de htt-m pour la MH. Plusieurs modèles, comme des cellules de mammifères, des levures ou des invertébrés peuvent être utilisés. La dérivation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses du gène muté (Mateizel et al., 2006), et plus récemment la production de lignée de cellules iPS (induced Pluripotent Stem cell) dérivées de fibroblastes de patients (Park et al., 2008), permettent d'envisager de nouveaux modèles, bien plus proches du cadre physiologique réel. Ces cellules représenteraient ainsi un modèle plus pertinent de la pathologie pour l'identification de molécules potentiellement thérapeutiques.

2.2. Thérapie génique neuroprotectrice.

Le principe de la thérapie génique neuroprotectrice est basé sur l'apport de facteurs neurotrophiques (BDNF, NT-3, NT-4/5, FGF, GDNF, CNTF) connus pour favoriser la survie des neurones. Parmi toutes ces molécules le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) fait l'objet d'une attention toute particulière. Le problème majeur de ce facteur est qu'il ne passe pas la barrière hémato-encéphalique. Afin de franchir cet obstacle, il est donc indispensable de délivrer le facteur neurotrophique *in situ* à proximité des neurones striataux. Pour ce faire, deux stratégies, basées soit sur l'utilisation de vecteurs viraux, soit sur l'implantation de capsules contenant des cellules productrices de facteurs neurotrophiques, ont été envisagées. Malgré des résultats expérimentaux encourageants obtenus chez les rongeurs (Mittoux et al., 2002 ; de Almeida et al., 2001) l'approche virale (AAV(Adeno-Associated Virus), lentivirus) pose certains problèmes notamment au niveau de la standardisation, de la régulation, et du maintien à long terme de l'expression du gène. De plus, ces

vecteurs peuvent stimuler une réponse immunitaire empêchant toute réinjection. Au regard de ces problèmes et en l'état actuel des connaissances, il n'est pas envisageable, pour le moment, d'utiliser ces vecteurs pour des essais cliniques. Une alternative, dite de thérapie génique *ex vivo*, repose sur l'implantation de cellules exprimant le transgène d'intérêt dans la zone cérébrale désirée. Le choix du type de cellules s'est orienté notamment vers des cellules tumorales de part leur forte capacité proliférative et leur haut rendement en transduction. Cependant, le caractère tumoral de ces cellules ne permettait évidemment pas une application clinique de cette méthode. C'est grâce à une technologie élaborée par l'équipe du Pr. Aebischer que cet obstacle a pu être contourné. Cette technologie repose sur l'encapsulation des cellules productrices du CNTF dans un polymère semi-perméable biocompatible (Figure 14). Les cellules greffées se retrouvent ainsi isolées du tissu hôte. Cet isolement permet d'éviter d'éventuels effets néfastes induits par les cellules implantées ou encore une réponse immunitaire de l'hôte. Ceci offre ainsi la possibilité d'utiliser des cellules allogéniques ou xénogéniques en l'absence d'immunosuppresseur. La technique de macro-encapsulation présente également l'avantage de permettre la diffusion de l'oxygène et des nutriments, essentiels à la survie des cellules encapsulées, ainsi que la libération de la molécule qu'elles produisent (Aebischer et al., 1996). Cette approche thérapeutique a démontré aussi bien chez le rongeur (Emerich et al., 1996) que chez le primate non humain (Emerich et al., 1997 ; Mittoux et al., 2002) son efficacité dans la protection des neurones contre la dégénérescence et dans la restauration de certaines fonctions motrices et cognitives. Ces résultats prometteurs ont ainsi conduit au lancement d'un essai clinique de phase I à Créteil (Bachoud-Levi et al., 2000a ; Bloch et al., 2004). Cette étude, réalisée sur six patients greffés avec des cellules BHK (lignée de hamster) produisant du CNTF, a démontré la sécurité, la faisabilité et la tolérance d'une telle approche. Une amélioration de certains paramètres électrophysiologiques a pu être démontrée chez trois patients. Cependant, étant donné la survie aléatoire des cellules encapsulées et l'hétérogénéité de production du CNTF, des améliorations techniques doivent être apportées avant d'envisager un essai de phase II (Bloch et al., 2004).

Parmi les approches de thérapie génique envisagées, une autre voie fait actuellement l'objet de recherches. Cette approche s'appuie sur l'utilisation de siRNA dirigés contre les ARNs messagers de la htt-m afin d'empêcher son expression. L'utilisation de siRNA chez un modèle de souris transgénique de la MH a montré une diminution de l'expression de la protéine mutée, une réduction de la formation d'agrégats, ainsi qu'une survie prolongée des animaux (Wang et al., 2005). Pour l'instant, un certain nombre de problèmes techniques et d'innocuité rend l'application clinique de cette technique impossible.

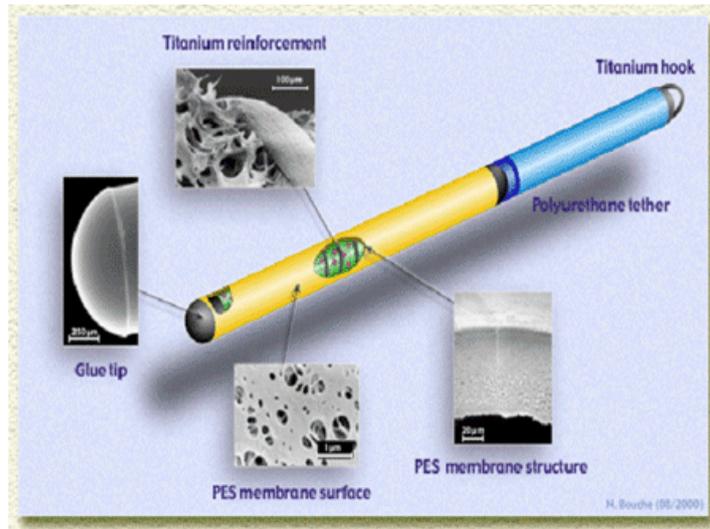


Figure 14 : Structure de la capsule permettant un confinement des cellules vivantes tout en laissant passer les molécules solubles.

2.3. Thérapie cellulaire de la maladie de Huntington.

La thérapie cellulaire, dite substitutive, peut être considérée comme une innovation clinique majeure. Elle consiste en l'injection de cellules vivantes dans le but de prévenir, traiter ou atténuer une maladie résultant du dysfonctionnement d'un tissu ou d'un groupe de cellules, conséquence par exemple d'un processus neurodégénératif. C'est avec la réussite des premières greffes de moelle osseuse, à la fin des années 50, que cette approche de biothérapie a vu le jour. Depuis, la thérapie cellulaire connaît un essor considérable et de multiples applications cliniques ne cessent d'apporter les preuves de son efficacité. C'est dans ce contexte, et en s'appuyant sur les mécanismes du développement neural ainsi que sur le concept de neuroplasticité, que l'idée d'une thérapie régénératrice du SNC a émergée. En effet, partant du principe que les neurones modifient leurs propres structures et connexions pendant toute leur vie pour répondre aux besoins physiologiques, il serait donc possible de recréer les circuits neuronaux perdus au cours du processus neurodégénératif.

La démonstration d'un effet fonctionnel de greffes intracérébrales de tissu neural a été apportée pour la première fois en 1979 par deux équipes dans le cadre de la maladie de Parkinson (Bjorklund and Stenevi, 1979 ; Perlow et al., 1979). Ces équipes ont observé que la transplantation intrastriatale de neurones dopaminergiques du mésencéphale améliorait les symptômes fonctionnels consécutifs à une lésion induite dans un modèle de rat de cette maladie. Dès lors, ces travaux ont ouvert la voie à de nombreuses études de transplantations dans des modèles animaux de diverses maladies neurodégénératives telles que Parkinson, Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, l'ataxie cérébelleuse et Huntington (Nakao and Itakura, 2000).

2.3.1. Modèles animaux pour les études de transplantation.

Le développement d'une thérapie cellulaire nécessite la mise au point de modèles animaux reproduisant le plus rigoureusement possible les caractéristiques cliniques et neuropathologiques de la maladie. Dans le cadre de l'approche substitutive de la MH, les modèles animaux, dits phénotypiques, les plus couramment utilisés, reposent sur le phénomène d'excitotoxicité. Même si le processus lésionnel finit par atteindre des régions cérébrales extra-striatales, de nombreux arguments indiquent que la MH induit en premier lieu une atteinte du striatum. Ce dernier serait ainsi la structure cérébrale à léser électivement pour la création de modèles animaux. Le premier modèle excitotoxique de la MH chez l'animal a vu le jour en 1976 lorsque deux équipes indépendantes apportèrent la preuve expérimentale de l'implication du processus d'excitotoxicité dans la pathogénèse de cette maladie (Coyle and Schwarcz, 1976 ; McGeer and McGeer, 1976). Ils démontrèrent que l'injection par stéréotaxie d'acide kaïnique, un agoniste du glutamate, dans le striatum de rats entraînait une dégénérescence neuronale sélective en l'absence de toute atteinte des afférences dopaminergiques et des fibres de passage. Des études ultérieures démontrèrent que l'acide iboténique et plus particulièrement l'acide quinolinique (QA) reproduisait encore mieux l'atteinte de la MH (Schwarcz et al., 1983 ; Beal et al., 1986). La lésion ainsi induite n'affecte en effet que les neurones moyens épineux du striatum et préserve les interneurons striataux, mimant par là même ce qui se passe chez l'homme (Figure 15). Chez le rat, des lésions neuropathologiques ainsi que des symptômes moteurs, équivalents à ceux observés dans la MH, sont induits par ces excitotoxines (Brouillet et al., 1999). Néanmoins les désordres moteurs présents ne comprennent pas de dystonies ou de mouvements choréiques (Brouillet et al., 1999). Ces symptômes apparaissent spontanément lorsque la lésion est réalisée de manière bilatérale tandis que lorsqu'elle est induite en unilatérale les symptômes ne se révèlent qu'après stimulation par un agoniste des récepteurs dopaminergiques, l'apomorphine, ou par injection d'amphétamine (permettant la libération de dopamine). Une lésion bilatérale provoque également l'apparition de symptômes cognitifs de types frontaux. La réalisation d'une lésion excitotoxique putaminocaudale unilatérale chez le primate non-humain reproduit le même profil neuropathologique que celui observé dans la MH, et provoque l'apparition de divers mouvements anormaux, incluant des mouvements choréiques, une dyskinésie, et une dystonie après l'administration d'un agoniste dopaminergique (Ferrante et al., 1993 ; Hantraye et al., 1990 ; Brouillet et al., 1999).

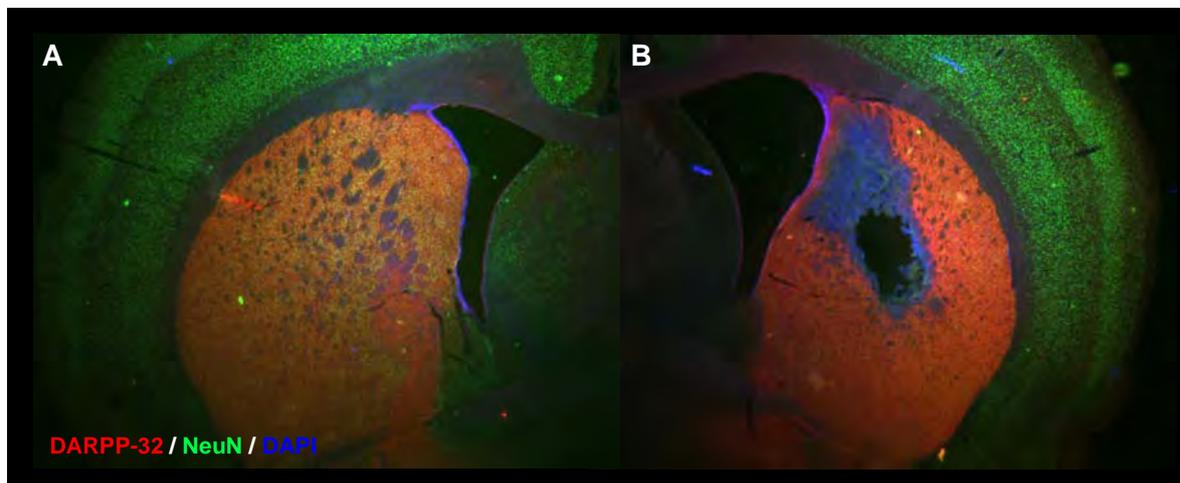


Figure 15 : Coupe coronale d'un cerveau de rat adulte illustrant une lésion excitotoxique après injection de 80nmol d'acide quinolinique au niveau du striatum. (A et B) Analyse immunohistochimique de l'expression d'un marqueur de neurones matures (NeuN), et d'un marqueur de neurones moyens épineux striataux (DARPP32+). (A) Contrôle, (B) Lésion.

Cependant, un tel modèle ne procure pas de symptômes moteurs persistants. Les animaux ayant subi une lésion unilatérale semblent, de plus, ne pas avoir de déficits cognitifs, après évaluation de leur adaptation stratégique au moyen d'un test ORDT (Object Retrieval Detour Task).

Une seconde classe de modèles excitotoxiques a été développée à partir de l'hypothèse qu'un dysfonctionnement mitochondrial participe à la pathogenèse de la MH en provoquant une excitotoxicité indirecte. Chez le rat, ce processus est reproduit en administrant par voie systémique, pendant environ un mois, et de manière chronique du 3-NP (Beal et al., 1993 ; Brouillet et al., 1999). Il en résulte alors des lésions neuronales sélectives bilatérales et symétriques du striatum ainsi que des désordres moteurs n'incluant pas la chorée. Chez le primate non-humain, un traitement systémique chronique au 3NP, pendant 8 mois, induit une lésion striatale bilatérale, sans lésions extra-striatales apparentes. De plus, des mouvements anormaux spontanés incluant notamment des dystonies et des mouvements choréiques apparaissent après le traitement. Des anomalies cognitives de type frontal liées à l'altération du circuit frontostriatal peuvent également être observées, démontrant que ce modèle reproduit les caractéristiques cardinales de la MH (Brouillet et al., 1995 ; Palfi et al., 1996). Bien que le modèle rongeur soit très informatif pour des études exploratoires, le modèle primate non-humain, du fait d'un répertoire comportemental et cognitif plus proche de celui de l'Homme, constitue un modèle pré-clinique incontournable. Ce modèle présente également l'avantage de pouvoir évaluer des changements anatomopathologiques relatifs aux symptômes observés par des techniques d'imageries cérébrales telles que le PET ou l'IRM.

Bien que les modèles excitotoxiques reproduisent bien la pathologie striatale de la MH, ils ne miment pas le processus neurodégénératif progressif induisant entre autre une dégénérescence corticale secondaire. Un paradigme plus fidèle de la pathogenèse de la maladie aurait pu en théorie être obtenu grâce aux modèles murins transgéniques. Cependant, ces modèles présentent peu de mort striatale et des lésions plus largement étendues à d'autres systèmes (Morton et al., 2000), ce qui

explique en pratique que très peu d'études de transplantations striatales aient été réalisées dans ces modèles. Les animaux transgéniques semblent donc plus adaptés à l'étude des mécanismes physiopathologiques à l'origine de la neurodégénérescence et des stratégies thérapeutiques de type pharmacologique. Très récemment, une étude a publié l'élaboration de singe transgénique (Yang et al., 2008a). Une autre approche génétique permet de créer un modèle de la pathologie. Elle est fondée sur l'utilisation de vecteurs viraux codant pour un fragment de la protéine mutée et a été testée chez le singe (Palfi et al., 2007). Malgré le développement de ces nouveaux paradigmes, les modèles excitotoxiques restent les plus pertinents, en l'état actuel des connaissances, pour étudier l'effet d'une transplantation cellulaire sur une éventuelle reconstruction striatale.

2.3.2. Greffe de neurones striataux fœtaux : de la recherche expérimentale aux essais cliniques.

Le bénéfice thérapeutique des transplantations de cellules neurales repose essentiellement sur deux pré-requis : premièrement, le greffon doit suivre et remplacer les neurones détruits, et deuxièmement, il doit s'intégrer dans le circuit neuronal de l'hôte et recréer les connexions détruites afin de restaurer les fonctions normales. Depuis plus de vingt années, des expériences de transplantation de tissu striatal fœtal chez le rat, le singe ainsi que chez l'homme, tendent à évaluer la capacité des tissus fœtaux à répondre à ces conditions.

2.3.2.1. Etudes expérimentales et pré-cliniques.

2.3.2.1.1. Organisations structurale et fonctionnelle de tissus fœtaux de rats transplantés dans un modèle phénotypique rat de la MH.

- **Organisation structurale du greffon.**

L'approche de thérapie cellulaire de la MH fondée sur l'utilisation de tissu fœtal a fait l'objet de nombreux tests expérimentaux, principalement chez le rat, afin notamment de déterminer la meilleure population cellulaire à greffer. Classiquement, les études de transplantation intrastriatale se sont basées sur l'utilisation de cellules issues d'éminences ganglionnaires, zones germinatives à l'origine du striatum, disséquées à partir d'embryons de rat au stade E14-15. Le modèle rongeur typiquement utilisé pour ces études est le modèle phénotypique fondé sur une lésion excitotoxique au moyen d'acide iboténique ou d'acide quinolinique. Le tissu donneur était généralement dissocié sous forme de suspension cellulaire puis implanté dans le striatum 7 à 10 jours après lésion (Figure 16). Après transplantation, les auteurs de ces études ont observés que les cellules greffées maturaient pendant 2 à 6 mois, et que le volume final du greffon atteignait environ 5-12 mm³, sachant que le volume d'un striatum de rat est d'environ 33 mm³ (Fricker-Gates et al., 2001 ; Christophersen and Brundin, 2007). Les analyses phénotypiques des greffons, réalisées entre 9 et 17 mois après greffe, ont révélé que les cellules transplantées étaient morphologiquement hétérogènes et présentaient une organisation interne

particulière en forme de « patchs » (Graybiel et al., 1989). Ces « patchs », aussi dénommés zones-P, sont caractérisés par une forte expression de marqueurs du striatum mature tels que l'AChE (Isacson et al., 1987 ; Graybiel et al., 1989) et DARPP-32 (Victorin et al., 1989 ; Labandeira-Garcia et al., 1991) (Figure 17).

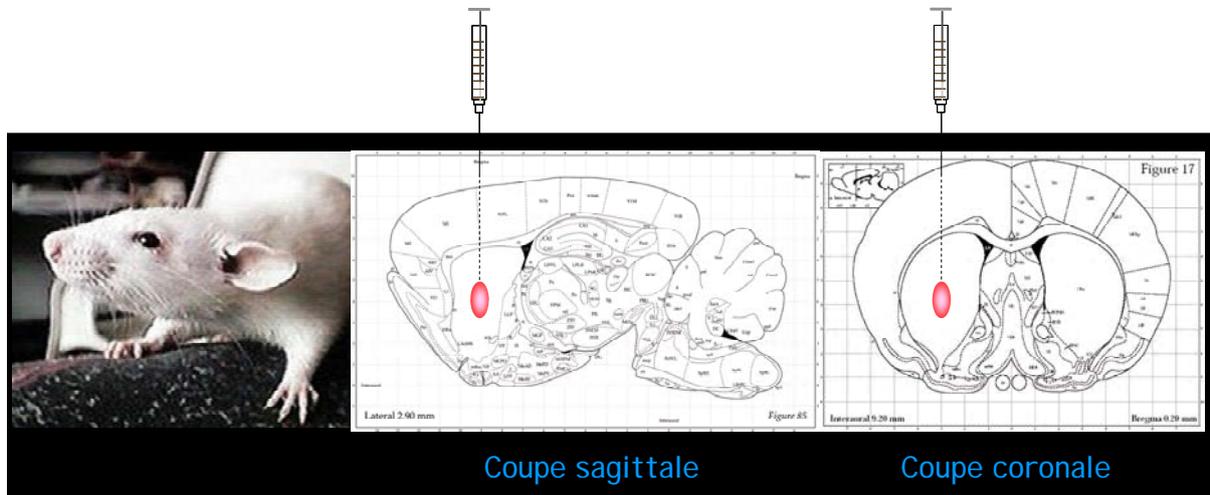


Figure 16 : Illustration du site de transplantation du greffon (en rouge) au niveau du striatum.

Les cellules contenues dans ces zones expriment également des neurotransmetteurs et des neuropeptides caractéristiques des neurones striataux tels que le GABA, STEP, la substance P, la met-enképhaline, et la dynorphine (Isacson et al., 1987 ; Roberts and DiFiglia, 1988 ; Graybiel et al., 1989 ; Campbell et al., 1992). L'expression des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 ainsi que des récepteurs aux opiacés est également caractéristique des cellules présentes dans les zones-P (Isacson et al., 1987 ; Campbell et al., 1995). Une analyse par immunohistochimie des marqueurs GAD, calbindine, ou met-enképhaline a démontré que les neurones présents dans les zones-P sont morphologiquement semblables aux MSN et aux interneurons du striatum (Graybiel et al., 1989 ; Clarke and Dunnett, 1993). De plus, la morphologie des zones-P mime la compartimentalisation striosome-matrice observée dans un striatum normal, bien que la proportion de tissu marqué avec le marqueur de matrice calbindine soit plus importante dans les zones-P que dans le striatum normal (Graybiel et al., 1989). Les zones-P sont entremêlées avec des régions riches en neurones mais négatives pour le marqueur DARPP-32 et qui expriment faiblement AChE et GAD. Ces régions, dénommées zones-NP (non P), ne sont pas constituées de tissu striatal et expriment des marqueurs caractéristiques des neurones du pallidum et du cortex (DiFiglia et al., 1988 ; Graybiel et al., 1989) qui sont également dérivés des éminences ganglionnaires. Les études d'allogreffe chez le rat montrent ainsi que les neurones fœtaux issus des éminences ganglionnaires, comprenant à la fois du MGE (éminence ganglionnaire médiale) et du LGE (éminence ganglionnaire latérale), survivent et mûrissent en neurones exprimant les marqueurs du striatum normal. Il ressort également de ces expériences que

la maturation de ces greffons suit la chronobiologie du développement embryonnaire normal du striatum (Fricker-Gates et al., 2001).

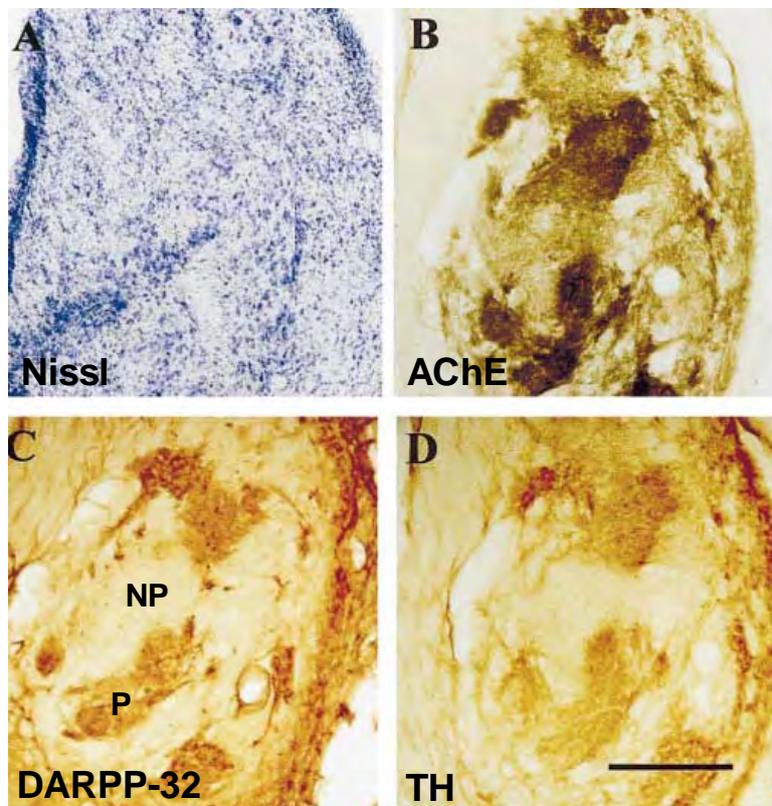


Figure 17 : Marquage immunohistochimique illustrant l'organisation type du greffon en zones-P (P) et non-P (NP) (Watts et al., 2000).

- **Organisation fonctionnelle du greffon.**

Les nombreuses expériences de transplantation intrastriatale réalisées, notamment chez le rat, ont permis de mettre en évidence une reconstruction anatomique des connexions neuronales perdues après lésion. Ainsi des analyses par immunohistochimie de l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH), un marqueur de neurones dopaminergiques, (Wictorin et al., 1989 ; Labandeira-Garcia et al., 1991) ou l'utilisation d'un traceur rétrograde ont démontré que le greffon recevait des afférences de la substance noire de l'hôte (Wictorin et al., 1988). De plus, les fibres TH dérivées de l'hôte forment des patches qui co-localisent avec les zones-P du greffon, positives pour les marqueurs DARPP-32 et AChE (Wictorin et al., 1989). Par ailleurs, des observations ultrastructurales ont montré que les terminaisons dopaminergiques TH-positives établissaient des synapses avec les MSN du greffon (Clarke et al., 1988). Une innervation du greffon par des afférences du cortex frontal de l'hôte a également été démontrée, notamment par l'utilisation de traceurs rétrograde et antérograde (Wictorin and Bjorklund, 1989). Des études de microscopie électronique ont mis en évidence l'établissement de contacts synaptiques asymétriques entre les afférences corticales de l'hôte et les neurones striataux du

greffon (Wictorin and Bjorklund, 1989 ; Clarke and Dunnett, 1993). De même, des études utilisant des techniques identiques ont révélé l'existence d'une innervation thalamique du greffon (Wictorin et al., 1988 ; Wictorin and Bjorklund, 1989). Enfin, des afférences sérotoninergiques innervent également les cellules implantées. Contrairement aux afférences dopaminergiques, les fibres sérotoninergiques n'ont pas de distribution en forme de « patches » (Wictorin et al., 1988). Il apparaît également que les neurones striataux du greffon projettent et forment des synapses avec le pallidum et la substance noire (Wictorin et al., 1990 ; Campbell et al., 1995).

Différentes approches expérimentales ont permis de démontrer que ces reconnections établies entre le cerveau de l'hôte et le greffon sont fonctionnelles. Ainsi des études ont montré qu'après stimulation par des drogues induisant le relargage de dopamine, telles que la cocaïne ou l'amphétamine, le proto-oncogène c-Fos, un marqueur de l'activation neuronale, était activé spécifiquement dans les neurones des zones-P (Mandel et al., 1992 ; Watts et al., 2000) (Figure 18). Ces résultats indiquent clairement que les afférences dopaminergiques de l'hôte ainsi que les récepteurs de la dopamine exprimés par le greffon sont fonctionnels. De plus, une stimulation bilatérale ou unilatérale du cortex induit l'expression de c-Fos dans les neurones DARPP-32+ situés dans les zones-P du greffon (Labandeira-Garcia and Guerra, 1994) (Figure 18). D'autre part, des études d'électrophysiologie ont apporté la preuve d'un effet fonctionnel des afférences corticales et thalamique sur le greffon dunnett (Rutherford et al., 1987). Il a également été démontré que les afférences du greffon étaient fonctionnelles. La transplantation intrastriatale de neurones fœtaux restaure le niveau des enzymes GAD et ChAT ainsi que le niveau de GABA (Campbell et al., 1993) dans le striatum, le pallidum et la substance noire. Des techniques permettant de cartographier les activités métaboliques ont démontré par ailleurs que le greffon pouvait normaliser cette activité dans certaines régions cérébrales connectées au striatum, telles que le pallidum ou le noyau subthalamique (Isacson et al., 1984 ; Nakao and Itakura, 2000). L'ensemble de ces études démontrent ainsi la capacité du greffon à s'intégrer dans le parenchyme de l'hôte.

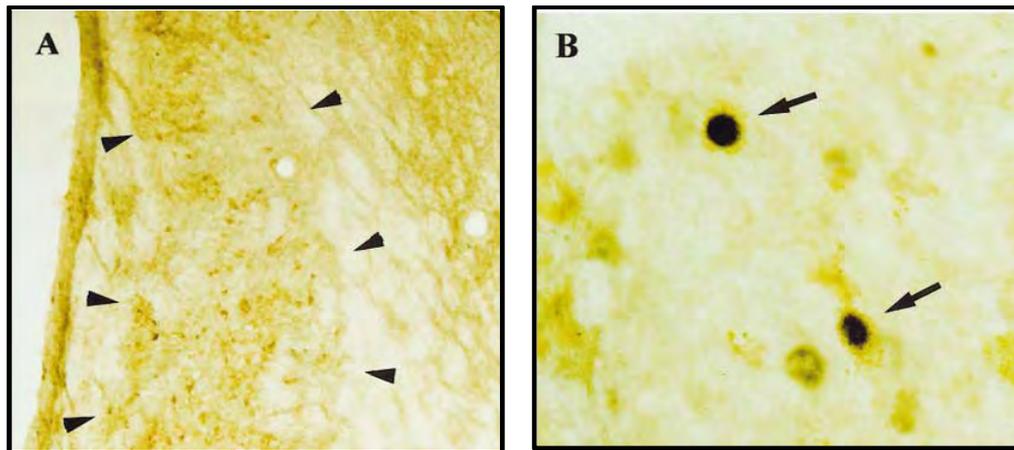


Figure 18 : Marquage immunohistochimique d'une coupe de cerveau de rat illustrant les connexions fonctionnelles entre le greffon et les cellules de l'hôte : (A) Visualisation des projections striatopallidales au moyen d'un rétrotraceur, le Fluorogold, et (B) marquage c-Fos démontrant la fonctionnalité des connexions corticostriatales (Watts et al., 2000).

2.3.2.1.2. Etudes comportementales.

D'un point de vue comportemental, de nombreux travaux ont apporté la preuve expérimentale de l'amélioration d'un certain nombre de déficits comportementaux après implantation de tissu striatal foetal dans le striatum lésé. Ces études ont été réalisées en majorité chez le rat lésé par excitotoxicité. Les comportements anormaux observés chez le rat peuvent être divisés en trois catégories : 1- des déficits moteurs simples, 2- des dysfonctionnements moteurs plus complexes, 3- et enfin des perturbations des fonctions cognitives. Les déficits simples après lésion incluent une hyperactivité locomotrice spontanée ou induite par de l'amphétamine, des altérations de la catalepsie induite par de l'halopéridol, et des rotations asymétriques provoquées par des agonistes de la dopamine. Des dysfonctions motrices plus complexes, impliquant un circuit neuronal intact, peuvent être visualisées par des tests faisant appel par exemple à l'habilité à utiliser les pattes avant (test de « paw-reaching »). Ces tests permettent notamment d'évaluer l'intégration des neurones du greffon dans le système nigro-striatal et l'aire sensori-motrice du cortex (Whishaw et al., 1986). Les symptômes cognitifs peuvent quant à eux être observés au cours de tests évaluant le retard à réaliser certaines tâches. Plusieurs travaux ont ainsi démontré une diminution de l'hyperactivité locomotrice, 3 à 5 mois après transplantation dans des striata lésés de manière unilatérale ou bilatérale (Deckel et al., 1986 ; Isacson et al., 1984). De plus, des tests de rotations asymétriques, induites par l'apomorphine ou l'amphétamine, ont mis en évidence une corrélation inverse entre la survie des neurones DARPP-32 et le degré de rotations asymétriques (Nakao et al., 1996 ; Nakao and Brundin, 1997). Dunnett et collaborateurs ont démontré par ailleurs que la présence du greffon entraînait une réduction de 70% des rotations, induites par des agents pharmacologiques (Dunnett et al., 1988). Des tests de « paw-reaching » ont permis en outre d'établir une corrélation entre le volume de zone-P et les améliorations

fonctionnelles (Nakao et al., 1996 ; Fricker et al., 1997). D'autres auteurs ont démontré une restauration de certaines fonctions cognitives (Nakao and Itakura, 2000). L'ensemble de ces études comportementales démontrent ainsi la fonctionnalité des cellules implantées (Nakao and Itakura, 2000).

2.3.2.1.3. Amélioration du greffon.

Parallèlement à ces études, plusieurs groupes ont cherché à optimiser les conditions de transplantation en vue d'augmenter la survie et le nombre de neurones striataux au sein du greffon de façon à améliorer la reconstruction fonctionnelle de la zone lésée. Jusqu'au début des années 1990, les études de transplantation striatale utilisaient comme tissu donneur les éminences ganglionnaires entières (WGE) comprenant à la fois du MGE et du LGE. Ce type de greffon permettait d'obtenir une proportion de zones-P de 30 à 50% du volume total du greffon (Isacson et al., 1987 ; Graybiel et al., 1989 ; Wictorin et al., 1989). Des expériences ultérieures ont démontré que la proportion de zones-P pouvait atteindre jusqu'à 80-90% en ne greffant que du LGE, tandis que la greffe de MGE seule permet d'obtenir seulement 25% de zones-P (Pakzaban et al., 1993 ; Olsson et al., 1998 ; Olsson et al., 1995). Ces études indiquent que le LGE serait à l'origine des neurones striataux de projections tandis que le MGE serait la source des interneurones striataux ainsi que des zones-NP (Olsson et al., 1998 ; Olsson et al., 1995). Cependant, des greffes de WGE E14 contiennent plus de neurones DARPP-32 positifs que les greffes de LGE E14 (Fricker-Gates et al., 2001). Ceci suggère que les cellules issues du MGE jouent un rôle important dans la survie et la différenciation des neurones striataux de projections issus du LGE (Fricker-Gates et al., 2001). Les interneurones striataux provenant du MGE pourraient être importants pour la modulation et le contrôle des contacts synaptiques des neurones de projections issus du greffon. Il semble donc plus efficace de transplanter les éminences ganglionnaires dans leur totalité plutôt que de restreindre le tissu donneur au LGE.

Un autre facteur influençant le volume de zone-P dans le greffon est l'âge et le stade de développement du tissu donneur. La proportion de tissu greffé exprimant des marqueurs striataux tels que AChE et STEP est diminuée lorsque le tissu donneur est pris sur des embryons plus âgés (Fricker et al., 1997). Ainsi, avec des embryons E14 le volume de zones-P est d'environ 40%, avec des embryons E16-17 il est de 30% et avec des embryons E18 il est de 15%. Toujours dans un souci d'optimisation du protocole de transplantation, certains auteurs ont étudié l'influence du nombre de cellules greffées sur le nombre de neurones DARPP-32 au sein du greffon. Il ressort de ces expériences qu'une augmentation du nombre de cellules implantées n'a pas d'effet significatif sur la proportion de neurones DARPP-32 (Watts et al., 2000 ; Fricker-Gates et al., 2001).

2.3.2.1.4. Xénogreffe de tissu fœtal humain dans un rat modèle phénotypique de la MH.

Le développement d'une approche de thérapie cellulaire efficace pour la MH nécessite la validation pré-clinique d'un protocole de transplantation dans des modèles animaux de la maladie. Ceci implique la détermination et l'optimisation des paramètres d'obtention et de préparation des cellules à greffer. Une première étude a consisté en la xénogreffe d'éminences ganglionnaires issues de fœtus humains ayant 8 à 10 semaines de gestation dans des rats immunosupprimés (Victorin et al., 1990). Trois à six mois après transplantation, 60% des greffons avaient survécu et présentaient une organisation en forme de patches, constitués de neurones exprimant la protéine DARPP-32. Sept de ces greffons présentent de longues fibres, positives pour le marqueur HNF (human neurofilaments), qui projettent dans la capsule interne et à travers le tronc cérébral vers le pédoncule cérébral. Ces fibres sont également retrouvées dans le corps calleux, les couches corticales profondes, le globus pallidus et la SNr. Peu de fibres sont présentes dans le thalamus. Des analyses fondées sur l'utilisation de traceurs rétrogrades démontrent la présence d'afférences au sein des régions matures. Ces analyses démontrent ainsi que les neuroblastes humains peuvent, dans un contexte de xénogreffe, se différencier en neurones (exprimant pour certains la protéine DARPP-32) et émettre des projections le long des voies striato-nigral et cortico-ponto-spinal (cibles normales des neurones striataux et corticaux). Une différenciation striatale ainsi que des connexions avec le parenchyme de l'hôte ont également été mises en évidence dans une autre étude (Pundt et al., 1996). Ces travaux sont fondés sur la greffe de tissus fœtaux ayant entre 7 et 10 semaines de gestation. Ils rapportent que les cellules greffées survivent bien 9 à 17 semaines après transplantation. Les greffons présentent une composition cellulaire hétérogène. Ils sont constitués de neurones matures, exprimant des marqueurs striataux tels que AChE et NADPH-d, et des cellules immatures, avec un rapport nucléocytoplasmique élevé. Dans deux cas, l'analyse *post-mortem* des cerveaux a révélé la présence de cellules très prolifératives compressant le parenchyme de l'hôte (Pundt et al., 1996). Des fibres TH-positives ont pu être détectées dans le greffon, indiquant la présence de fibres dopaminergiques de l'hôte. Cette expérience a ainsi révélé une possible prolifération du greffon. Une telle observation a également été rapportée par d'autres études (Grasbon-Frodl et al., 1996 ; Naimi et al., 1996). Cependant, ce problème n'ayant pas été retrouvé dans les nombreuses expériences d'allogreffes, ce phénomène de surprolifération pourrait être attribué à la capacité de croissance des cellules humaines, en comparaison de la relative petite taille du cerveau de rat. D'autres différences par rapport aux allogreffes de fœtus de rat ont pu être identifiées. Tout d'abord, les xénogreffes de neurones striataux fœtaux humains présentent une plus faible proportion de zone-P en comparaison avec ce qui avait été observé avec les allogreffes chez le rat (Grasbon-Frodl et al., 1996 ; Naimi et al., 1996). D'autre part, malgré l'administration d'immunosuppresseur, 30 à 60% du greffon ne survit pas (Grasbon-Frodl et al., 1996 ; Naimi et al., 1996 ; Geny et al., 1994). Il ressort par ailleurs de l'ensemble de ces résultats que la maturation des

greffons humains est très lente. En effet, des expériences de xéno greffe de tissus fœtaux humains chez le rat rapportent que seule une très faible proportion de neurones calbindine+ est détectée six mois après transplantation, et que le marquage AChE est variable (Grasbon-Frodl et al., 1996). Une étude de la vascularisation du greffon traduit également une maturation lente des cellules greffées. Dans cette expérience, les cellules fœtales sont greffées dans un cerveau de rat préalablement lésé par de l'acide kaïnique au niveau du thalamus. Les auteurs démontrent que l'angiogénèse s'établit de manière très lente dans les greffons humains. En effet, les cellules humaines ne semblent pas être vascularisées avant au moins un mois, et la densité des vaisseaux sanguins est faible trois mois après transplantation. Au cours de cette expérience, la formation des vaisseaux serait en partie due à la présence de cellules endothéliales issues des tissus fœtaux greffés.

Le point critique d'un protocole de transplantation efficace réside dans l'identification de tissus donateurs appropriés. Une combinaison d'études du développement embryonnaire humain, de culture *in vitro* de cellules striatales humaines ainsi que des expériences de xénotransplantation dans des rats ou des souris, indique que des fœtus humains de 7 à 9 semaines de gestation semblent procurer de meilleurs résultats en terme de différenciation en neurones striataux *in vivo* (Naimi et al., 1996 ; Rosser et al., 2003). L'ensemble de ces études ont permis ainsi de démontrer que des tissus fœtaux humains pouvaient maturer en neurones striataux dans un contexte de xéno greffe.

2.3.2.1.5. Transplantation dans des modèles primates non-humains.

Bien que les modèles rats de la MH aient apporté de nombreuses preuves expérimentales de l'efficacité des transplantations de neuroblastes striataux fœtaux, ils ne permettent cependant pas d'étudier l'effet de telles greffes sur certains symptômes majeurs tels que les mouvements choréiques ou certains désordres cognitifs. La validation pré-clinique de l'approche de thérapie cellulaire a donc nécessité l'utilisation de modèles primates non-humains. Ces modèles, comme cela a été décrit précédemment, sont établis soit par excitotoxicité directe en injectant du QA dans le striatum (Hantraye et al., 1992 ; Kendall et al., 1998), soit par excitotoxicité indirecte en administrant par voie systémique du 3-NP (Palfi et al., 1998). Une étude de xéno greffe de tissu striatal de fœtus de rat (E14-16), dans des babouins lésés unilatéralement avec du QA, a montré la présence de neurones marqués par l'enképhaline. Ces travaux décrivent aussi une réduction significative de l'incidence des mouvements moteurs tels que la dystonie et la dyskinésie induits par l'apomorphine, et ceci 7 semaines après transplantation (Hantraye et al., 1992). D'autres travaux rapportent une allogreffe de WGE dans des marmousets, dont le putamen a été lésé unilatéralement avec du QA (Kendall et al., 1998). Il a été montré dans cette étude une amélioration des symptômes moteurs, induits par l'apomorphine, et cognitifs, suite à un test ORDT réalisé 2 à 3 mois après greffe (Kendall et al., 1998). Cette amélioration est maintenue 9 mois après implantation. L'analyse *post-mortem*, 10 à 12 mois post-greffe des cerveaux, a démontré la présence de neurones DARPP-32+, et des zones marquées par l'AChE. Ces résultats indiquent, telle qu'observée chez le rat, la formation de zones-P et de zones-NP.

Des afférences dopaminergiques et corticales innervant les zones-P ont également été mises en évidence. Enfin, des résultats similaires ont été obtenus lors d'une étude fondée sur un autre modèle phénotypique (3-NP), induisant une lésion bilatérale du striatum. Cette allogreffe bilatérale de LGE a mis en évidence une restauration complète des fonctions cognitives, évaluées au cours d'un test ORDT. Cette amélioration s'observe 2 mois après transplantation et persiste pendant au moins 5 mois (Palfi et al., 1998). L'ensemble de ces données démontre ainsi la capacité de neuroblastes fœtaux à survivre, se différencier, s'intégrer et améliorer des désordres moteurs et cognitifs, ouvrant ainsi la voie aux essais cliniques.

2.3.2.2. Les essais cliniques

L'ensemble des expériences de greffes précitées a apporté les preuves expérimentales de l'efficacité d'une stratégie de thérapie substitutive de la MH. Ces preuves expérimentales ainsi que l'expertise acquise en terme de greffes chez des patients parkinsoniens ont permis d'envisager l'application d'une telle approche à la MH (Peschanski et al., 1995). Dans ce contexte, plusieurs études cliniques fondées sur la greffe de neuroblastes issus de foetus humains, ont été initiées depuis les années 1990 (Figure 19). Pour la plupart, les essais cliniques ont été menés chez des patients atteints de la MH à des stades précoces.



Figure 19 : Illustration des étapes avant transplantation chez un patient atteint par la MH : depuis l'obtention du fœtus jusqu'à la dissection des éminences ganglionnaires et enfin la greffe des neuroblastes fœtaux au niveau du striatum du patient.

Au cours d'un essai, un patient est décédé 18 mois après transplantation sans lien avec l'acte neurochirurgical. L'analyse *post-mortem* de son cerveau a montré que les cellules du greffon avaient survécu et adoptaient une morphologie typique du striatum en développement (Freeman et al., 2000). La présence de larges zones (environ 50% du greffon) de neurones phénotypiquement similaires aux neurones de moyens épineux (DARPP-32+, enképhaline+, substance P+) et aux interneurons striataux (calrétinine+, AChE+) a été détectée au sein de ce greffon (Figure 20). Les cellules transplantées apparaissent innervées par des fibres dopaminergiques de l'hôte. L'absence d'agrégats nucléaires dans les neurones greffés indique que ces derniers ne semblent pas affectés par la maladie. La survie, la différenciation striatale et l'absence d'agrégats dans les neurones du greffon ont

également été observées chez deux patients décédés un peu plus de 6 ans après transplantation (Keene et al., 2007). Cependant dans cette étude, malgré la survie prolongée du greffon, ce dernier ne s'est que très peu intégré dans le striatum de l'hôte expliquant vraisemblablement le manque d'une amélioration clinique nette chez ces patients (Keene et al., 2007). Une autre étude récente démontre l'augmentation de l'expression du récepteur dopaminergique D2 et un bénéfice clinique, 5 ans après transplantation chez un des deux patients greffés (Reuter et al., 2008). Mais l'évidence la mieux établie d'une innocuité et d'une efficacité de la transplantation de tissus striataux de fœtus a été obtenue grâce à un essai clinique effectué en France en 1998 (Bachoud-Levi et al., 2006 ; Bachoud-Levi et al., 2000b). Au cours de cet essai, des fragments de WGE de fœtus humains âgés de 7,5 à 9 semaines ont été implantés, de manière bilatérale à un an d'intervalle, dans le noyau caudé et le putamen de cinq patients. Cette étude indique en particulier que trois des cinq patients greffés présentent des améliorations cognitives, motrices et fonctionnelles environ 12 mois après la première greffe. De manière importante, des études par PET et IRM indiquent une amélioration de l'activité métabolique du striatum mais aussi du cortex cérébral, et plus particulièrement du lobe frontal, deux ans après greffe (Bachoud-Levi et al., 2006 ; Bachoud-Levi et al., 2000b) (Figure 21). Ceci suggère une restauration fonctionnelle des boucles cortico-striatales traduisant l'intégration des cellules greffées dans le circuit local (Gaura et al., 2004). Cependant, malgré une période d'amélioration suivie d'une phase de stabilisation, les patients finissent par décliner 4 à 6 ans après transplantation (Bachoud-Levi et al., 2006). La thérapie substitutive basée sur l'implantation intrastriatale de tissu striatal fœtal ne semble donc pas offrir une solution définitive aux patients. D'autre part, une étude récente réalisée au cours d'un essai clinique a mis en évidence, chez un nombre significatif de patients, des signes d'allo-immunisation contre les neuroblastes fœtaux greffés, et ceci, quelques mois après arrêt du traitement immunosuppresseur (Krystkowiak et al., 2007). Un phénomène de rejet du greffon, accompagné d'une détérioration des signes cliniques et d'une perte de poids, a été décrit chez un seul patient. Ce phénomène est cependant réversible dès rétablissement du traitement. Cette étude démontre clairement l'importance de prendre en considération la réponse immunitaire cérébrale. Il convient de noter que la stratégie substitutive constitue à ce jour l'approche expérimentale apportant le plus de bénéfices à long terme aux patients atteints par la MH. Les résultats encourageants obtenus au cours de ces études préliminaires ont donc permis le lancement d'un large essai multicentrique chez plus d'une centaine de patients dans 11 centres répartis dans 6 pays d'Europe (Peschanski and Dunnett, 2002).

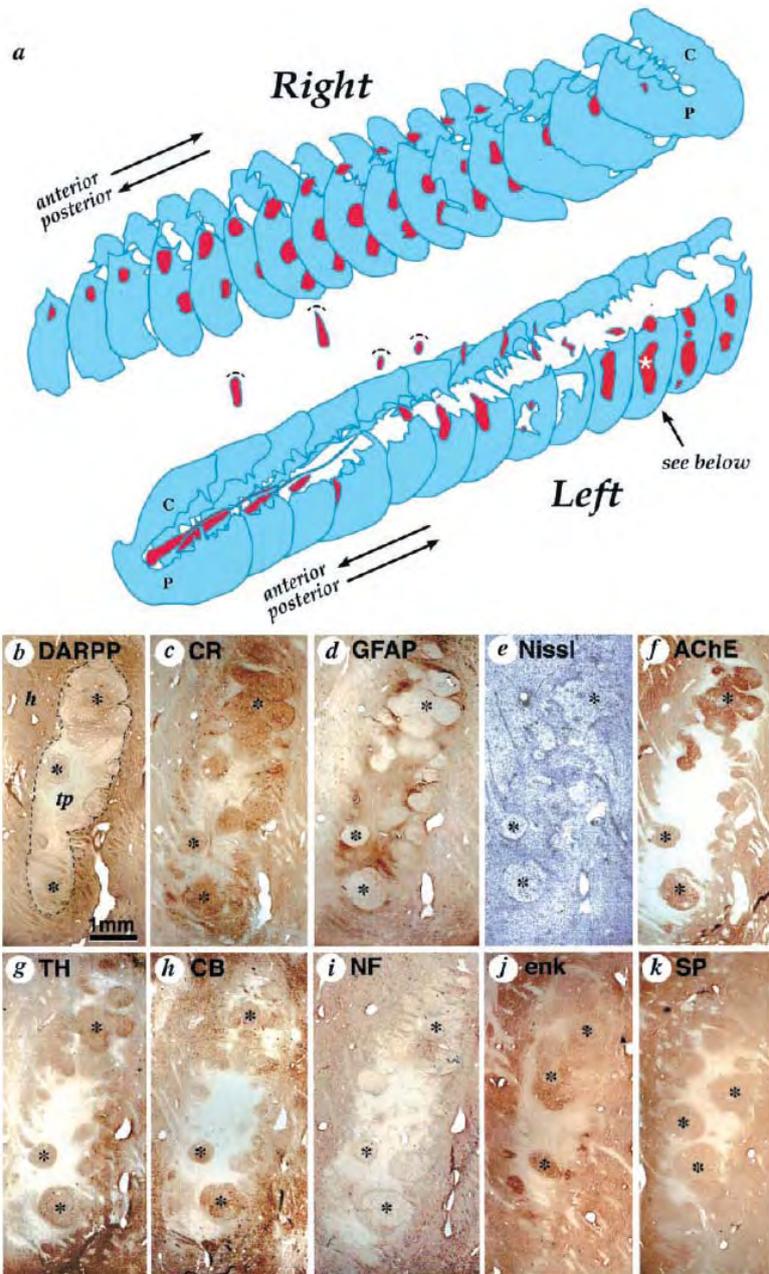


Figure 20 : Localisation et phénotype d'une allogreffe chez un patient atteint de la MH décédé 18 mois après transplantation. (a) Représentation schématique tridimensionnelle du noyau caudé et du putamen illustrant la position du greffon (en rouge). (b-k) Analyse immunohistochimique révélant le phénotype striatal du greffon (Freeman et al., 2000).

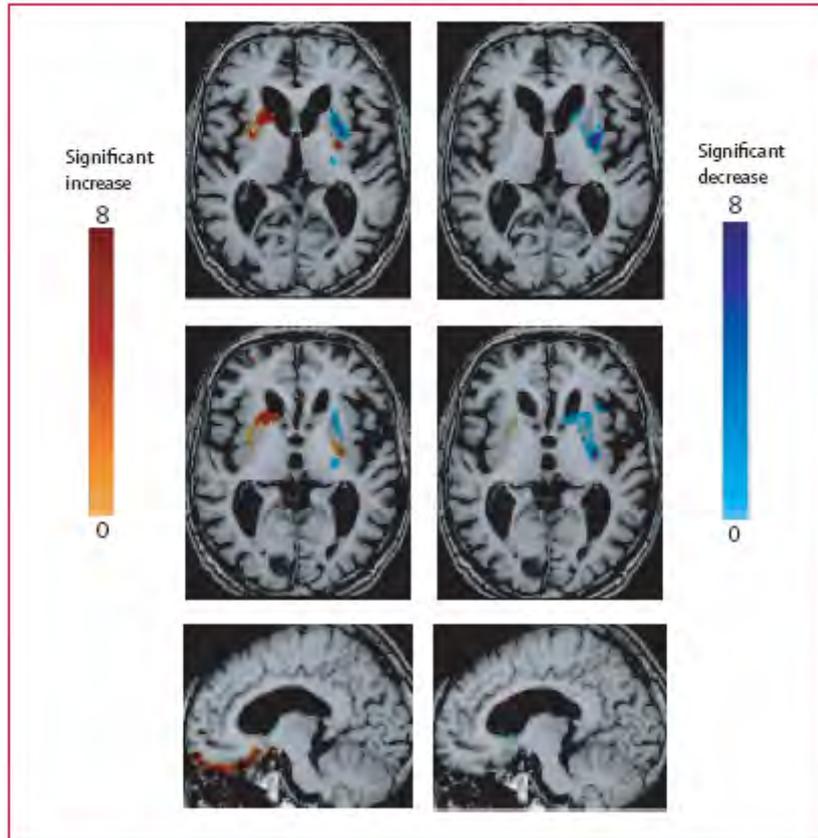


Figure 21 : Analyse par imagerie PET des changements de la consommation de glucose au niveau du cerveau d'un patient greffé : Superposition des changements d'activité métabolique se produisant entre l'analyse faite avant la greffe et deux ans après greffe (à gauche) et entre six ans et deux ans après greffe (à droite). Les zones de couleurs jaune-rouge indiquent les régions pour lesquels l'hypométabolisme s'est amélioré significativement ($p < 0.0005$) entre les deux mesures. Les zones de couleur bleue indiquent les régions pour lesquelles l'hypométabolisme s'est détérioré significativement ($p < 0.0005$) entre les deux mesures (Bachoud-Levi et al., 2006).

2.3.3. Sources alternatives de tissus donneurs.

Malgré la démonstration d'un bénéfice thérapeutique, un certain nombre de contraintes pratiques - standardisation, approvisionnement et amplification - limite l'application d'une approche substitutive à partir de neuroblastes fœtaux humains à un nombre restreint de patients. Par conséquent, ces quinze dernières années ont vu l'émergence d'une recherche active de sources cellulaires alternatives, incluant notamment des cellules immortalisées, des xéno greffes de tissu fœtal et des cellules souches (Dunnett and Rosser, 2007). En vue d'une application clinique, une source cellulaire alternative devrait présenter une innocuité et un potentiel thérapeutique au moins équivalent au tissu fœtal, qui constitue la référence en matière de greffe. Elle devra également répondre à la nécessité de créer une banque cellulaire à disposition des neurochirurgiens.

La « quête » d'une source cellulaire alternative aux greffons fœtaux humains a conduit de nombreuses équipes à explorer le potentiel thérapeutique de lignées de progéniteurs neuraux multipotents immortalisés. Ces cellules sont isolées à partir de diverses régions du SNC en

développement et immortalisées selon différentes techniques (Gage et al., 1995). Le potentiel de différenciation en cellules gliales et en neurones spécifiques du site d'implantation de plusieurs de ces lignées a été testé dans des striata de rats, aussi bien intacts que lésés. Il ressort principalement de ces travaux que les cellules greffées survivent et peuvent migrer dans le cerveau de l'hôte sans former de tumeur (Fricker-Gates et al., 2001). Certaines études ont pu mettre en évidence la maturation et la différenciation de cellules immortalisées RN33B (lignée de cellules neurales de rat dérivées du raphé médullaire en développement) en cellules exprimant des marqueurs de MSN tels que DARPP-32 et STEP (Lundberg et al., 1997 ; Lundberg et al., 1996). Cependant, la majeure partie des études menées indique que peu de cellules greffées adoptent un phénotype neuronal mature, tandis qu'un nombre plus important développe une morphologie gliale (caractérisé par le marqueur GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ou reste immature (Lundberg et al., 1997 ; Dunnett and Rosser, 2007). Le peu d'études comportementales réalisées avec ces cellules n'apporte pas de résultats concluants (Dunnett and Rosser, 2007).

Une autre catégorie de cellules, les cellules souches, a également attiré l'attention de bon nombre de chercheurs. Les cellules souches, qu'elles soient neurales, non-neurales, adultes, fœtales, ou encore embryonnaires, ont ceci d'intéressant qu'elles ont la capacité de s'autorenouveler *in vitro* et de se différencier en différentes populations cellulaires (multi/pluripotence). Parmi ces cellules, les cellules souches neurales (CSN) fœtales, humaines, murines ou de rat, ont fait l'objet de nombreuses investigations. Classiquement, ces cellules sont cultivées sous forme de neurosphères en présence de facteurs tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le FGF2 (Fibroblast Growth Factor), ou le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (Reynolds et al., 1992 ; Carpenter et al., 1999 ; Armstrong et al., 2000). Les CSN fœtales sont multipotentes ce qui se traduit par une capacité à produire des neurones et des cellules gliales. Tandis que les CSN fœtales murines maintiennent à long terme ce caractère multipotent *in vitro*, les CSN fœtales humaines et de rat perdent leur potentiel neurogénique au cours des passages. Il ressort de certains travaux que les progéniteurs neuraux humains et de rats produisant le plus de neurones *in vivo* et pouvant adopter un phénotype striatal (DARPP-32+) sont ceux ayant eu une période de culture *in vitro* courte, généralement inférieure à deux semaines, et ayant subi un seul voire aucun passage (Armstrong et al., 2000 ; Fricker-Gates et al., 2001 ; Vazey et al., 2006). En effet, les progéniteurs neuraux fœtaux ayant été cultivés pendant un temps plus long (supérieur à 2 semaines et avec plusieurs passages) ont un potentiel de différenciation neuronal très limité, et adoptent pour la plupart un phénotype glial ou restent indifférenciés (Englund et al., 2002 ; Jain et al., 2003 ; Dunnett and Rosser, 2007). De plus, une trop longue période de culture *in vitro* empêche la survie à long terme de ces progéniteurs après transplantation dans un striatum de rat adulte (Zietlow et al., 2005). Enfin, certaines expériences de transplantation indiquent que très peu de ces cellules, voire aucune, expriment des marqueurs spécifiques du striatum lorsqu'elles sont cultivées plus de 4 semaines *in vitro* (Zietlow et al., 2005). Des études de transplantation dans des modèles animaux de maladies neurodégénératives démontrent que la différenciation de ces cellules en neurones, ayant des caractéristiques phénotypiques

et fonctionnelles appropriées au site d'implantation, présentent un succès limité (Englund et al., 2002 ; Rossi and Cattaneo, 2002).

Depuis leur identification, les cellules souches embryonnaires (ES) offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement des maladies neurodégénératives. Bien qu'il y ait de nombreuses publications relatant des expériences de transplantation de progéniteurs neuraux dérivés de cellules ES dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson, très peu d'études du même type concernent la MH. En 1998, une équipe démontra que des cellules ES de souris étaient capables de se différencier en neurones GABAergiques *in vitro*, sous contrôle de l'acide rétinoïque, et de maintenir ce phénotype après transplantation dans un striatum lésé par du QA (Dinsmore et al., 1996 ; Dinsmore et al., 1998). D'autre part, les cellules greffées exprimant les marqueurs Tuj1 et NSE (neuron-specific enolase) étaient également positives pour l'ACHé (Dinsmore et al., 1996 ; Dinsmore et al., 1998). Dans une autre étude, Dihné et ses collaborateurs ont développé un protocole de différenciation *in vitro* de cellules ES de souris en précurseurs neuraux basé sur la formation d'agrégats (Dihne et al., 2006). Lorsque ces précurseurs neuraux sont greffés à un stade de différenciation *in vitro* précoce, caractérisé par l'expression du marqueur de cellules neurales Nestine, ils forment des tumeurs. En revanche, des cultures cellulaires contenant plus de 75% de neurones immatures (β -tubulin+) ne développent pas de tumeurs. Les cellules greffées contiennent environ 60% de cellules NF-200+, des cellules positives pour les marqueurs neuronaux NeuN et SV-2, 35% d'astrocytes et 5% d'oligodendrocytes. A ce jour, une seule étude a rapporté la greffe de précurseurs neuraux dérivés de cellules souches embryonnaires humaines dans un modèle animal de la MH (Song et al., 2007). Dans cette étude, des précurseurs neuraux immatures (Nestine+) sont transplantés dans un striatum de rat lésé par du QA. Trois semaines après implantation, les auteurs observent que les cellules greffées survivent et ne forment pas de tumeurs, contrairement à l'étude précitée. La majorité des cellules expriment les marqueurs de neurones immatures Nestine et Tuj1, et certaines sont positives pour le marqueur de neurones GABAergiques GAD6. Des améliorations comportementales au cours du test de rotations induites par l'apomorphine ont été observées chez les animaux transplantés. Malgré la présence de neurones GABAergiques démontrée dans leurs greffons, les auteurs de ces travaux ne détectent, en revanche, aucun neurone DARPP-32.

A ce jour, aucune des sources cellulaires précédemment citées n'a permis d'obtenir des résultats équivalents à ceux observés avec les neuroblastes fœtaux. La recherche d'une source cellulaire alternative à ces derniers constitue par conséquent un enjeu majeur pour la thérapie cellulaire de la MH.

3. Cellules souches embryonnaires humaines et différenciation neuronale.

Le caractère pluripotent et la capacité d'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires (ES) font de ces cellules des outils particulièrement intéressants pour étudier le développement embryonnaire des mammifères, et notamment de l'homme, ou pour produire de nouvelles sources cellulaires pour la médecine régénératrice. Pour ce faire, il est cependant nécessaire de maîtriser les diverses étapes conduisant les cellules ES vers une population cellulaire spécifique. Depuis plus d'un siècle, de nombreux travaux ont permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires régissant la spécification des cellules de l'épiblaste vers les trois feuilletts embryonnaires et leurs dérivés. C'est en s'appuyant sur ces données de l'embryologie que de nombreuses équipes de recherche à travers le monde tentent, en particulier, de récapituler *in vitro* les étapes de la neurogenèse embryonnaire à partir de cellules ES. Avant d'aborder les différentes approches expérimentales permettant l'obtention de précurseurs neuraux et de leurs différents dérivés neuronaux à partir de cellules souches embryonnaires humaines (hES), il convient donc de rappeler les étapes successives de l'élaboration du SNC, et plus particulièrement du striatum, ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués.

3.1. Aspects cellulaires et moléculaires du développement striatal.

L'édification du cerveau humain constitue sans doute le chapitre le plus complexe de notre développement. La neurogenèse, se définissant par la progression des cellules ectodermiques naïves vers un stade de neurones post-mitotiques, a pu être divisée en 4 étapes distinctes : (1) la compétence, les cellules de l'ectoderme pourront devenir des précurseurs neuraux si elles sont soumises à une combinaison de signaux appropriés ; (2) la spécification, l'intervention de facteurs inhibiteurs de la voie neurale peut encore changer la destinée des précurseurs neuraux ; (3) la détermination (engagement, ou « commitment »), même en présence de signaux inhibiteurs, les cellules poursuivent leur chemin vers un phénotype neuronal ; et enfin (4) la différenciation, les précurseurs neuronaux quittent le cycle cellulaire pour devenir des neurones post-mitotiques exprimant certains gènes spécifiques (Wilson and Edlund, 2001). L'ensemble de ce processus est régi par l'intégration spatio-temporelle, selon les axes rostro-caudal et dorso-ventral, d'une multitude de signaux morphogénétiques et par l'expression des facteurs de transcription qui en résultent (Lupo et al., 2006 ; Hebert and Fishell, 2008).

Chez l'homme, c'est au cours de la 6^e semaine du développement que le striatum prend forme, tandis que chez le rat il apparaît entre E12 et E15 (Jain et al., 2001). Le corps strié trouve son origine au sein du télencéphale ventral, et plus particulièrement d'un sous-domaine de ce dernier : le LGE. Pour bien appréhender l'édification du corps strié il nous faut revenir brièvement sur les premières étapes de la formation du SNC et considérer l'élaboration du télencéphale dans son ensemble.

3.1.1. Morphogenèse du télencéphale.

3.1.1.1. Première étape du développement du SNC : rappel.

La neurogenèse et plus globalement la morphogenèse du SNC sont des processus précoces qui débutent, chez l'homme, dès la 3^e semaine du développement embryonnaire et aboutissent vers la 12^e semaine à la mise en place de la quasi-totalité des structures cérébrales. La maturation de ces structures impliquant l'élaboration des réseaux neuronaux s'effectue jusque dans l'enfance et même au-delà de la puberté.

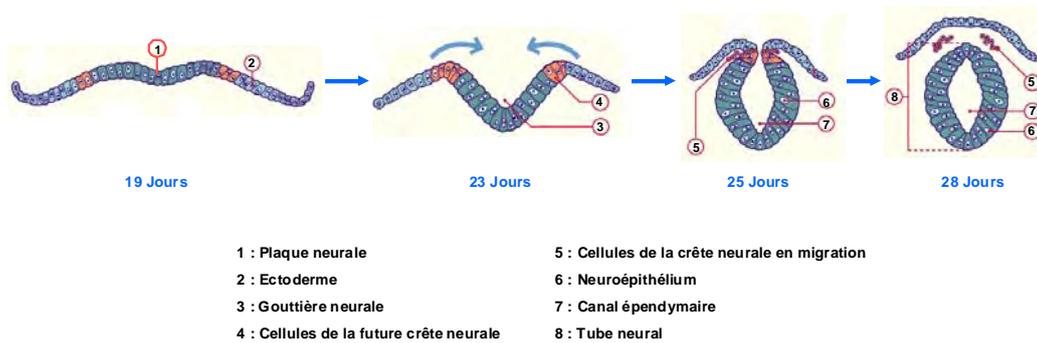


Figure 22 : Etapes de la formation du tube neural chez l'homme.

Chez les vertébrés, le système nerveux se développe à partir d'un feuillet embryonnaire situé à la face dorsale de l'embryon : l'ectoderme. Les cellules ectodermiques situées le long de la ligne médiane donnent naissance au neuroectoderme (ou plaque neurale) tandis que celles situées latéralement sont à l'origine de l'épiderme. La formation de la plaque neurale, ou induction neurale, résulte d'un épaississement localisé de l'ectoderme (en avant du nœud de Hensen) selon un axe antéro-postérieur. Des mouvements morphogénétiques provoquent ensuite une dépression médiane longitudinale de la plaque neurale qui se creuse en une gouttière. Le rapprochement et la fusion des bords de la gouttière neurale débutent dans la future région cervicale sur la ligne médiane puis se propagent simultanément de part et d'autre. Il en résulte la fermeture de la gouttière et la création du tube neural primitif (Figure 22). Le mécanisme de fermeture du tube neural met en jeu diverses molécules d'adhérence cellulaire telles que la laminine ou les NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule). Le reste de l'ectoderme, à l'origine de l'épiderme, recouvre dorsalement le tube neural (Figure 22). Lors de la séparation du tube neural de l'ectoderme, un nouveau groupe de cellules s'isole et s'organise en deux bandes longitudinales de part et d'autre du tube neural formant ainsi les crêtes neurales (Figure 22). Les cellules des crêtes neurales participent à l'édification du système nerveux périphérique tandis que le tube neural donne naissance au SNC. Les parois du tube neural sont tapissées de cellules neuroépithéliales (précurseurs neuraux) organisées en un neuroépithélium cylindrique. Ces cellules sont des précurseurs multipotents à l'origine des neurones et des cellules

gliales. L'expression de certaines protéines structurales telles que la Nestine, une protéine associée aux filaments intermédiaires, ou encore NCAM, est caractéristique de ces cellules. Finalement, sous l'influence d'une cascade moléculaire complexe, impliquant de nombreux signaux développementaux, les cellules du tube neural subissent une multiplication intense ainsi qu'une spécification régionale. Ce processus entraîne vers la 5^e semaine la subdivision progressive du tube neural en 3 vésicules ayant un destin différent : le prosencéphale, qui se subdivise à son tour en télencéphale et diencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale, qui se partage en métencéphale et myélencéphale (Figure 23).

Par ailleurs, ces différentes étapes sont régies par un certain nombre de signaux moléculaires. L'étude du développement neural chez les ovipares et les mammifères a ainsi permis d'identifier quatre voies principales de signalisation régissant le phénomène d'induction neurale : la voie des TGF β (Tumor Growth Factor β) (incluant les BMPs (Bone Morphogenic Protein) et Nodal), la voie des FGFs, la voie Wnt- β -catenin et enfin la voie Notch (Gaulden and Reiter, 2008). Les BMPs ont une activité inhibitrice sur la formation du neuroectoderme. Des antagonistes de ces molécules tels que Noggin, Chordin et Follistatin, sont sécrétés par la notochorde et le mésoderme paraxial au cours de l'induction neurale. Si le rôle des BMPs fait consensus dans la communauté scientifique, celui des autres voies de signalisation apparaît moins bien établi. Bien que la voie Wnt- β -catenin semble être importante au stade blastula pour induire l'expression des antagonistes des BMPs, son inhibition est nécessaire à un stade plus tardif pour permettre l'induction neurale. L'inhibition de Nodal semble également importante (Camus et al., 2006). Les voies FGFs et Notch sembleraient quant à elles avoir une activité pro-neurale. L'expression de certains facteurs tels que les gènes *Sox1*, *Sox2* et *Sox3* appartenant à la sous-famille *SoxB1* semble également être importante au cours du développement du SNC. Les gènes *Sox2* et *Sox3*, dont l'expression est restreinte au neuroépithélium, permettraient en effet le maintien de l'identité des progéniteurs neuraux (Bylund et al., 2003). *Sox1*, quant à lui, est exprimé plus tardivement au cours de la formation de la plaque neurale. Maintenu dans les précurseurs neuraux après l'induction neurale, il agirait pour promouvoir la détermination et la différenciation neuronale (Kan et al., 2004).

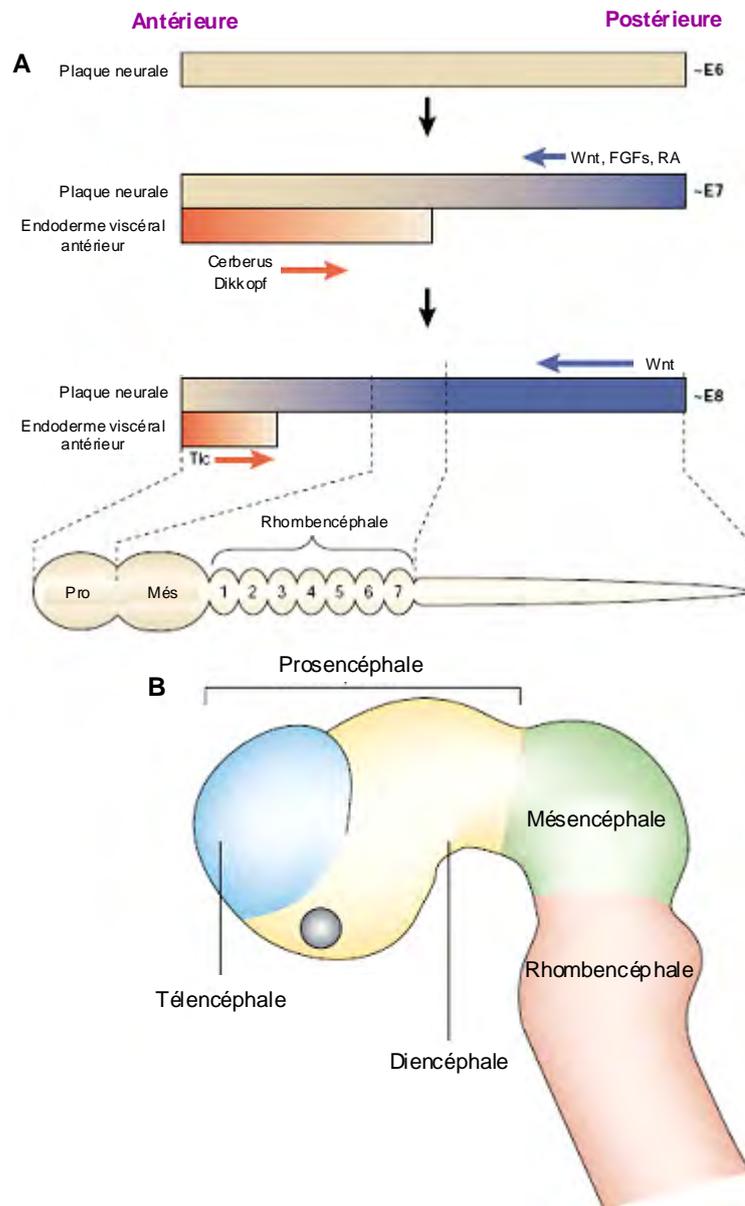


Figure 23 : Spécification progressive du tube neural depuis l'élaboration de la plaque neurale (A) jusqu'à la formation des 5 vésicules (B) (adapté de Rallu et al., 2002).

3.1.1.2. Structure du télencéphale.

Le télencéphale représente la partie la plus rostrale du cerveau et peut être divisé, au stade embryonnaire, en deux régions principales à l'origine de différents types neuronaux : le pallium (télencéphale dorsal) et le subpallium (télencéphale ventral) (Corbin et al., 2008). Le pallium est à l'origine de structures dorsales telles que le cortex cérébral tandis que le subpallium génère des structures plus ventrales incluant le striatum et le pallidum. Au niveau cellulaire, le télencéphale dorsal donne naissance entre autres aux neurones de projections glutamatergiques du cortex cérébral. Le télencéphale ventral peut être subdivisé en trois domaines distincts, collectivement regroupés sous le terme d'éminences ganglionnaires : l'éminence ganglionnaire médiale (MGE), l'éminence

ganglionnaire latérale (LGE) et l'éminence ganglionnaire caudale (CGE) (Figure 24). Chacune de ces structures est à l'origine de populations neuronales différentes. Le MGE semble être à l'origine de certains interneurons GABAergiques du cortex, des interneurons GABAergiques et cholinergiques du striatum, et des neurones du pallidum (Marin et al., 2000 ; Wichterle et al., 2001 ; Olsson et al., 1998). Les progéniteurs du CGE seraient quant à eux la source principale des interneurons corticaux exprimant la calrétinine (Butt et al., 2005 ; Fogarty et al., 2007). Enfin, le LGE est la source principale des neurones GABAergiques moyens épineux de projection DARPP-32+ du corps strié, et également de certains interneurons du bulbe olfactif (Grasbon-Frodl et al., 1996 ; Olsson et al., 1998 ; De Marchis et al., 2007). Des expériences de différenciation *in vitro* de suspension cellulaire de LGE ou de MGE humain pendant 24-30h, indiquent que le LGE produit 6 fois plus de cellules positives pour DARPP-32 que le MGE (Grasbon-Frodl et al., 1996).

Par ailleurs, en plus de ces différents territoires régionaux, le télencéphale peut également être divisé en 3 couches cellulaires distinctes : la zone ventriculaire (VZ), la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone du manteau (Figure 24A). La zone ventriculaire constitue un véritable réservoir de cellules neuroépithéliales. Les neuroblastes naissent de la division asymétrique d'une cellule souche neuroépithéliale selon une chronobiologie spécifique à chaque sous-type de neurone. Une fois sortis du cycle cellulaire, les neuroblastes déjà engagés vers un phénotype neuronal précis se déplacent à travers la SVZ jusque dans la couche du manteau où ils débutent leur différenciation terminale. Tout au long du processus de différenciation, ils migrent le long de la glie radiaire pour rejoindre la région cérébrale qu'ils formeront et où ils achèveront leur maturation (Corbin et al., 2008).

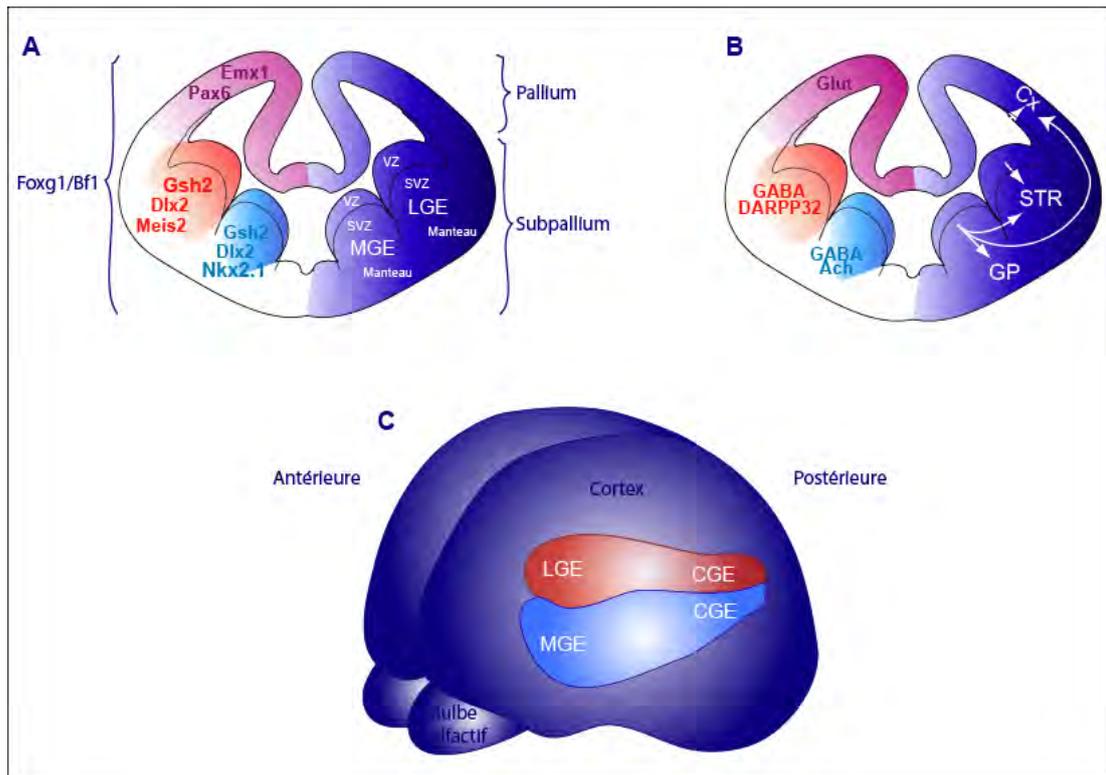


Figure 24 : Schéma illustrant l'organisation du télencéphale. (A et C) Illustrations en deux dimensions (A) ou en trois dimensions (C) des différentes régions et sous régions du télencéphale, ainsi que des principaux facteurs de transcription exprimés dans ces régions (A). (B) Illustration des principales populations neuronales issues du télencéphale et des principales structures cérébrales qu'elles formeront (GP : Globus Pallidus, STR : Striatum, Cx : Cortex).

3.1.2. Voies de signalisation impliquées dans le développement du télencéphale.

Au cours de ces dernières années des signaux morphogénétiques tels que BMP, Wnt, Shh (Sonic hedgehog), ou FGF8 ont été impliqués dans le développement du télencéphale. Ces morphogènes, selon une séquence spatio-temporelle unique et une concentration bien précise, orchestrent la spécification antéro-postérieure et dorso-ventrale du tube neural (Rallu et al., 2002 ; Hebert and Fishell, 2008). Bien qu'il reste encore de grandes zones d'ombre relatives aux mécanismes d'action de ces molécules, certains schémas de fonctionnement peuvent néanmoins être établis grâce aux données fournies par la littérature, obtenues notamment grâce au modèle murin.

Au cours des étapes précoces du développement du SNC, la plaque neurale adopte en premier lieu un caractère rostral (Stern, 2001). Cependant, l'inhibition de certains signaux caudalisants, tels que la voie de signalisation Wnt (*Wingless/Int*), est requise pour maintenir le phénotype rostral de la plaque neurale et permettre la formation du télencéphale (Houart et al., 2002 ; Mukhopadhyay et al., 2001 ; Yamaguchi, 2001). En effet, des embryons de souris mutantes dépourvues du gène *Dkk-1*, gène codant une protéine inhibitrice d'un co-récepteur de la voie Wnt, ne développent pas de structure

cérébrale antérieure au mésencéphale (Mukhopadhyay et al., 2001). Plus tard au cours du développement la voie Wnt intervient dans la régionalisation dorso-ventrale du télencéphale et plus particulièrement dans la formation du pallium (Backman et al., 2005) (Figure 25). Une étude chez la souris d'ablation ou d'activation conditionnelle via le système Cre/loxP de la voie Wnt a permis de démontrer ce rôle. En effet, l'inactivation de la voie Wnt β -catenin dans le télencéphale résulte en une diminution de l'expression des marqueurs dorsaux *Emx1*, *Emx2* et *Ngn2* et en une expression ectopique des marqueurs ventraux *Gsh2*, *Mash1* et *Dlx2* dans le pallium. Par opposition, l'activation de cette voie dans le subpallium entraîne une répression de l'expression des marqueurs ventraux *Dlx2*, *Nkx2.1*, *Gsh2*, et *Mash1* et une induction de l'expression des marqueurs dorsaux *Pax6* et *Ngn2* (Backman et al., 2005). De plus, la voie Wnt agit en synergie avec la voie de signalisation BMP pour induire le télencéphale dorsal (Hebert and Fishell, 2008).

La voie Shh joue également un rôle crucial dans le développement du télencéphale. Elle interviendrait en coordonnant la spécification et la prolifération des précurseurs ventraux du télencéphale (Ericson et al., 1995 ; Cayuso and Marti, 2005). Le gène *Shh* est un homologue du gène *hedgehog* de la drosophile et code pour une protéine de signalisation sécrétée. Chez les vertébrés, ce gène est exprimé dans la corde et le plancher du tube neural. Des études de gain et de perte de fonction de la protéine Shh ainsi que des travaux sur des embryons de souris *Shh*^{-/-} indiquent que ce morphogène est important pour l'expression de marqueurs du télencéphale ventral tels que *Dlx2*, *Gsh2* ou *Nkx2.1* (Ericson et al., 1995 ; Chiang et al., 1996 ; Rallu et al., 2002). En effet, les souris *Shh*^{-/-} présentent une réduction de la taille des éminences ganglionnaires ainsi qu'une forte diminution de l'expression de ces marqueurs ventraux. Cependant chez des souris double-mutantes pour *Shh* et *Gli3* (un facteur de transcription directement impliqué dans la dorsalisation du télencéphale) les domaines ventraux ne sont pas affectés (Aoto et al., 2002 ; Rallu et al., 2002 ; Rash and Grove, 2007). À la lumière de ces résultats, il semble donc que Shh agirait non pas en induisant directement l'identité ventrale des cellules mais plutôt en réprimant l'effet dorsalisant de Gli3 (Figure 25). Par ailleurs, cette information sous-tend l'hypothèse que d'autres gènes, tels que *Fgf8*, interviendraient indépendamment ou en aval de la voie Shh dans la spécification ventrale du télencéphale.

Un certain nombre de preuves expérimentales ont mis en exergue le rôle des FGFs, et plus précisément, du FGF8 dans la spécification du télencéphale. En effet, l'étude de mutant *Fgf8*^{-/-} ainsi que des travaux sur culture d'explants de plaque neurale ont démontré que FGF8 est important pour l'induction de l'expression du marqueur télencéphalique *Foxg1* (forkhead box G1, ou *Bf1*) (Shimamura and Rubenstein, 1997 ; Storm et al., 2006). Par ailleurs, la voie de signalisation FGF, et plus particulièrement FGF8, aurait également un rôle dans l'élaboration des régions ventrales du télencéphale, et ceci indépendamment de la voie Shh (Hebert and Fishell, 2008).

Les voies de signalisation Shh et FGF semblent donc importantes pour la spécification des territoires ventraux du télencéphale, et donc du striatum.

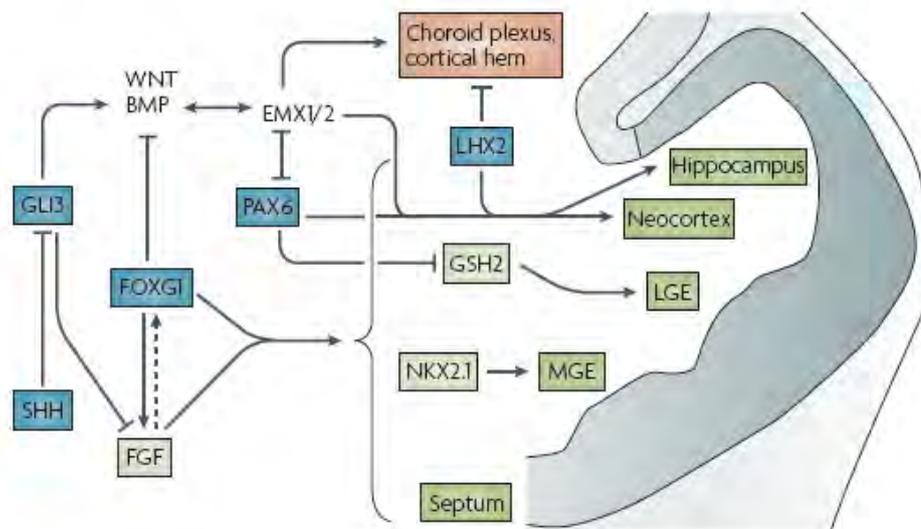


Figure 25 : Schéma illustrant les principaux facteurs de transcription et voies de signalisation mis en jeu dans la spécification du télencéphale (Hebert and Fishell, 2008).

3.1.3. Facteurs de transcription mis en jeu dans le développement du télencéphale.

Comme nous venons de le voir la spécification du télencéphale est orchestrée par de nombreux morphogènes qui agissent notamment en induisant l'expression de facteurs de transcription spécifiques des différents territoires dorsoventraux.

Parmi les nombreux facteurs de transcription mis en jeu au cours du développement du télencéphale, *Six3* semble être indispensable à la spécification antérieure du tube neural. En effet, chez l'homme des mutations de *SIX3* ont été associées à une holoprosencéphalie (Ribeiro et al., 2006 ; Geng et al., 2008). Chez la souris, *Six3* est tout d'abord exprimé au stade E7.5 et des embryons de souris *Six3*-null ne possèdent pas de télencéphale (Lagutin et al., 2003). *Six3* agirait en réprimant directement *Wnt1*, empêchant ainsi son effet caudalisant (Lagutin et al., 2003). Par ailleurs *Six3* semble constituer un pré-requis à la mise en place des signaux subséquents impliqués dans le développement du télencéphale tels que *Fgf8* (Kobayashi et al., 2002).

Un facteur de transcription, *Foxg1* (*Bfl1*), appartenant à la famille des gènes *forkhead* serait également déterminant dans la mise en place du télencéphale (Tao and Lai, 1992). Il est exprimé en premier lieu au stade E8.5-9 chez la souris au niveau de la plaque neurale antérieure et aurait plus particulièrement un rôle dans la spécification ventrale du télencéphale (Xuan et al., 1995 ; Hebert and McConnell, 2000). En effet, l'interruption de son expression chez la souris entraîne la formation d'un petit télencéphale et un manque d'expression de marqueurs ventraux tel que *Dlx2* (Xuan et al., 1995 ; Martynoga et al., 2005). De plus, l'expression de *Foxg1* est requise pour celle de *Fgf8* (Martynoga et al., 2005) qui, comme indiqué précédemment, joue lui-même un rôle dans l'expression de *Foxg1*. FGF

et Foxg1 formeraient ainsi une boucle de rétrocontrôle positif et agiraient de concert pour induire l'identité ventrale des précurseurs du télencéphale (Figure 25).

La famille des facteurs de transcription *Dlx* (*Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5* et *Dlx6*) semble jouer un rôle critique dans la différenciation des progéniteurs des éminences ganglionnaires en neurones GABAergiques de projection et en interneurons striataux (Panganiban and Rubenstein, 2002). Parmi ces facteurs, *Dlx1* et *Dlx2* exprimés plus précocement que les autres *Dlx*, ont un domaine d'expression localisé dans la VZ et la SVZ du LGE et du MGE au stade E12.5 dans l'embryon de souris. *Dlx2* serait exprimé avant *Dlx1* (Eisenstat et al., 1999). Des double mutants pour *Dlx1* et *Dlx2* montrent une différenciation anormale des cellules de la SVZ du LGE accompagnée d'un défaut de migration des neurones qui naissent tardivement et qui sont présumés former la zone du manteau (Anderson et al., 1997). Enfin, l'expression de *Dlx1/2* pourrait être régulée par les facteurs de transcription *Mash1* et *Meis2*, nécessaires au bon développement du télencéphale ventral et plus particulièrement du striatum (Poitras et al., 2007).

Le gène à homéobox *Gsh2* semble intimement lié au développement du LGE et du MGE, et par conséquent du corps strié (Szucsik et al., 1997 ; Corbin et al., 2000 ; Yun et al., 2003 ; Waclaw et al., 2004). Ce facteur de transcription est présent en grande quantité dans les éminences ganglionnaires en développement du cerveau de souris. L'expression de *Gsh2* est toutefois plus importante dans le LGE (Jain et al., 2001) (Figure 25). Des souris avec une mutation ciblée sur *Gsh2* montrent une spécification anormale des précurseurs du LGE, mise en évidence par une taille réduite et par l'association concomitante d'une expression ectopique du marqueur dorsal *Pax6* et d'une diminution significative des marqueurs ventraux *Dlx2* et *Mash1* (Corbin et al., 2000 ; Szucsik et al., 1997 ; Toresson et al., 2000). Ces mutants *Gsh2* présentent aussi des défauts sévères de développement du striatum, incluant une réduction de sa taille et une diminution importante du nombre de neurones striataux exprimant la protéine DARPP-32 (Toresson and Campbell, 2001). Au contraire, les interneurons striataux ne semblent pas significativement affectés par la mutation de *Gsh2* (Toresson and Campbell, 2001). Ainsi, *Gsh2*, en s'opposant à *Pax6*, semble avoir un rôle dans l'établissement de la frontière entre les domaines ventraux et dorsaux, permettant de ce fait le maintien de l'identité régionale des cellules du télencéphale ventral (Corbin et al., 2000 ; Toresson et al., 2000). Un autre membre de la famille des gènes *Gsh*, *Gsh1*, agit en étroite collaboration avec *Gsh2* dans la régulation de la spécification du LGE (Toresson and Campbell, 2001).

Cependant, même si des modèles, tels que le modèle murin, constituent de bons outils pour étudier le développement embryonnaire et faire des analogies avec celui de l'homme, certaines différences existent. Ainsi, contrairement à ce que nous venons de voir, l'expression de *Pax6*, chez l'homme, ne semble pas restreinte au seul télencéphale dorsal. *Pax6* peut en effet être exprimé au niveau du supballium (Mo and Zecevic, 2007). D'autres différences pourraient ainsi exister.

3.1.4. Conclusion sur les aspects développementaux.

À la lumière de ce qui vient d'être énoncé, il apparaît que le développement embryonnaire du télencéphale, et plus particulièrement de sa partie ventrale à l'origine du striatum, suit un schéma d'organisation complexe faisant intervenir une combinaison de morphogènes et de facteurs de transcription bien précise. La complexité est d'autant plus grande que les mêmes voies de signalisation peuvent agir différemment, selon le moment et la région embryonnaire où elles s'expriment au cours du développement. Il apparaît ainsi que l'expression séquentielle des facteurs de transcription *Six3*, *Bfl1*, puis *Gsh2* et *Dlx2* ainsi que l'action combinée de certaines molécules telles que Dkk-1, Shh, et FGF8 participent à la morphogénèse du striatum et plus particulièrement à la neurogenèse des neurones moyens épineux striataux.

3.2. Les cellules souches embryonnaires humaines.

3.2.1. Origine et dérivation des cellules hES.

En 1981, deux groupes indépendants décrivent pour la première fois l'obtention de lignées de cellules souches embryonnaires (Martin, 1981). Ce n'est qu'en 1995 puis en 1998 que ces travaux réalisés chez la souris ont été appliqués aux primates non-humains puis à l'homme (Thomson et al., 1995 ; Thomson et al., 1998). Depuis, de nombreuses lignées de cellules hES ont pu être établies à travers le monde.

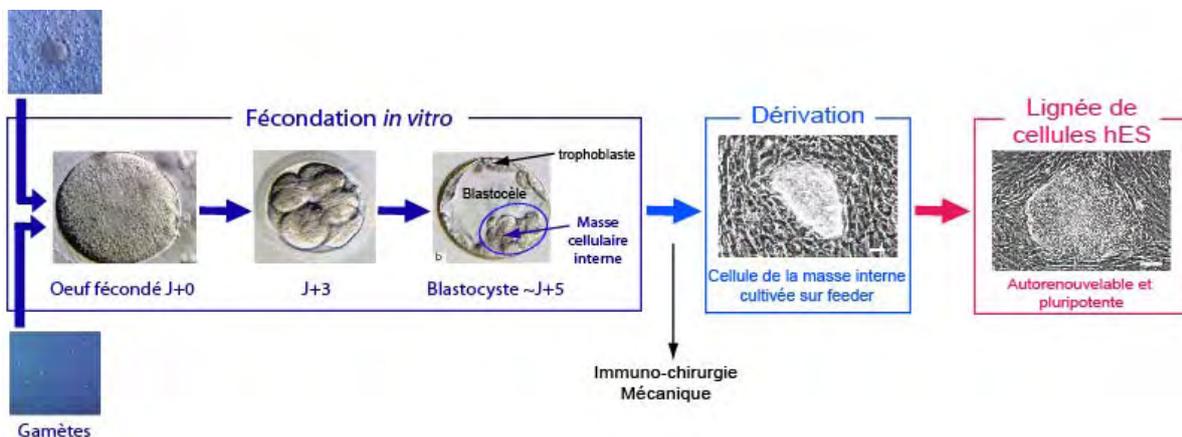


Figure 26 : Schéma illustrant la dérivation d'une lignée de cellules souches embryonnaires humaines.

Les lignées de cellules hES sont établies à partir d'embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro*. C'est généralement au stade de blastocyste préimplantatoire, entre le 5^e et le 7^e jour après fécondation, chez l'homme, que sont isolées ces cellules. À ce stade développemental, l'embryon est constitué d'une zone pellucide, des cellules de l'épithélium trophoctodermique, permettant la placentation, d'une cavité remplie de liquide, le blastocèle et des cellules de la masse cellulaire interne (Semb, 2005) (Figure 26). Les cellules de la masse cellulaire interne donnent naissance à toutes les

cellules germinales et somatiques de l'embryon, d'où le terme de cellules pluripotentes (Figure 27). Elles peuvent être isolées du reste du blastocyste par différentes méthodes dites de dérivation (Figure 26). La plus couramment pratiquée est basée sur une technique d'immunochirurgie qui consiste, après digestion enzymatique de la zone pellucide, à lyser le trophoctoderme par réaction anticorps-complément (Thomson et al., 1998). D'autres méthodes, fondées sur une séparation mécanique peuvent également être utilisées. Ces méthodes consistent à la mise en culture sur cellules nourricières d'embryons entiers ou partiels (Heins et al., 2004 ; Oh et al., 2005 ; Amit and Itskovitz-Eldor, 2002 ; Kim et al., 2005). Ces techniques comportent toutefois le risque d'une sur-prolifération des cellules du trophoctoderme au détriment des cellules hES. Une fois dérivées, les cellules de la masse interne sont cultivées sur cellules nourricières dans des conditions spécifiques assurant leur prolifération, générant ainsi une lignée de cellules hES (Figure 26). Récemment, des auteurs ont publié une technique permettant la dérivation de cellules hES à partir d'un blastomère prélevé sur un embryon au stade morula, constitué de 8 cellules (Klimanskaya et al., 2006 ; Klimanskaya et al., 2007).

3.2.2. Caractérisation, propriétés et culture des cellules hES.

3.2.2.1. Caractérisation des cellules hES.

Les cellules hES présentent certaines caractéristiques qui les rendent originales. Tout d'abord, au niveau morphologique, elles sont reconnaissables par leur petite taille (2-3 μ m), leur rapport nucléocytoplasmique élevé et par leur organisation en colonies compactes et plates, lorsqu'elles sont cultivées sur cellules nourricières (Figure 28). Ensuite, ce sont des cellules qui possèdent une capacité d'autorenouvellement en théorie illimité. Ceci se traduit par une expression importante de la transcriptase inverse TERT (telomerase reverse transcriptase) associée à une forte activité télomérasique, qui ne diminue qu'au cours de la différenciation. La télomérase prévient le raccourcissement des télomères et autorise ainsi le maintien de la stabilité et de l'intégrité chromosomique, empêchant la sénescence des cellules. Par ailleurs, les cellules hES ont la particularité de maintenir un caryotype stable après de nombreux passages, pouvant aller à plus d'une centaine (Rosler et al., 2004). Cependant certaines anomalies caryotypiques telles qu'une trisomie 12 ou 17 peuvent apparaître au cours des passages (Maitra et al., 2005 ; Baker et al., 2007). Les cellules hES sont également caractérisées par un statut épigénétique et un profil d'expression de microARNs particuliers (Chen and Daley, 2008).

Figure 27

Cellules Totipotentes

Seules les cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé possèdent la faculté de construire un être humain dans son entier.

Cellules Pluripotentes

Elles sont capables d'engendrer au terme de nombreuses divisions et transformations, n'importe quelle cellule spécialisée.

Cellules Multipotentes

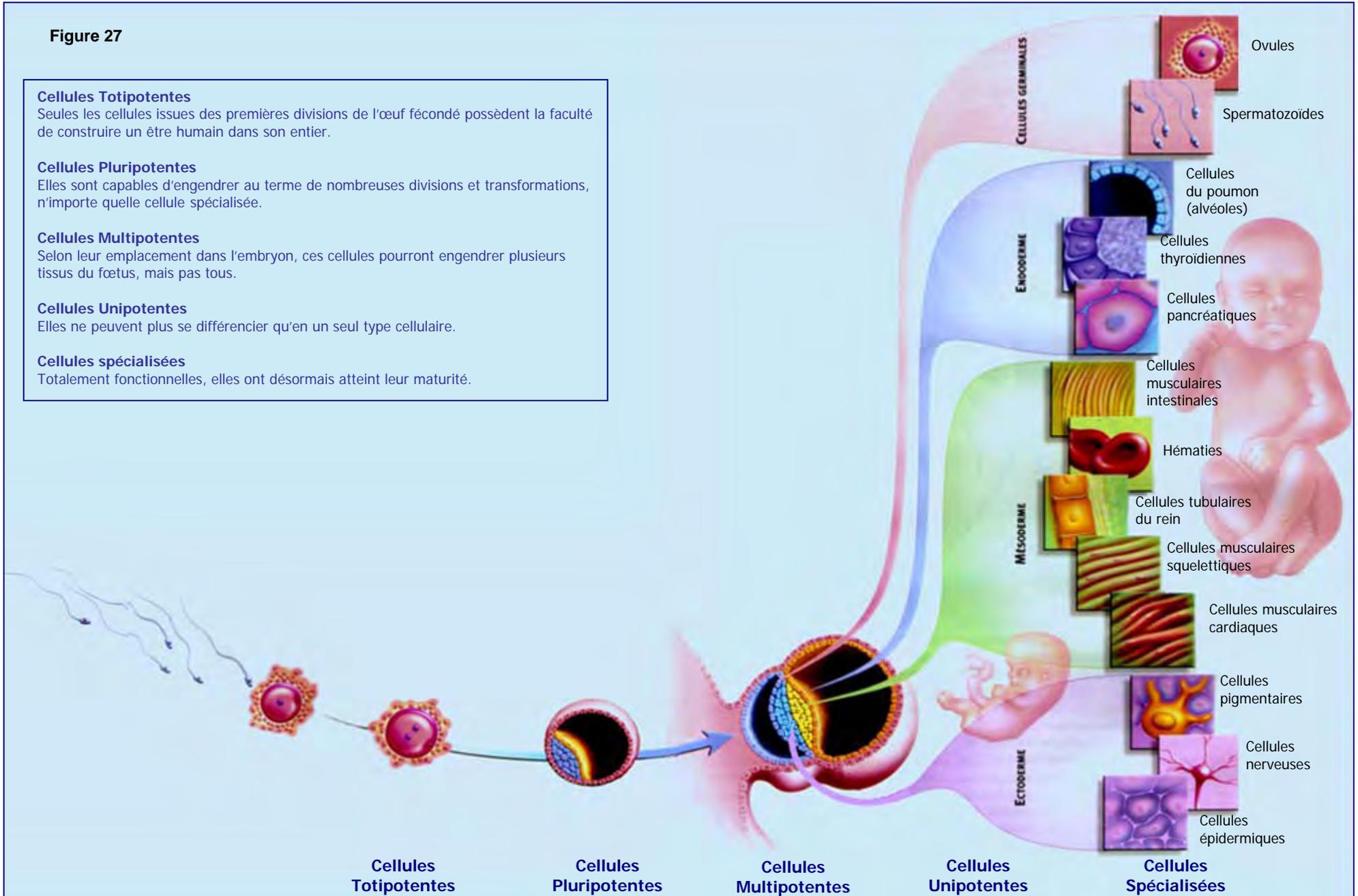
Selon leur emplacement dans l'embryon, ces cellules pourront engendrer plusieurs tissus du fœtus, mais pas tous.

Cellules Unipotentes

Elles ne peuvent plus se différencier qu'en un seul type cellulaire.

Cellules spécialisées

Totalement fonctionnelles, elles ont désormais atteint leur maturité.



Les cellules hES sont aussi définies par l'expression d'un ensemble de marqueurs de surface et de facteurs de transcription, permettant leur identification en culture. Parmi les nombreux marqueurs de surface, SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen), SSEA-3, TRA-1-60 (Tumour Rejection Antigen), TRA-1-81, CD9, AC133, flt3 (CD135), c-kit (CD117), sont couramment utilisés pour caractériser ces cellules. Parallèlement, un certain nombre de facteurs de transcription reflètent l'état pluripotent et permettent d'identifier ces cellules. Parmi ces facteurs figurent des gènes tels que *Oct3/4* (*POU5F1*, de la famille des facteurs de transcription POU), *Nanog*, *Sox2*, *Foxd3*, ou encore *Fgf4*. Trois de ces facteurs de transcription, *Oct3/4*, *Nanog* et *Sox2*, sont fortement exprimés par les cellules hES. En agissant de concert, ils maintiennent leur pluripotence et sont indispensables à l'auto-renouvellement. La diminution de leur expression marque l'entrée des cellules en différenciation (Stewart et al., 2006 ; Jaenisch and Young, 2008).

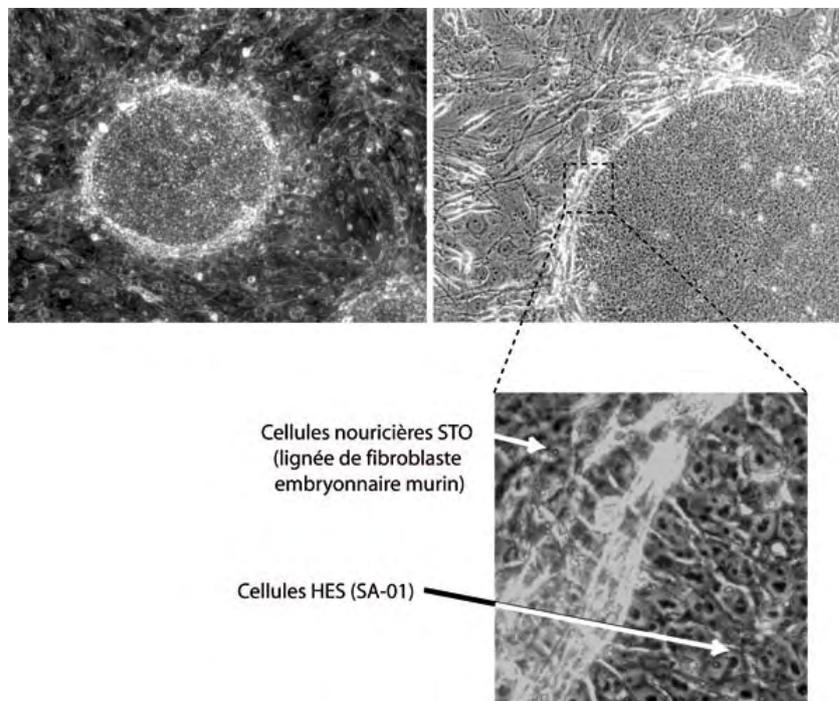


Figure 28 : Organisation structurale et morphologie des cellules souches embryonnaires humaines en culture.

3.2.2.2. Propriétés des cellules hES

En plus de l'auto-renouvellement illimité, les cellules hES possèdent une autre propriété cardinale : la pluripotence. Le caractère pluripotent des cellules hES peut être démontré *in vitro* et *in vivo* par deux approches distinctes. *In vitro*, la formation de corps embryoides (EBs), agrégats cellulaires constitués de cellules endodermiques, mésodermiques et ectodermiques, qui miment le développement précoce de l'embryon, atteste de cette propriété. *In vivo*, la xénogreffe de cellules hES à des rongeurs immunodéprimés conduit à la formation de tératomes composés de types cellulaires

issus de plus d'un feuillet embryonnaire (Heins et al., 2004) (Figure 29). Cette propriété de pluripotence est exploitée par de nombreux laboratoires de recherche à travers le monde et divers types cellulaires ont d'ores et déjà été obtenus à partir des cellules hES. De nombreuses publications ont en effet rapporté la possibilité de produire un grand nombre de phénotypes cellulaires tels que des cellules gliales (Reubinoff et al., 2001 ; Hong et al., 2008), divers sous-types de neurones (Perrier et al., 2004 ; Lee et al., 2007 ; Hong et al., 2008), des cardiomyocytes (Mummery et al., 2007), des précurseurs hématopoïétiques (Chadwick et al., 2003), des cellules sécrétrices d'insuline (D'Amour et al., 2006), ou encore des hépatocytes (Baharvand et al., 2008).

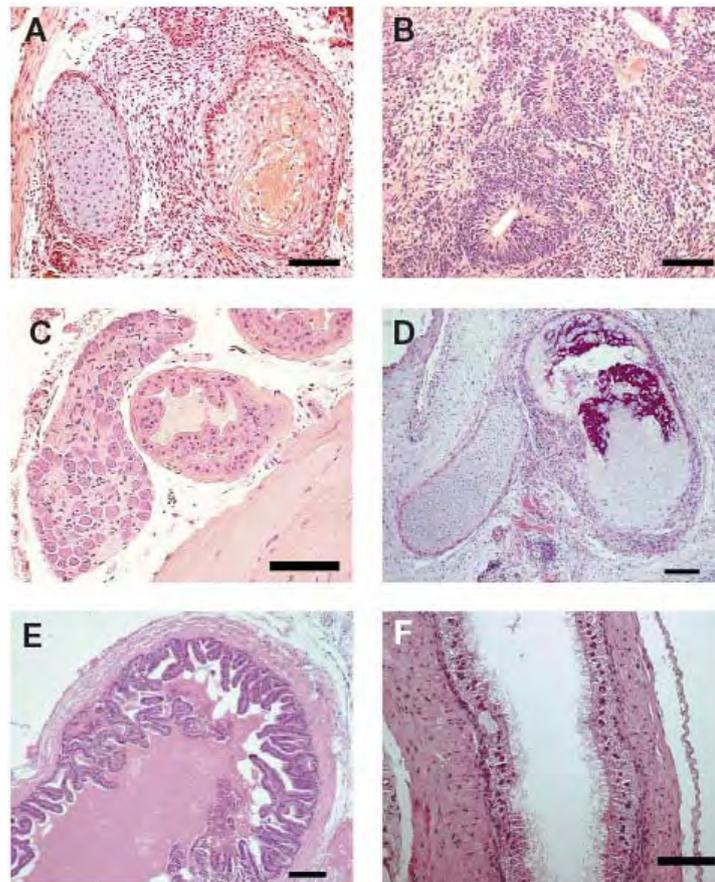


Figure 29 : Marquage histologique illustrant la formation de tératomes après injection de cellules hES dans des souris SCID. Ces tératomes sont constitués d'épithélium squameux et de cartilage (A), de rosettes neurales (B), de muscles striés (C), d'os et de cartilage (D), d'épithélium glandulaire (E), et d'épithélium cilié (F) (Reubinoff et al., 2000) .

Les mécanismes impliqués dans le maintien des propriétés cardinales des cellules hES font actuellement l'objet d'une recherche intense. Si de nombreuses questions restent en suspens, certaines voies de signalisation ont déjà pu être identifiées (Stewart et al., 2006). Les voies Wnt/ β -caténine, FGF, et Activin/nodal apparaissent ainsi essentielles au maintien de l'autorenouvellement et de la pluripotence des cellules hES. Les cellules hES requièrent le FGF2 pour maintenir leur état

indifférencié. Le FGF2 pourrait agir en stimulant la synthèse de composés de la matrice extracellulaire (Kim et al., 2005), ou en inhibant la voie BMP (Aubin et al., 2004). Les BMPs, composés appartenant à la famille du TGF β , interviennent dans la différenciation des cellules hES vers le feuillet mésodermique (Sumi et al., 2008).

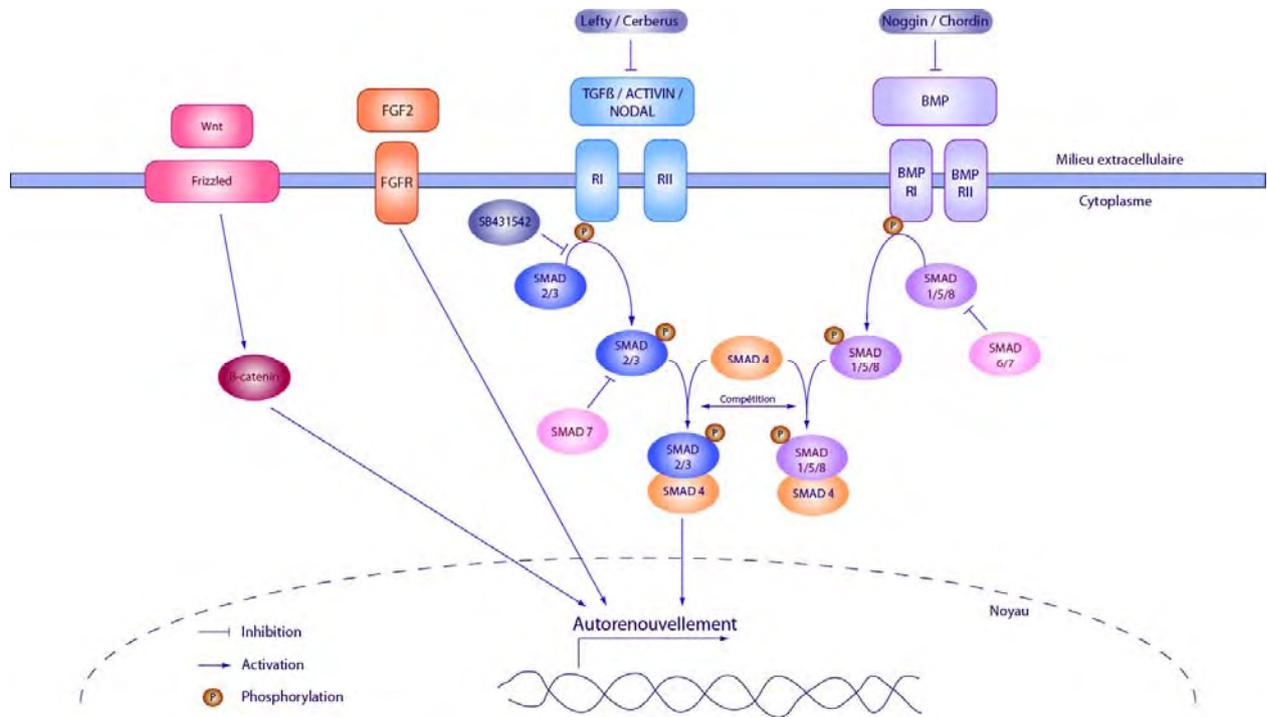


Figure 30 : Schéma illustrant les principales voies de signalisation intervenant dans l'autorenouvellement des cellules hES (adapté de Stewart et al., 2006).

Ils agissent en induisant la phosphorylation de Smad1/5/8, qui en formant un complexe avec Smad4, limite la disponibilité de ce dernier pour former un complexe avec Smad2/3, nécessaire au maintien de l'état indifférencié (James et al., 2005) (Figure 30). D'autres composés de la famille du TGF β , Activine et Nodal, permettent au contraire la phosphorylation de Smad2/3 autorisant ainsi son interaction avec Smad4 (James et al., 2005 ; Vallier et al., 2005). Ce complexe migre ensuite dans le noyau où il joue un rôle prépondérant dans la transcription de gènes impliqués dans le maintien de l'état indifférencié (Figure 30). Un inhibiteur de la voie Activin/nodal, le SB431542, induit la différenciation des cellules hES, démontrant ainsi l'importance de cette voie (Vallier et al., 2005). Une autre voie de signalisation importante pour le maintien du caractère pluripotent est la voie Wnt/ β -caténine. La liaison de Wnt à son récepteur, Frizzled, inhibe la dégradation intracellulaire de la β -caténine (Stewart et al., 2006). Cette dernière agit comme coactivateur de la transcription de gènes de la pluripotence tels que *Oct3/4* et *Nanog* (Stewart et al., 2006). Néanmoins, il semblerait que la voie Wnt/ β -caténine interviendrait plutôt dans la prolifération que dans le maintien de l'état indifférencié (Stewart et al., 2006). Malgré les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes impliqués

dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement, de nombreux aspects restent encore à élucider.

3.2.2.3. Culture des cellules hES.

Les premières techniques de culture des cellules hES ont été élaborées en s'appuyant sur les expériences menées chez la souris et le primate non-humain (Thomson et al., 1998). Les cellules hES sont classiquement cultivées sur une monocouche de fibroblastes embryonnaires murins (MEF) dont le cycle cellulaire est bloqué par traitement à la mitomycine C ou par irradiation. D'autres cellules nourricières peuvent être utilisées, telles que des lignées de cellules murines (STO) ou encore des fibroblastes humains provenant par exemple de prépuce (Mallon et al., 2006). Le rôle exact de ces cellules n'est pas encore complètement déterminé, mais il semble qu'elles jouent un rôle important dans le maintien de l'état indifférencié et la croissance des cellules hES en fournissant certains facteurs solubles. Le milieu de culture est généralement supplémenté avec 20% de KSR (Knock-out Serum Replacement). D'autre part, contrairement aux ES murines qui ont besoin de LIF, les cellules hES requièrent généralement la présence de FGF2 dans le milieu de culture pour maintenir leur état indifférencié au cours des passages. Les cellules hES ont une capacité proliférative importante, il est donc également nécessaire pour préserver leur caractère pluripotent, de les changer de support régulièrement. Pour ce faire, différentes techniques faisant appel à une dissociation enzymatique et/ou mécanique sont utilisées (Hoffman and Carpenter, 2005). L'utilisation de méthodes enzymatiques peut entraîner un risque d'anomalies chromosomiques telles que des trisomies 12 ou 17 (Brimble et al., 2004 ; Hoffman and Carpenter, 2005), tandis que la méthode mécanique limite ce risque.

Actuellement, la plupart des laboratoires utilisent le système de culture sur cellules nourricières en milieu supplémenté en KSR et en FGF2. Cependant, ce protocole présente un certain nombre d'inconvénients dans l'éventualité d'une utilisation des cellules hES à des fins thérapeutiques. En effet, la présence de composés d'origine animale, tels que les cellules nourricières et le sérum, peuvent limiter l'application clinique des cellules hES. Différentes approches ont donc été développées pour tenter de répondre aux impératifs des procédures dites GMP (Good Manufacturing Practice) (Unger et al., 2008). Les cellules nourricières d'origine animale peuvent ainsi être remplacées par des fibroblastes dérivées de cellules hES (Stojkovic et al., 2005). Elles peuvent être remplacées par une matrice constituée soit de matrigel (Braam et al., 2008), de laminine (Xu et al., 2001), de fibronectine (Amit et al., 2004) ou encore d'un ensemble de protéines (Peiffer et al., 2008). Le KSR, bien que permettant une meilleure standardisation des cultures par rapport au SVF (Sérum de veau fœtal), n'est pas dépourvu de composés d'origine animale. Les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes nécessaires au maintien de l'état pluripotent et de l'autorenouvellement ont permis la mise au point de milieux complètement définis dépourvus de protéines animales (Li et al., 2005b ; Ludwig et al., 2006 ; Peiffer et al., 2008).

3.2.3. Induction, spécification et différenciation neurale des cellules hES.

Depuis une décennie, les cellules hES font l'objet de recherches intenses. L'un des défis majeurs est de définir des protocoles spécifiques de différenciation guidée vers des types cellulaires d'intérêt. En s'appuyant essentiellement sur les données de l'embryologie mais aussi sur les connaissances acquises à partir des cellules de carcinome embryonnaire (EC, Embryonal Carcinoma cells), des cellules souches neurales, des cultures primaires de neurones, et des cellules ES murines (mES), différents protocoles d'induction, de spécification et de différenciation neurale ont été élaborés pour les cellules hES.

3.2.3.1. Induction neurale des cellules hES *in vitro*.

L'induction neurale des cellules hES repose essentiellement sur trois approches distinctes selon que la méthode implique initialement, en présence de sérum ou de sérum de remplacement (KSR), la formation d'EBs, la culture des cellules ES sur une couche de cellules stromales nourricières, ou bien la différenciation spontanée des cellules ES. Ces protocoles, largement inspirés des données expérimentales obtenues chez la souris, aboutissent à la formation de précurseurs neuraux organisés en neurosphères ou en rosettes neurales capables de se différencier aussi bien en neurones fonctionnels qu'en cellules gliales (Carpenter et al., 2001 ; Zhang et al., 2001 ; Reubinoff et al., 2001) (Figure 31). Le terme de neurosphère désigne initialement des agrégats multicellulaires obtenus à partir de cellules souches neurales (adultes ou fœtales) cultivées *in vitro* en présence des facteurs mitogènes EGF et FGF2 (Reynolds et al., 1992) (Figure 31). Les rosettes neurales sont quant à elles des ensembles de cellules neuroépithéliales (précurseurs neuraux) organisées en structures circulaires (Figure 31). Elles sont caractérisées par l'expression de marqueurs du neuroectoderme tels que Nestine, Sox1, Pax6 et NCAM. Leur morphologie particulière pourrait laisser croire que les rosettes constituent un équivalent *in vitro* du tube neural. Cependant, l'absence de marqueurs de régionalisation dorso-ventrale au sein de ces structures semble indiquer que les rosettes neurales représentent plutôt un équivalent *in vitro* de la plaque neurale. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de rosettes dans des cultures primaires de plaques neurales de souris (Elkabetz et al., 2008).

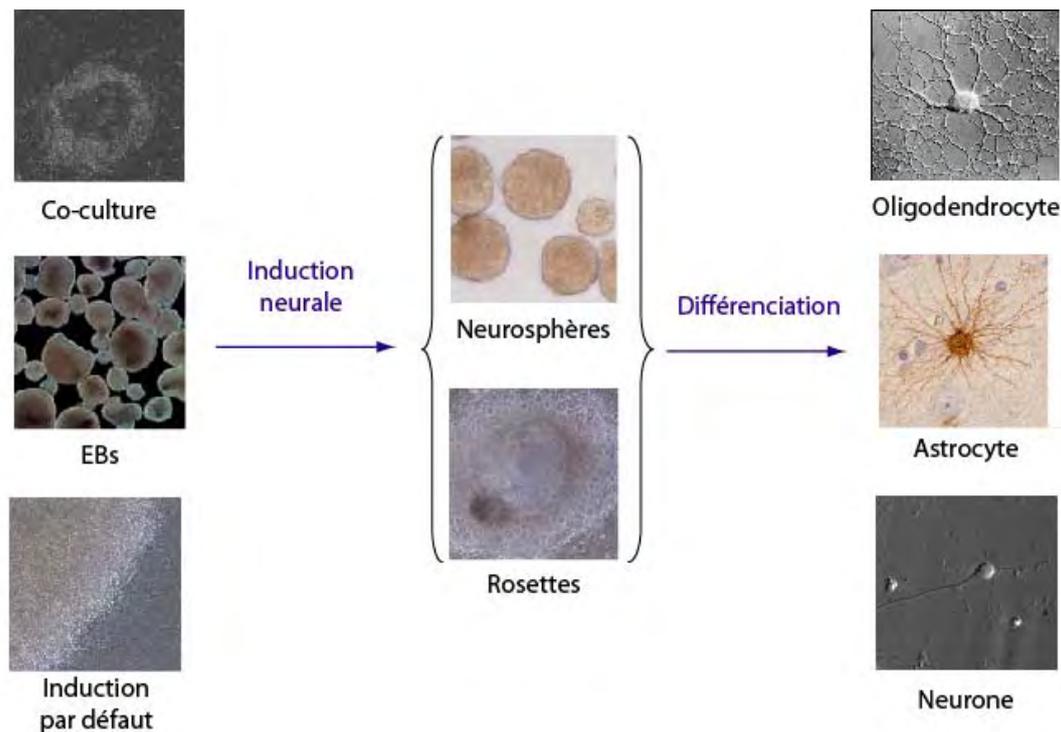


Figure 31 : Schéma illustrant les principales méthodes d'induction neurale des cellules hES.

C'est en 2001 que trois équipes publient les premiers travaux d'induction neurale des cellules hES (Carpenter et al., 2001 ; Zhang et al., 2001 ; Reubinoff et al., 2001). Deux de ces études se sont appuyées sur la capacité des cellules hES, tout comme les cellules mES, à former spontanément des EBs (Carpenter et al., 2001 ; Zhang et al., 2001). Les EBs sont obtenus lorsque les cellules hES sont placées en suspension à forte densité et en absence de cellules nourricières. Dans ces conditions les cellules ES s'agrègent pour former des sphères, de taille et de composition cellulaire variables, et s'engagent spontanément vers les trois feuilletts embryonnaires dont l'ectoderme. Une fois plantés sur un support adhérent en présence de mitogènes tels que le FGF2, ces EBs génèrent des précurseurs neuraux, organisés en rosettes, exprimant des marqueurs du neuroectoderme tels que la Nestine, NCAM, ou encore Musashi (Zhang et al., 2001). La troisième étude, publiée par Reubinoff et ses collaborateurs la même année, a obtenu des résultats similaires mais en s'appuyant cette fois sur la capacité des hES à se différencier spontanément en cellules neurales en conditions adhérentes (Reubinoff et al., 2001). Au cours de ce protocole, les cellules hES sont maintenues en culture sur cellules nourricières (MEF) sans repiquage ni changement de leur milieu pendant plusieurs semaines. Dans ces conditions, des zones contenant des cellules morphologiquement spécifiques apparaissent. Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs du neuroectoderme Nestine et Pax6 puis par celle du marqueur NCAM. Ces zones NCAM⁺ peuvent être isolées mécaniquement, mises en suspension et cultivées sous forme de neurosphères en présence des facteurs de croissance EGF et FGF2, tel que décrit pour les CSN fœtales ou adultes. Ces travaux pionniers sur les cellules hES ont ainsi démontré la possibilité de produire à partir de ces cellules des précurseurs neuraux. Cependant,

au cours de ces expériences des populations cellulaires non-neurales, dérivées de l'endoderme et du mésoderme, sont apparues, soulignant la nécessité d'améliorer ces protocoles.

En s'appuyant sur les travaux réalisés avec les mES, différentes stratégies, basées sur l'utilisation de matrices spécifiques (support protéiques ou cellules nourricières) et/ou de facteurs de croissance, ont alors été envisagées. Au début des années 2000, un nouveau protocole, fondé sur la co-culture des cellules ES avec des cellules stromales de moelle osseuse (PA6, MS5 ou S17) est décrit pour les ES de souris (Kawasaki et al., 2000 ; Barberi et al., 2003). Cette technique, aussi dénommée SDIA (Stromal cell-Derived Inducing Activity), permet, chez la souris, une induction neurale rapide et efficace sans expression de marqueurs du mésoderme (Kawasaki et al., 2000). Même si les signaux produits par les cellules stromales permettant ce processus ne sont pas encore identifiés, l'idée d'utiliser des cellules nourricières dérivées du mésoderme est fondée sur l'observation que ce dernier produit *in vivo* des signaux, tels que des antagonistes des BMPs, importants pour l'induction neurale de l'ectoderme (Cohen et al., 2007). La transposition de ce protocole aux cellules ES humaines permet, après culture de celles-ci sur les cellules stromales MS5, de produire un grand nombre des cellules neuroépithéliales organisées en rosettes neurales (Perrier et al., 2004 ; Tabar et al., 2005 ; Lee et al., 2007 ; Hong et al., 2008). Après environ 4 semaines de co-culture en milieu sans sérum, plus de 90% des cellules neuroépithéliales ainsi obtenues expriment les marqueurs du neuroectoderme Nestine, Sox1 et Pax6. Par ailleurs, des marqueurs de cellules ES indifférenciées, tels que Oct-4 et Nanog, ou des marqueurs de cellules dérivées du mésoderme ou de l'endoderme, ne sont pas détectés dans ces rosettes. Ce protocole permet donc, contrairement aux méthodes citées précédemment, d'obtenir des cultures cellulaires très enrichies en cellules neurales et dépourvues de cellules dérivées du mésoderme et de l'endoderme. Le contact des cellules ES avec une matrice spécifique semble donc jouer un rôle important dans leur spécification neurale. Ce contact peut se faire comme nous venons de le voir, à travers des interactions cellulaires, mais il peut aussi s'effectuer *via* des matrices constituées de protéines de la matrice extracellulaire. Par exemple, des études ont démontré que la laminine favorise l'induction neurale (Goetz et al., 2006 ; Ma et al., 2008).

Très peu de facteurs de croissance sont actuellement utilisés pour améliorer l'induction neurale. L'inhibition de la formation du neuroectoderme par des signaux BMPs *in vivo* (Sasai and De Robertis, 1997 ; Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002), a conduit certaines équipes à tester *in vitro* l'action d'antagonistes de cette voie tels que Noggin. Des travaux ont ainsi démontré que l'induction neurale des cellules hES, basée sur la formation d'EBs ou sur la co-culture avec des cellules nourricières, était améliorée en présence de Noggin (Itsykson et al., 2005 ; Sonntag et al., 2007 ; Zhou et al., 2008).

Le milieu de culture joue également un rôle essentiel dans l'induction neurale. En effet, l'utilisation de milieu supplémenté avec du sérum, tel que décrit dans les premières expériences chez la souris (Bain et al., 1995), ne permet pas une bonne induction neurale. Une explication serait que le sérum peut contenir des BMPs, qui possèdent un rôle inhibiteur de la voie neurale (Tropepe et al., 2001). Les protocoles d'induction neurale des cellules hES ont donc rapidement convergé vers

l'utilisation de milieu minimum dépourvu de sérum tel que le milieu N2. Initialement élaboré pour les cultures primaires de neurones et utilisé par la suite pour la différenciation neuronale des cellules mES (Ying and Smith, 2003), ce milieu est basé sur l'association de cinq molécules : la transferrine, l'insuline, la putrescine, la progestérone et le sélénium (Suter and Krause, 2008). La transferrine et l'insuline sont essentielles pour la prolifération des précurseurs neuronaux. La transferrine, la putrescine, et la progestérone ont une activité neuroprotectrice. Le sélénium protège de l'excitotoxicité et promeut la survie neuronale. Enfin, la putrescine joue également un rôle dans la croissance axonale. Certains protocoles utilisent un autre complément, le B27, plus complexe que le N2. Le B27 contient plus d'une vingtaine de composés parmi lesquels, des vitamines, des hormones, des acides gras, des antioxydants et des facteurs de croissance. La composition exacte de ce complément n'est pas révélée par son fabricant (Suter and Krause, 2008).

3.2.3.2. Spécification et différenciation neurale des cellules hES *in vitro*.

L'un des défis majeurs de l'exploitation de la pluripotence des cellules hES est d'orienter leur destin cellulaire vers un phénotype précis. Les premiers travaux d'induction neurale des cellules hES, décrits précédemment, ont démontré la capacité des précurseurs neuraux à se différencier aussi bien en neurones fonctionnels qu'en cellules gliales (Carpenter et al., 2001 ; Zhang et al., 2001 ; Reubinoff et al., 2001). En effet, une fois sevrés des facteurs de croissance et repiqués en présence des facteurs trophiques BDNF et NT3 (neurotrophin-3) (Carpenter et al., 2001) ou en présence de BDNF et d'AMPC (Zhang et al., 2001), les précurseurs neuraux obtenus à partir d'EBs, ont la capacité d'exprimer des marqueurs neuronaux tels que la β III-tubuline ou MAP2 (Microtubule Associated Protein 2) ainsi que des marqueurs de cellules gliales tels que la GFAP, un marqueur d'astrocytes. En présence de PDGF-A (Platelet-Derived Growth Factor-A), ces précurseurs neuraux peuvent également exprimer des marqueurs d'oligodendrocytes tels que O4 (Zhang et al., 2001). Les neurones obtenus au cours de ces expériences peuvent adopter différents phénotypes neuronaux tels que celui des neurones glutamatergiques, GABAergiques ou dopaminergiques (Carpenter et al., 2001 ; Zhang et al., 2001). De plus, ces neurones peuvent répondre positivement à des stimulations électriques démontrant ainsi leur caractère fonctionnel (Carpenter et al., 2001). De manière similaire, une fois sevrés des mitogènes, les précurseurs neuraux contenus dans les neurosphères peuvent se différencier en différentes populations neuronales (GABAergiques, dopaminergiques, glutamatergiques, sérotoninergiques) et gliales (astrocytes et oligodendrocytes) (Reubinoff et al., 2001). Il est à noter qu'au cours de ces expériences, le phénotype neuronal est préférentiellement de type glutamatergique et GABAergique. Ces expériences démontrent ainsi le caractère multipotent des précurseurs neuraux dérivés de cellules hES. Cependant la spécification de ces précurseurs vers un phénotype neuronal spécifique n'est pas contrôlée.

Le développement du système nerveux, comme nous l'avons vu précédemment, est orchestré par l'interaction des précurseurs neuraux avec des morphogènes selon une séquence spatio-temporelle

bien précise. En s'appuyant notamment sur les données de l'embryologie, des études ont donc cherché à déterminer quelles molécules permettaient d'orienter la spécification des précurseurs neuraux vers un sous-type neuronal précis ou vers une population gliale donnée. Un protocole publié en 2003 par Barberi et collaborateurs démontre la possibilité de contrôler le destin de précurseurs neuraux, obtenus par culture de cellules mES sur une couche de cellules stromales (PA6, MS5 ou S17) (Barberi et al., 2003). Ces précurseurs neuraux, une fois cultivés, selon une séquence temporelle spécifique de milieu et de facteurs de croissance, dont l'objectif est de mimer certains signaux du développement neural *in vivo*, peuvent se différencier en divers sous-types de neurones et en cellules gliales (Figure 32). Ainsi, dans des cultures de précurseurs neuraux exposés aux molécules suivantes : FGF8, FGF2, et Shh, plus de 60% de neurones GABAergiques ont été observés. Un grand nombre de cellules exprimant Bf1, un facteur de transcription exprimé dans le télencéphale, a été détecté, démontrant l'identité télencéphalique des neurones GABAergiques induits.

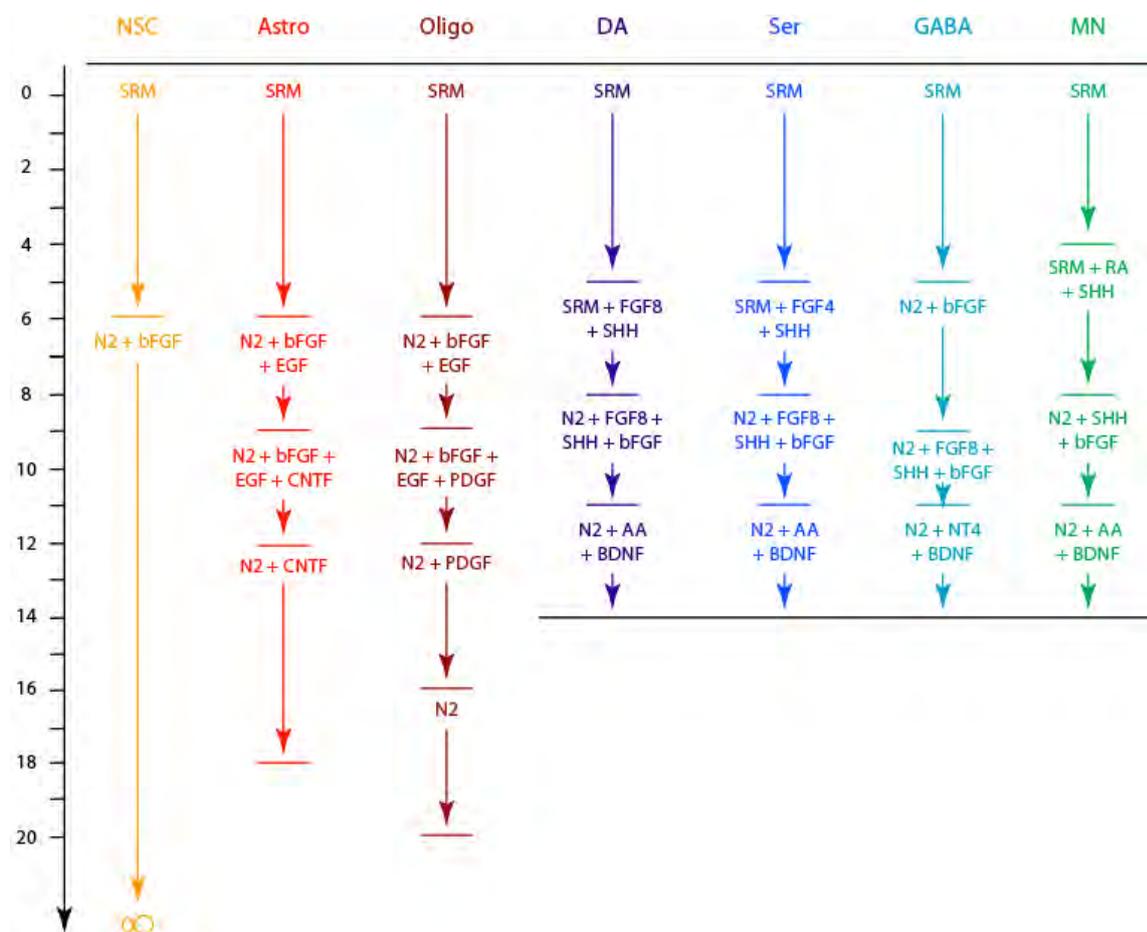


Figure 32 : Représentation schématique des différentes conditions de culture, permettant la production de populations neuronales et gliales spécifiques, à partir de cellules mES cultivées avec des cellules stromales. NSC : neural stem cell, Astro : astrocyte, Oligo : oligodendrocyte, DA : neurones dopaminergiques,

Ser : neurones sérotoninergiques, GABA : neurones GABA-ergiques, MN : motoneurones, SRM : serum replacement medium (adaptée de Barberi et al., 2003).

Une autre étude a par ailleurs démontré la possibilité d'obtenir des précurseurs du télencéphale ventral à partir de cellules mES (Watanabe et al., 2005). Au cours de cette étude, l'induction neurale des cellules mES est déclenchée par la formation d'EBs en présence de LeftyA (un inhibiteur de Nodal) et de Dkk1 (un inhibiteur de la voie Wnt) dans un milieu sans sérum. Dans ces conditions, environ 35% des cellules expriment le marqueur Bf1. Ces précurseurs du télencéphale sous l'action de Shh semblent être ventralisés, tel que démontré par l'expression du marqueur du MGE Nkx2.1 (Watanabe et al., 2005). Ces résultats indiquent qu'il apparaît possible de contrôler le sous-type de neurotransmetteur mais également l'identité régionale des précurseurs neuraux dérivés de cellules ES de souris en les exposant au bon moment aux signaux adéquats. En s'appuyant sur ces résultats, des travaux ont démontré la possibilité de transposer ce protocole aux cellules hES, et de les différencier spécifiquement en certains sous-type neuronaux tels que les neurones dopaminergiques du mésencéphale, sérotoninergiques ou les motoneurones (Perrier et al., 2004 ; Li et al., 2005a ; Lee et al., 2007 ; Kumar et al., 2008). Divers travaux ont mis en évidence que les cellules neuroépithéliales constitutives des rosettes adoptent par défaut un phénotype rostral (Li et al., 2005a ; Pankratz et al., 2007) en accord avec ce qui est observé au cours du développement précoce du SNC (Stern, 2001). Au cours de ces études les auteurs ont démontré la possibilité, grâce à des signaux spécifiques de régionalisation, d'orienter des précurseurs neuraux vers des populations cellulaires plus caudales. Ainsi, lorsqu'elles sont cultivées en présence de Shh et de FGF8, décrits précédemment comme deux molécules permettant l'orientation des mES vers le mésencéphale (Barberi et al., 2003), les cellules neuroépithéliales produisent des cultures enrichies en neurones dopaminergiques (Perrier et al., 2004 ; Vazin et al., 2008). De même, en présence de Shh et d'acide rétinoïque (RA), un morphogène ayant une activité caudalisante au cours de l'embryogenèse, les précurseurs neuraux peuvent adopter une identité régionale caudale et se différencier de façon plus spécifique en motoneurones (Li et al., 2005a ; Lee et al., 2007 ; Li et al., 2008) de manière analogue à ce qui a été observé chez la souris (Barberi et al., 2003). La transposition du protocole de spécification des cellules mES vers des précurseurs de télencéphale ventral a démontré la possibilité d'obtenir, après régionalisation par Shh, des cellules exprimant les marqueurs Bf1 et Nkx2.1 à partir de cellules hES (Watanabe et al., 2007). Au regard de ces expériences, il apparaît donc possible d'orienter l'identité régionale des précurseurs neuraux dérivés de cellules hES, après exposition de ces derniers à des molécules de signalisation essentielles au développement de la région du cerveau souhaitée, et d'obtenir des sous-types de neurones spécifiques.

3.3. Cadre législatif français et recherche sur l'embryon et les cellules hES.

Si les cellules hES ne cessent de susciter l'intérêt de nombreux scientifiques depuis une décennie, elles soulèvent par ailleurs plusieurs questions d'ordre éthique. En France, ce n'est que très récemment que les chercheurs ont pu envisager d'utiliser ces cellules. Il aura en effet fallu attendre la loi de bioéthique n° 2004-800 du 6 août 2004, pour qu'un cadre spécifique à la recherche sur l'embryon et les cellules hES soit défini. Cette loi interdit explicitement le clonage (article 21), qu'il soit dit « reproductif ou thérapeutique », et la recherche sur l'embryon (article 25). Cependant, à titre dérogatoire et pour cinq ans, elle autorise les recherches sur l'embryon et donc les cellules hES dans des conditions extrêmement contrôlées. Elle stipule que « les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition de ne pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ». Même si en pratique cet aspect a une portée relativement limitée, il est remarquable de constater que la recherche explicitement fondamentale (non indirectement thérapeutique) à partir de cellules hES reste interdite. Cette loi permet toutefois aux chercheurs en « biologie-médicale » de travailler sur des lignées de cellules hES issues d'embryons conçus *in vitro*, dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation sur le territoire français, et sur des lignées de cellules importées de pays étrangers et créées dans les mêmes conditions. Il faut distinguer trois types d'embryons. Tout d'abord les embryons surnuméraires ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Ensuite, les embryons dont l'état ne permet pas la réimplantation ou la conservation à des fins de grossesse. Et enfin, des embryons porteurs d'une anomalie recherchée dans le cadre d'un diagnostic pré-implantatoire (DPI). Ces embryons ne peuvent être utilisés à des fins de recherche qu'après consentement éclairé et écrit des deux parents, et sans contrepartie financière. La loi de bioéthique de 2004 a également instauré la création de l'Agence de la biomédecine, une autorité de référence concernant tous les aspects scientifiques et éthiques relatifs notamment à la recherche sur l'embryon. Des recherches ne peuvent ainsi être entreprises que si leurs protocoles ont fait l'objet d'une autorisation par cette agence. L'autorisation est délivrée en fonction de la pertinence scientifique du projet de recherche, de son intérêt pour la santé publique et de ses conditions de mise en œuvre au regard des principes éthiques. La décision finale d'autorisation appartient toutefois aux ministres de la santé et de la recherche. L'Agence de la biomédecine a également pour vocation d'évaluer les recherches et d'établir un bilan au terme des cinq années de dérogation, et ceci en partenariat avec l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Une autorisation de recherche peut par ailleurs être suspendue à tout moment en cas de non-respect du cadre légal. L'Agence a récemment autorisé plusieurs équipes de recherche françaises à dériver de nouvelles lignées de cellules hES. La première de ces autorisations a été attribuée, le 19 juin 2006, au Dr M. Peschanski et au Pr S. Viville, pour la dérivation et l'amplification de lignées de cellules hES porteuses de mutations à l'origine de maladies monogéniques.

Après une évaluation des résultats de la recherche sur les cellules souches embryonnaires, il est prévu que le dispositif soit réexaminé au début de l'année 2010. Dans cette perspective, des états généraux de la bioéthique, faisant notamment appel à la participation des citoyens, devraient se tenir début 2009.

4. Problématique.

Comme nous venons de le voir dans l'introduction, la maladie de Huntington (MH) est une pathologie complexe pour laquelle aucun traitement curatif ou même seulement capable de stopper son évolution n'est à ce jour disponible. Un essai clinique pilote de thérapie cellulaire, fondé sur la greffe de neuroblastes d'éminences ganglionnaires de fœtus humains, a cependant, mis en évidence des améliorations cliniques à long terme après transplantation (Bachoud-Levi et al., 2006 ; Bachoud-Levi et al., 2000b). Les résultats de cet essai ont ainsi apporté la démonstration de l'innocuité et surtout du potentiel thérapeutique d'une telle approche pour les patients atteints par la MH. Néanmoins, des problèmes d'approvisionnement, de standardisation, d'amplification, limitent pour l'instant, les perspectives d'application de cette thérapie à un nombre trop restreint de patients. Il est donc immédiatement apparu nécessaire d'identifier une source alternative de cellules capables de remplacer efficacement les tissus fœtaux. Les cellules souches embryonnaires humaines possèdent deux propriétés essentielles qui en font des candidats intéressants pour toutes formes de thérapie cellulaire. Tout d'abord, ces cellules sont capables d'une croissance quasi-illimitée en culture, ce qui, en théorie, résout tout problème d'approvisionnement en matériel biologique. Ensuite, ces cellules sont pluripotentes, ce qui signifie qu'elles peuvent à priori engendrer tous les phénotypes cellulaires de l'organisme et donc ceux appropriés aux approches de thérapies cellulaires. De nombreux travaux ont démontré la possibilité de différencier les cellules hES en précurseurs neuraux et en différents sous-types de neurones matures, tels que des neurones dopaminergiques du mésencéphale ou les motoneurones (Perrier et al., 2004 ; Li et al., 2005a). Plus encore, la transplantation de progéniteurs neuronaux dérivés de cellules hES, dans un modèle animal de la maladie de Parkinson, a mis en évidence la capacité de ces progéniteurs à survivre, à se différencier en neurones adéquats et à améliorer certains symptômes moteurs (Sonntag et al., 2007 ; Roy et al., 2006 ; Cho et al., 2008). Les cellules souches embryonnaires humaines, ayant ainsi fait leur preuve comme source potentielle de greffon pour la thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson, pourraient donc par conséquent constituer une alternative aux tissus fœtaux dans le cas de la MH. C'est dans ce cadre scientifique que nous avons initié mon projet de recherche. L'objectif général de mes travaux était d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules hES dans le contexte d'une approche de thérapie substitutive expérimentale de la MH. Les deux étapes majeures de ma thèse ont été d'abord de mettre au point la production *in vitro*, à partir de cellules hES, des progéniteurs de neurones GABAergiques moyens épineux (MSN) du striatum, puis d'évaluer dans un modèle rongeur de la MH la survie, la maturation et l'intégration fonctionnelle de tels progéniteurs striataux *in vivo*.

Résultats

1. Etude du potentiel de différenciation des cellules hES *in vitro* et dans un modèle rongeur de la maladie Huntington.

1.1. Elaboration du protocole de différenciation permettant la production de progéniteurs striataux à partir de cellules hES *in vitro*.

Au cours de la première partie de ma thèse j'ai cherché à élaborer un protocole permettant la spécification des cellules hES en progéniteurs de neurones moyens épineux (MSN). Lors du développement embryonnaire, l'induction neurale permet la spécification des cellules de l'ectoderme en cellules neuroépithéliales. Ces dernières, sous l'action d'un ensemble de morphogènes, prolifèrent et acquièrent leur identité régionale selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Une fois cette identité acquise elles s'engagent vers un phénotype neuronal ou glial déterminé (Rallu et al., 2002 ; Hebert and Fishell, 2008). Ces divers événements se produisent selon une séquence spatio-temporelle précise, essentielle à la formation du système nerveux central. Les neurones moyens épineux, naissent ainsi au sein d'une région ventrale du télencéphale (région antérieure du tube neural) dénommée l'éminence ganglionnaire latérale (LGE), à l'origine de la majeure partie du striatum adulte (voir introduction). C'est en s'appuyant sur ces données de l'embryogenèse que nous avons tenté de reproduire, *in vitro*, certaines étapes de la neurogenèse striatale, afin d'élaborer notre protocole.

Afin de promouvoir l'induction neurale, nous avons utilisé un protocole, décrit en 2004 par l'un des membres de l'équipe, fondé sur la culture des cellules hES avec des cellules stromales (MS5) en absence de sérum (Perrier et al., 2004). Ce protocole permet de produire en une vingtaine de jours des précurseurs neuraux organisés en rosettes neurales (Aubry et al. Figures 1A et B). Ces rosettes neurales expriment le facteur de transcription *BFI*, spécifique du télencéphale (Aubry et al. Figure 2B). Afin d'orienter ces précurseurs vers un phénotype cellulaire du télencéphale ventral, nous avons utilisé deux molécules, SHH et DKK1 (un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt). Au cours de la neurogenèse chez la souris, la voie Shh et la voie Wnt ont des actions antagonistes qui participent respectivement à la ventralisation et à la dorsalisation du télencéphale (Ericson et al., 1995 ; Backman et al., 2005). L'ajout de Shh et Dkk1 a, de plus, permis la production, à partir de cellules ES de souris, de populations cellulaires enrichies en cellules du télencéphale ventral (Watanabe et al., 2005). Nos propres expériences ont démontré que l'adjonction des protéines recombinantes SHH et DKK1 dans le milieu de culture des précurseurs neuraux (en rosettes) permet une augmentation significative de l'expression des facteurs de transcription spécifiques du télencéphale ventral (*GSH2* et *DLX2*) (Aubry et al. Figure 2B). En accord avec ces résultats, la différenciation terminale de ces populations « enrichies » engendre de très nombreux neurones post-mitotiques qui possèdent des caractéristiques phénotypiques de neurones moyens épineux du striatum. Près de 36% des neurones ainsi obtenus produisent du GABA et plus de la moitié (53%) expriment la protéine DARPP32 (spécifique des MSN) (Aubry et al. Figures 1E, G, et I). L'analyse des propriétés électrophysiologiques des neurones

de ces cultures a démontré qu'ils étaient suffisamment matures pour être capables d'émettre des trains de potentiels d'action en réponse à un courant dépolarisant (Aubry et al. Figure supp. 2). L'ensemble de nos résultats *in vitro* ont démontré notre capacité à partiellement reproduire, en culture, le développement du striatum, nous permettant ainsi de générer des progéniteurs de neurones striataux issus de cellules hES.

1.2. Xéno-transplantation de progéniteurs de neurones striataux dérivés de cellules hES dans un modèle rongeur de la maladie de Huntington.

Une deuxième partie de mes travaux de recherche a consisté à étudier la « biologie cellulaire » des progéniteurs striataux issus de cellules hES, après transplantation dans un modèle rat de la maladie de Huntington. Dans un premier temps, nous avons réalisé une série de greffes à court terme (4 à 6 semaines), afin de déterminer à quel stade de différenciation *in vitro* nos populations striatales devaient être greffées pour produire les meilleurs résultats en termes de survie et de différenciation en neurones striataux. Pour ce faire un panel de greffons ayant été cultivé pendant 23 à 72 jours *in vitro* a été transplanté. Cette période a été divisée en 5 stades appelés stades A à E pour plus de commodité (Aubry et al. Figure 1A). Assez logiquement, nous avons observé que la durée de différenciation *in vitro* des populations de cellules greffées influe directement sur leur potentiel de différenciation *in vivo*. Les transplantations de greffons peu différenciés (stades A et B) conduisent le plus souvent à la formation de structures ressemblant à des tératomes (Aubry et al. Figures 3A-B). Dans de rares cas, toutefois, ces greffons maintiennent un phénotype neural homogène et présentent une organisation cellulaire en rosettes très semblable aux rosettes de cellules neuroépithéliales observées *in vitro* (Aubry et al. Figures 3A, D et E). En revanche, des populations cellulaires plus matures (stades C, D et E) restent complètement engagées dans la voie neurale et n'induisent pas la formation de tératomes. Parmi ces populations, celles différenciées pendant 45 à 59 jours *in vitro* (stade D), génèrent *in vivo* des cellules qui sont les plus intéressantes en termes de survie et de maturation striatale. Nous avons, en effet, détecté dans les greffons produits à partir des cellules issues du stade D des zones composées de neurones exprimant les marqueurs striataux DARPP-32 et Calbindine (Aubry et al. Figures 3A, J, K, N, O).

Une fois déterminée la fenêtre de différenciation *in vitro* la mieux adaptée (stade D), nous avons étudié à plus long terme le devenir *in vivo* de ces progéniteurs striataux issus de cellules hES. L'analyse des coupes de cerveaux, entre 2 à 5 mois après la greffe, a révélé la présence de larges zones constituées de neurones humains dont environ 20% arborent un phénotype de neurones moyens épineux du striatum (DARPP-32+/ HNA+) (Aubry et al. Figure 4). Aucune migration des cellules humaines dans le parenchyme de l'hôte n'a été observée. Les cellules greffées émettent cependant de rares neurites, notamment vers le corps calleux et dans le faisceau pyramidal au-delà du tronc cérébral. Nos analyses histologiques ont également montré la présence de cellules microgliales non activées en faible nombre et de cellules endothéliales de l'hôte, indiquant un possible début de vascularisation du

greffon (Aubry et al. Figure supp. 4). De manière beaucoup plus préoccupante, ces expériences ont également mis en évidence un processus de surprolifération considérable des cellules implantées (Aubry et al. Figures 5A-D). A partir de deux mois après transplantation, les greffons occupent un espace important, largement supérieur à celui du striatum, compressant ainsi les hémisphères cérébraux (Aubry et al. Figure 5A). Les analyses histologiques et immunohistochimiques n'ont révélé ni la formation de tératome, ni la présence de cellules hES indifférenciées. En revanche, tous les greffons contiennent des régions composées de cellules neurales (Nestine+ et Pax6+) en prolifération (Ki67+) (Aubry et al. Figures 5B et D). Ces régions « prolifératives » et celles contenant des neurones DARPP-32 sont distinctes et n'adoptent pas d'organisation ou de localisation préférentielle. L'ensemble de mes résultats de xéno greffes démontrent que les progéniteurs striataux issus de cellules hES peuvent survivre et adopter un phénotype de neurones striataux DARPP-32 *in vivo* dans un contexte lésionnel. Néanmoins, ils montrent également qu'une partie des cellules greffées ont un potentiel tumorigénique, ce qui nuance fortement l'impacte des résultats précédents.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'article qui suit.

1.3. Conclusion.

Au cours de cette étude, nous avons élaboré un protocole de différenciation *in vitro* des cellules hES qui repose sur une succession de trois étapes : 1- l'induction neurale par co-culture des cellules hES avec des cellules stromales (MS5), 2- l'expansion et la spécification, au moins partielle, des précurseurs neuraux en présence de facteurs de régionalisation extrinsèques : les molécules SHH et DKK1, et 3- la différenciation de ces progéniteurs en neurones striataux. Mes résultats démontrent que ce protocole permet, *in vitro*, la production efficace de populations cellulaires enrichies en progéniteurs striataux à partir de cellules souches embryonnaires humaines, pré-requis nécessaire à l'exploration de leur potentiel thérapeutique. Mes expériences chez le rat, modèle de la MH, démontre qu'une fois greffés dans un striatum lésé ces progéniteurs striataux peuvent survivre et se différencier en neurones qui expriment la protéine striatale DARPP-32. A notre connaissance, un tel résultat n'a encore jamais été décrit dans la littérature. Nos expériences de xéno greffes ont d'autre part révélé le potentiel néoplasique des cellules transplantées. Ceci se traduit par la formation de tumeurs qui ne sont pas des tératomes. Les résultats obtenus au cours de ces études révèlent ainsi le fort potentiel de différenciation *in vitro/in vivo* des progéniteurs striataux issus de cellules hES. Nos travaux apportent ainsi la démonstration de la pertinence des recherches ayant pour but d'utiliser ces progéniteurs pour la thérapie cellulaire de la maladie de Huntington. Cependant, la mise en évidence du potentiel tumorigène des cellules transplantées souligne la nécessité de mettre en place des mesures spécifiques pour contrôler la prolifération *in vivo* de ces cellules, avant d'envisager toute application clinique.

Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons *in vitro* and in quinolinic acid-lesioned rats

Laetitia Aubry*, Aurore Bugi*[†], Nathalie Lefort*, France Rousseau[‡], Marc Peschanski*, and Anselme L. Perrier*[§]

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université d'Evry-Val-d'Essonne Unité Mixte de Recherche 861, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, Association Française contre les Myopathies, 91030 Evry, France; and [‡]Laboratoire de Neurobiologie, Ecole Normale Supérieure, Centre National de la Recherche Scientifique, 75005 Paris, France

Communicated by Etienne-Emile Baulieu, Collège de France, Le Kremlin-Bicêtre, France, August 27, 2008 (received for review May 22, 2008)

Substitutive cell therapy using fetal striatal grafts has demonstrated preliminary clinical success in patients with Huntington's disease, but the logistics required for accessing fetal cells preclude its extension to the relevant population of patients. Human embryonic stem (hES) cells theoretically meet this challenge, because they can be expanded indefinitely and differentiated into any cell type. We have designed an *in vitro* protocol combining substrates, media, and cytokines to push hES cells along the neural lineage, up to postmitotic neurons expressing striatal markers. The therapeutic potential of such hES-derived cells was further substantiated by their *in vivo* differentiation into striatal neurons following xenotransplantation into adult rats. Our results open the way toward hES cell therapy for Huntington's disease. Long-term proliferation of human neural progenitors leads, however, to xenograft overgrowth in the rat brain, suggesting that the path to the clinic requires a way to switch them off after grafting.

cell therapy | Huntington's disease | striatum | cell differentiation | overgrowth

Huntington's disease (HD), a neurodegenerative disease of genetic origin that affects primarily the striatum, has been shown to be partially amenable to treatment by substitutive cell therapy. Fetal neural grafts have provided preliminary clinical success in a small number of HD patients (1–5). However, this technique is marred by logistic problems, because fetal striatal cells in tissue dissected immediately after elective abortion cannot be adequately expanded *in vitro*. This restricts considerably the amount of material available for the delivery of an optimally sized transplant to all patients who may benefit from it.

Meeting this challenge requires identifying cells that can be banked and propagated as necessary, and that fully reproduce the phenotype of the fetal neural precursors. Due to their self-renewal and pluripotency properties, human embryonic stem (hES) cells theoretically fulfill both prerequisites. Several authors have already demonstrated the relevance of using hES cells for therapy for Parkinson's disease (PD). They showed that hES cells can be differentiated *in vitro* into neurons exhibiting major phenotypic characteristics of the nigral dopaminergic neurons (6–8). Implantation of hES cell-derived neural progenitors committed to that phenotype into the rat brain has revealed appropriate differentiation of a sizeable proportion of those cells (6, 9).

We have undertaken a study aimed at reaching a similar achievement in hES cell therapy for HD: that is, (i) designing the *in vitro* protocol necessary to obtain the hES cell-derived progeny equivalent to fetal striatal progenitors, and (ii) validating this protocol *in vivo* by using xenotransplantation in rodents. Via a multistep protocol we have obtained postmitotic neurons exhibiting major phenotypic characteristics of the striatal GABAergic medium-spiny neurons. Xenotransplantation of hES cell-derived striatal progenitors into adult nude rats confirmed the efficiency of the differentiation protocol. It also confirmed the risk of graft overgrowth recently revealed in an experiment with the PD model (9), sug-

gesting the need for antiproliferative safety procedures before proceeding toward the clinic.

Results

Our protocol to differentiate hES cells into striatal neurons was developed based on the simplifying scheme that the normal course of neuronal differentiation may be separated into three successive steps: namely, (i) neural induction, (ii) regional commitment while neural expansion continues, and (iii) neuronal maturation (Fig. 1A). Commitment to a ventral telencephalic identity can be confirmed by detection of specific markers of the lateral ganglionic eminence (LGE), the striatal germinative zone (10), such as BF1 (FOXG1B), GSH2, and DLX2 (11, 12). Terminal striatal differentiation can be established by the detection of MAP-2⁺/Ki67⁻ postmitotic neurons expressing key striatal markers, such as GABA, GAD67 (GAD1), DARPP32, ARPP21, calbindin, or calretinin. For each step, we sought to optimize our protocol by using distinct combinations of substrates, media, and signaling molecules. Neural induction was carried out as previously described (7) using a coculture with murine stromal cells (MS5). Default commitment toward telencephalon relied on the plating of mechanically isolated rosettes cells on coated dishes in N2 medium supplemented with BDNF (7, 13). Ventralization of the telencephalic neural progenitors was sought by adding SHH and DKK1 (passages 1–4) because these cytokines are involved in the patterning of the forebrain in mouse and chicken (14, 15) and can push neural cells derived from ES cells toward ventral telencephalic progenitors (8, 16, 17). Neuronal terminal differentiation was carried out by replating the committed neural progenitors at a lower density (7) in the absence of patterning molecules but in the presence of dibutyryl-cAMP (dbcAMP) and valproic acid, previously found to stimulate GABA neurogenesis of rat forebrain stem cells (18).

In Vitro Assessment of a Striatal Differentiation Protocol. Neural, neuronal, and striatal differentiation was monitored from day *in vitro* 0 (DIV 0) to DIV 63 by using immunocytochemistry (Fig. 1) and quantitative PCR (Q-PCR) (Fig. 2). Neural rosettes were obtained after 3 weeks of coculture with MS5 and were amenable to passaging, expansion, and patterning [supporting information (SI) Fig. S1]. Relative gene expression analysis showed a time-dependent loss of the ES marker NANOG upon rosette formation

Author contributions: L.A., M.P., and A.L.P. designed research; L.A., A.B., N.L., F.R., and A.L.P. performed research; L.A., F.R., and A.L.P. analyzed data; and L.A., M.P., and A.L.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

[†]Present address: Centre d'Etude des Cellules Souches, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, Association Française contre les Myopathies, 5 rue Henri Desbrùères, 91030 Evry, France.

[§]To whom correspondence should be addressed. E-mail: aperrier@istem.genethon.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0808488105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

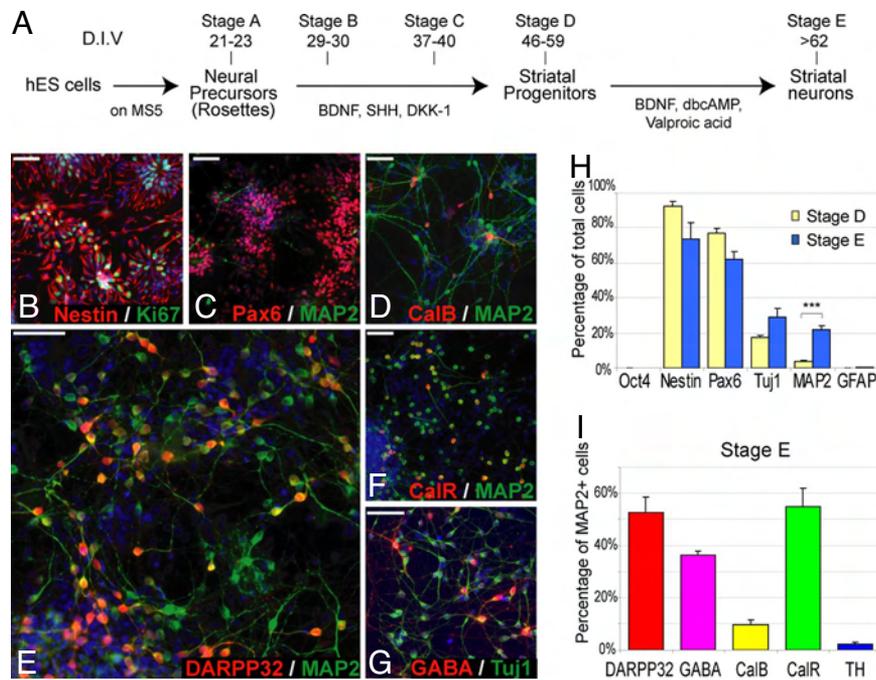


Fig. 1. Phenotypic characterization of striatal progenitors and neurons generated *in vitro* from hES cells. (A) Outline of the multistep protocol for the differentiation of striatal progenitors and neurons. DIV, days *in vitro*. (B and C) Proliferative neural rosette cells coexpress Ki67 (green), nestin (red), and Pax6 (red). Few neural cells matured into MAP2⁺ (green) neurons. (D–G) Neurons at stage E (MAP2⁺ or TuJ1⁺; green) expressing striatal markers DARPP32, GABA, calretinin (CalR), and calbindin (CaIB) (red). (H) Proportions of cells immunopositive for Oct4 (stage D), nestin, Pax6, TuJ1, MAP2, or GFAP at stages D and E. (I) Proportion of MAP2-positive neurons expressing DARPP32, GABA, CaIB, CaIR, and TH at stage E. (Scale bar: 100 μ m.) ***, $P < 0.001$ ($n = 5$).

(at DIV 21–23, stage A), consistent with a peak of expression of the early neural marker SIX3 and a delayed peak of expression of the neural marker SOX1 (Fig. 2A). After 4–5 weeks of culture of these rosettes in the presence of SHH and DKK1, hES cell progeny formed a monolayer of neural progenitors. Most cells were immunopositive for the neural markers nestin ($92 \pm 3\%$, $n = 5$) and Pax6 ($77 \pm 3\%$, $n = 3$) and were Ki67⁺ proliferating progenitors (Fig. 1B, C, and H). At this stage, few cells expressed neuronal markers, such as TuJ1 ($18 \pm 1\%$, $n = 3$) or MAP2 ($4 \pm 1\%$, $n = 5$) (Fig. 1C and H). As previously described with primate ES cell progeny (19), BF1 expression was already detected at the rosette stage (stage A) and reached a plateau at DIV 29–30 (stage B) (Fig. 2B). Striatal enrichment of the culture was detected by the peak of expression of GSH2 and DLX2 markers at stage B (Fig. 2B). We observed a

significant increase in LGE markers on exposure of stage A culture for 12 days to BDNF, SHH, and DKK1 compared with BDNF alone (3.6 ± 0.8 -fold, $P < 0.01$ for GSH2, 4.1 ± 0.7 -fold, $P < 0.01$ for DLX2; $n = 5$) (Fig. 2C). Conversely, BF1 expression did not change significantly in the same cultures (1.1 ± 0.1 fold; $n = 5$). These findings indicate that generation of striatal progenitors from hES cell-derived neural rosettes can be regulated by extrinsic signals. Terminal maturation of the expanded and partially patterned neural cells (DIV 46–59, stage D) over two additional weeks resulted in a cell population (DIV 62–72, stage E) that contained up to $22 \pm 2\%$ ($n = 3$) MAP2⁺ postmitotic neurons (Fig. 1H). Accordingly, Q-PCR showed a continuous increase in expression of the neuronal marker MAP2 coinciding with the decreased expression of markers SIX3 and SOX1 (Fig. 2A). Among the MAP2

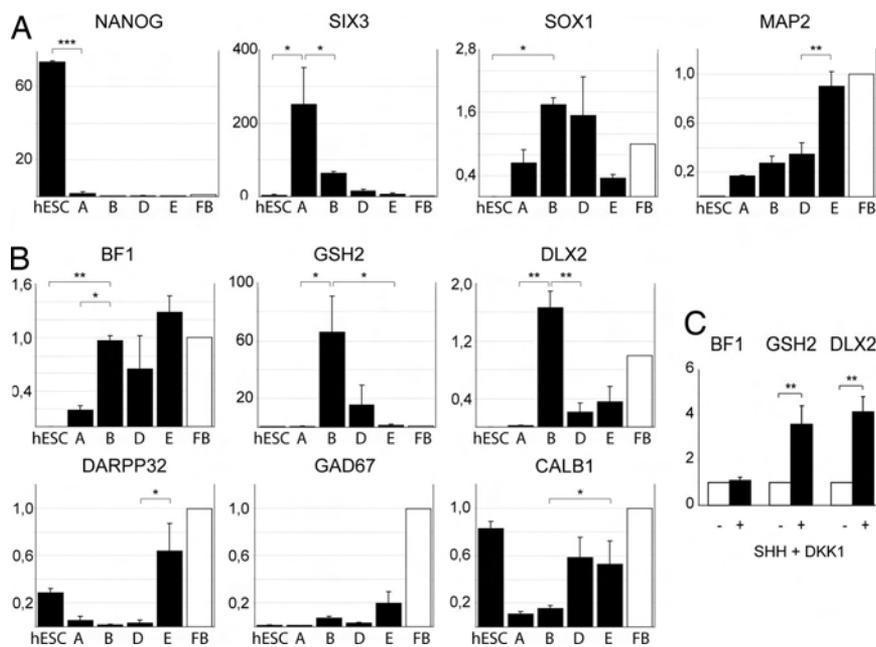


Fig. 2. Expression of key regulatory genes during differentiation. (A and B) Q-PCR analyses of undifferentiated hES cells, stages A, B, D, E, and human FB. (A) Time-dependent gene expression suggesting the sequential differentiation of hES cells (NANOG⁺) into neuroectodermal cells (SIX3⁺), neural precursors (SOX1⁺), and neurons (MAP2⁺). (B) Sequential gene expression of markers of developing forebrain (BF1), ganglionic eminences (GSH2 and DLX2), and adult striatum (DARPP32, GAD67, and CALB) suggesting an enrichment in striatal progenitors. (C) Striatal (GSH2 and DLX2) and telencephalic gene (BF1) expression in stage C culture upon exposure for 12 days (stages A–C) to BDNF (–; white bars) or BDNF, SHH, and DKK1 (+; black bars) showing the regulation of the striatal markers by extrinsic factors. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ($n = 3$ for A and B and $n = 5$ for C).

immunopositive neurons, $36 \pm 2\%$ were GABA⁺ ($n = 4$), and $53 \pm 6\%$ expressed DARPP32 ($n = 4$) (Fig. 1 E, G, and I). In addition, $10 \pm 2\%$ of MAP2⁺ neurons were immunoreactive for calbindin ($n = 4$), and $55 \pm 7\%$ were immunoreactive for calretinin ($n = 3$) (Fig. 1 D, F, and I). Less than 2% of the neurons expressed tyrosine hydroxylase (TH) (Fig. 1 I and Fig. S1F). Even fewer neurons were serotonergic (5HT⁺). Human GFAP-immunoreactive astrocytes were very scarce (Fig. 1H and Fig. S1H). Numerous neural progenitors (nestin⁺/Pax6⁺) persisted in these long-term cultures in the absence of any exogenous mitogens, patterning factors, or stromal feeders. Striatal commitment of the terminally differentiated culture was also confirmed by Q-PCR, which showed increased expression of DARPP32, GAD67, and calbindin (Fig. 2B). We next tested *in vitro* function of neurons in our striatal culture by patch clamp studies. Single-cell recordings demonstrated the induction of single-action potential (5 of 9) or rhythmic activity (4 of 9) in response to depolarizing currents (Fig. S2).

Intracerebral Transplantation of hES Cell-Derived Striatal Progenitors.

Fetal striatal neural grafts survive and integrate best when tissue is retrieved at a stage at which progenitors are present in the ganglionic eminence—i.e., committed to a ventral telencephalic fate—but still proliferating and not terminally differentiated (20). Accordingly, the most likely candidates for *in vivo* transplantation should be found between the rosette stage and the neuronal stage. Our first series of experiments aimed at defining a more precise optimal time window for transplantation. For this purpose, we transplanted cells treated using our protocol for 23–72 days and qualitatively assessed their survival, the formation of teratoma-like regions in the grafts, and both neural progenitor and striatal neuron differentiation. Cells were transplanted into the quinolinatol-lesioned right striatum of immunocompetent rats that were killed 4–6 weeks after surgery ($n = 48$). For sake of comparison, *in vitro* differentiation was divided up arbitrarily into the five stages (A to E) as defined above. All animals undergoing transplantation had surviving grafts with cells positive for the human nuclear antigen (HNA). Together, all studied parameters demonstrated that the cell content of the grafts depended on the duration of their *in vitro* differentiation. Human grafts transplanted at early stages (stages A and B) included regions that were not expressing neuroectodermal markers (“teratoma-like regions”) in most cases (Fig. 3 A–C). They seldom maintained a homogenous neural specification, and then only exhibited structures resembling neural rosettes (Fig. 3 A, D, and E). In contrast, more mature cells (stages C, D, and E) produced grafts that were fully committed to the neural lineage and did not include teratoma-like regions (Fig. 3 A and I). Regarding striatal neuron maturation, stage D was better than the others. Only a few of the DARPP32⁺ neurons were detected with cells transplanted at stages C or E (Fig. 3 A, F, and G). In contrast, areas containing clustered DARPP32⁺ and calbindin⁺ striatal neurons were observed in all stage D transplants (Fig. 3 H, J, K, N, and O). These areas were negative for acetylcholinesterase (Fig. 3 L and M).

Using cells at stage D (DIV 45), we then explored the fate of transplanted cells over a longer period in a search for their full differentiation potential. A total of 50,000 cells were transplanted into the quinolinatol-lesioned right striatum of immunotolerant nude rats that were killed after 13 to 21 weeks ($n = 24$). All animals undergoing transplantation had large spherical surviving grafts that compressed the host brain. Immunocytochemistry revealed large striatal donor-derived DARPP32⁺/HNA⁺ regions spread over the entire grafts (Fig. 4 A and B and Fig. S3A). DARPP32⁺ cells displayed a bipolar neuronal morphology with extensive neuritic outgrowth and with medium-sized cell bodies (10–16 μm in diameter) (Fig. 4C). They coexpressed the neuronal markers MAP2 (Fig. 4 D and E and Fig. S3A) and NeuN (Fig. S3B). Neurons and DARPP32⁺ cell-rich regions coincided, with DARPP32⁺ cells comprising an average of $21 \pm 7\%$ of the NeuN⁺ population. Although the volume of the grafts increased over time, the pro-

Stage	A	B	C	D	E
Graft survival	good	good	good	good	poor
Teratom-like region	4/4	10/13	0/11	0/14	0/6
Human neural cells	yes	yes	yes	yes	yes
Human DARPP32 ⁺ n.	no	very few	few	many / P zone	few

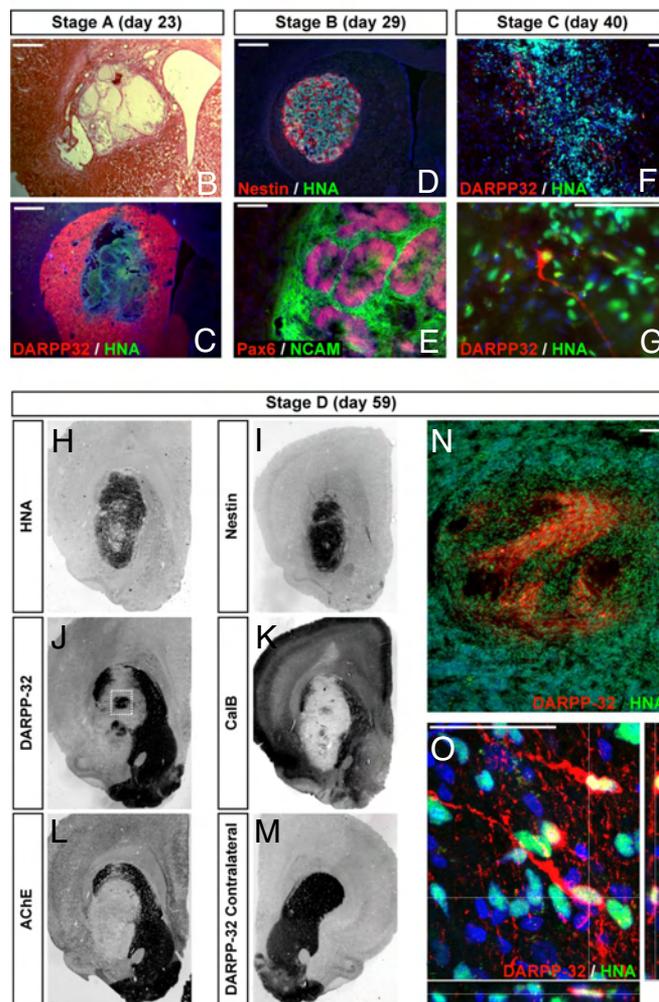


Fig. 3. Comparative *in vivo* assessment of different cell preparations 4–6 weeks after xenografting in rat. (A) Key properties of the grafted cells (stages A to E) after transplantation. (B and C) Formation of nonneuroectodermal teratoma-like regions after transplantation of cells at stage A. (D and E) Cells grafted (HNA⁺; green) at stage B express the neural markers nestin (red), Pax6 (red), and NCAM (green) and are organized in rosette structures *in vivo*. (F and G) Few human HNA⁺ (green)/DARPP32⁺ (red) neurons derived *in vivo* from stage C. (H–O) *In vivo* phenotypic characterization of grafts transplanted at stage D. Stage D grafts are HNA⁺ (H) and nestin⁺ (I) and contain areas where DARPP32⁺ (red) cells are clustered (J and N) and have a neuronal morphology as shown in O in a confocal reconstruction; in the same areas, cells may express calbindin (red) (K) but not AChE (L). (M) Contralateral section labeled for DARPP32 shown as a control. (Scale bars: B–D, 1 mm; E–G, N, and O, 100 μm.)

portion of DARPP32⁺ neurons was not significantly different in brains analyzed at 13 ($n = 5$), 15–16 ($n = 4$), and beyond 17 weeks ($n = 4$) after transplantation (Tukey–Kramer test $P = 0.05$). In contrast to what we observed in short-term transplants, DARPP32⁺ regions were often calbindin-negative (Fig. S3 C and D). There were very few TH-positive neurons (Fig. S3E), and there was neither AChE staining nor cholinergic, serotonergic, or cortical neurons (MAP2⁺/Pax6⁺). Human GFAP⁺ astrocytes also were very scarce. Scattered neurites positive for human-specific nestin or

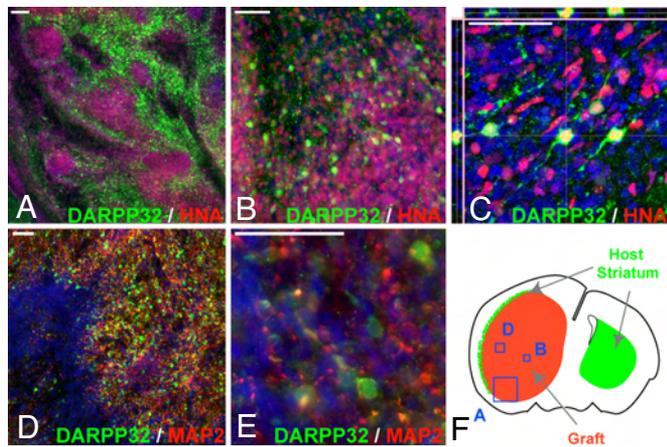


Fig. 4. Grafted HNA⁺ cells (stage D, DIV 45) matured into DARPP32 neurons 3–5 months after transplantation. (A–C) DARPP32⁺ (green)/HNA⁺ (red) cells are (A and B) spread over the graft and display a neuronal morphology, as shown in C in a confocal reconstruction. (D and E) DARPP32⁺ (green) cells coexpressed the neuronal marker MAP2 (red). (F) Location of images A, B, and D on a schematic coronal section outline showing the graft location (red) and DARPP32⁺ host region (green). (Scale bars: A, 200 μ m; B and D, 100 μ m; C and E, 50 μ m.)

human-specific NCAM were detected in host major fiber tracts, such as the corpus callosum or the pyramidal tract down to the brainstem (Fig. S3F). In contrast, there was no migration of transplanted HNA⁺ human cells into the host parenchyma beyond the edge of the grafts. Grafts contained numerous cells of host rat origin, in particular HNA⁻/IB4⁺ microglia and endothelial cells forming blood vessels, and HNA⁻/GFAP⁺ astrocytes at the graft–host interface (Fig. S4).

Xenograft Overgrowth and Persistent Proliferation of Human Neural Progenitors. Two months and beyond after transplantation, many animals started to exhibit lethargy, rapid weight loss, and sometimes hemiparesis. At killing, these animals displayed particularly large grafts that expanded beyond the limits of the striatum. At 13 weeks, the graft volume ranged between 200 mm³ and 800 mm³. Analyses of these overgrown grafts revealed neither persistency of undifferentiated hES cells, as all grafts were Oct4-negative, nor teratoma formation, necrosis, or evidence of overt anaplasia. All grafts comprised a mosaic of two types of regions with different cellular characteristic (Figs. 4 A and D and 5D). The first region type consisted almost exclusively of nestin⁺ neural progenitors, many of which displayed the pan-neural marker Pax6 colocalizing with the proliferation marker Ki67 (Fig. 5 B–D). The second region type showed no Ki67⁺ proliferating cells and, in contrast, contained more mature neural cells, including numerous differentiated MAP2⁺/DARPP32⁺ striatal neurons (Fig. S5). There was no specific arrangement of the two types of regions and, in particular, the more differentiated ones were not preferentially localized within the periphery.

Flow cytometry analyses of the grafted cells retrieved from four animals confirmed that they were committed to the neural lineage, with 96 \pm 1% CD56/NCAM⁺ and 86 \pm 7% nestin⁺ cells (Fig. S6A). Q-PCR analyses were conducted to compare 3-month-old dissected grafts ($n = 4$) to pregrafting cells at stages D (DIV 45) and E (DIV 63). There was no apparent dedifferentiation of grafted cells, because NANOG did not increase in the grafts compared with *in vitro* culture (stages D and E). Early neural (SOX1) and LGE (GSH2 and DLX2) markers decreased, whereas forebrain and striatal neuronal markers (BF1, MAP2, ARPP21, and DARPP32) were significantly increased in grafts (Fig. S6B).

Four rats were killed at 13 or 15 weeks after transplantation, and their oversized graft was dissected out to perform additional *in vitro*

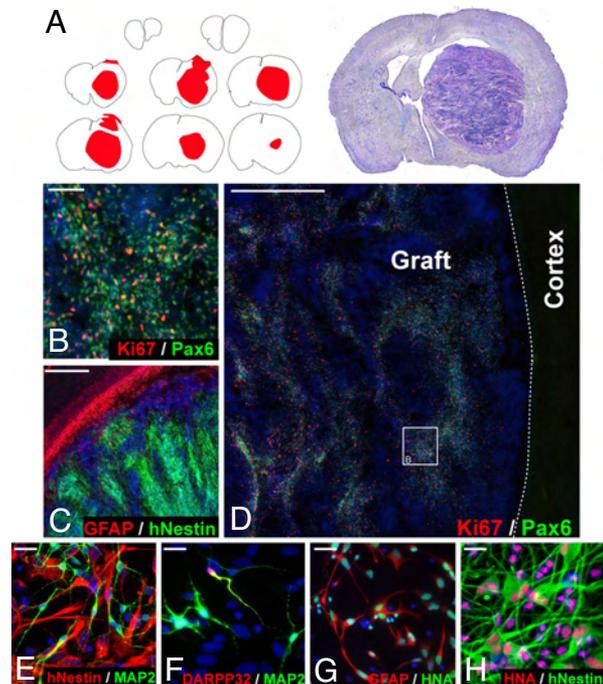


Fig. 5. Massive proliferation of neural progenitors 3–5 months after transplantation. (A) Cresyl violet-stained coronal section (right) and outlines of serial coronal sections spanning over \approx 10 mm (left) illustrating the size of the graft (red) throughout the host brain. (B–D) Proliferative (Ki67⁺; red) neural regions (Pax6⁺; green; or human-specific nestin⁺; green) are spread all over the graft. (E and F) Expanded and differentiated cells derived from 3-month-old graft dissection. (E–H) Graft-derived neural cultures (nestin⁺; red) can generate neurons (MAP2⁺; green) (F) and GFAP⁺ (red) glial cells (G). Only occasional DARPP32⁺/MAP2⁺ neurons (yellow) are generated. (Scale bars: B, 200 μ m; C and D, 1 mm; E–H, 100 μ m.)

analyses. Small pieces of the dissected grafts were dissociated, and cells were seeded back onto coated culture dishes containing medium supplemented with serum and N2 ($n = 4$) to evaluate their proliferative potential and commitment to the neural lineage. These cultures appeared fully committed to the neural lineage (nestin⁺ or Tuj1⁺) and amenable to both passaging and neuronal or glial differentiation (Fig. 5 E–H). However, the neuronal differentiation of those progenitors did not lead to a significant number of DARPP32⁺ neurons.

A second series of transplantations ($n = 12$) using similar conditions was conducted using DIV 56 cells—i.e., the upper limit of the stage D maturation time window. Results were similar to those described above for cells transplanted at DIV 45, the lower limit of stage D, in terms of both striatal fate and overgrowth.

Discussion

The main result of this study is the development and validation of a protocol, both *in vitro* and *in vivo* following xenografting, to direct the differentiation of hES cells into neurons that exhibit phenotypic features of the medium-spiny GABAergic neurons (MSNs) of the striatum. Such hES-derived striatal progeny may provide a potential cell therapy product to substitute for fetal neural precursors that are currently used in clinical trials to treat patients with HD. On the path to the clinic, our results suggest that specific measures should be taken to control neural cell proliferation to ensure postgrafting safety. Substitutive cell therapy has shown some long-term success in patients when ganglionic eminences (GEs) of human fetuses were grafted (2, 3). This cell product is, unfortunately, in short supply, because GE cells are not easily propagated. This limitation has led to a yet-unfruitful search for alternative cell sources (21).

Our results demonstrate that this goal could be achieved by using hES cells as a source.

MSN differentiation occurs in a large proportion of neurons when hES cells are treated *in vitro* with our protocol. Progression along the striatal lineage is characterized by the timed expression of specific developmental genes, such as GSH2 and DLX2, and the detection of DARPP32 protein in terminally differentiated neurons. During early development, immature neural progenitors bear, by default, a rostral fate (22, 23). Consistently, we found that the neuroectodermal cells produced up to the rosette stage express genes associated with a forebrain fate, such as BF1. The antagonizing actions of SHH and Wnt signaling play a major role in the fine tuning of subregional cell fate in the developing forebrain, as demonstrated in many mammals, and most recently by using ES cells (8, 14, 16, 17). We made use of and confirmed these data to obtain a subregionalization to ventral telencephalic structures—in particular the GE—by treating rostral neural cells with SHH and DKK1, a Wnt pathway inhibitor. We obtained a large number of cells displaying a MSN phenotype after grafting using progenitors retrieved at our stage D, which is equivalent to 7.5–9.5 weeks after conception. Three months after grafting using stage D cells, the yield of DARPP32⁺ neurons was high, in the range of several hundred thousand striatal neurons following implantation of 50,000 neural progenitors—i.e., probably relevant to a clinical application. It is interesting to note that this staging matches the time window used for human fetal cell retrieval for grafts in HD patients (3, 24), suggesting that the striatal and neuronal differentiation *in vitro* bears some similarity to the actual chronobiology of the ontogenetic process. Consequently, longer-term studies allowing to follow up grafted cells up to establishment of a full set of connections—which may occur as late as more than 1 year after grafting, taking into account data from fetal neural transplants (25)—would be of prime interest to determine the final differentiation stage of ES-derived neurons.

However, despite these promising data, results of the long-term transplant experiments suggest the existence of a potential roadblock on the path to the clinic, because the human xenografts systematically overgrew in the rat brain over time. This overgrowth was massive, with up to several thousand-fold increase in cell content, and rapid, because it was visible already at 4 to 6 weeks and provoked clinical symptoms within 3–5 months. Xenograft overgrowth following intracerebral transplantation of neural progenitors derived from two hES cell lines (H1 and H9) different from the one we used has been reported recently (9), and compressive grafts also were mentioned following implantation in the rat brain of nonhuman primate ES cell-derived neural progenitors (19, 26). This adverse effect is not related, therefore, to one particular hES cell line or to the human species.

One main question raised by these data deals with the “physiological” or otherwise “pathological” nature of these large grafts—i.e., whether human neural progenitors are simply proliferating as they are supposed to, or else have lost their responsiveness to signals that normally switch off their proliferation. Our analysis of the phenotype of the proliferating cells (*in vivo*) underlined that they were typical neural progenitors with no apparent phenotypic abnormality. They were capable of differentiating into neurons and astrocytes after replating *in vitro*. These results were consistent with those recently presented by Roy *et al.* (9) on dopaminergic neural xenografts. Still, these authors showed that their dopaminergic transplants were intermingled with the host tissue, whereas proliferating progenitors occupied the graft core. This observation suggested that host cells might deliver differentiation cues inaccessible to the proliferating cells of the inner core and led these authors to support the hypothesis of a pathologic state of the proliferating cells. In the present study, this suggestive topographic arrangement was not observed, and regions containing either proliferative or differentiated cells were interspersed. Despite the decreased expression in early neural markers (e.g., SOX1) in the 3- to 5-month-

old graft compared with stage A–D cultures, we cannot exclude that graft overgrowth is at least in part due to the presence of a small proportion of early-stage “rosette-like” precursors not yet committed to a striatal fate that would have remained undetected. Besides, in our case, the chronobiology of the ontogenesis in the GE supports the physiological hypothesis. Indeed, progenitors in these germinative zones not only participate in striatal neurogenesis up to the 15th week of gestation but also give rise to many cortical interneurons over several months and to gliogenesis well beyond (27–29). The fact that cells replated *in vitro* from overgrown grafts differentiated normally into neurons and glia but failed to give rise to MSN, the neurogenesis time schedule of which had passed, is in agreement with this suggestion. It is interesting to mention that human-to-rat xenotransplantation of fetal GE tissue led to overgrowth (30) and that areas containing potentially proliferating cells were observed in grafts analyzed in a patient autopsied 18 months after grafting (25). Apparent overgrowth of human xenograft in rat brain may, therefore, only be a normal consequence of the physiological capacity of proliferation of human neural precursors, essentially revealed because of the size difference between rat and human brain. Nevertheless, as one may not exclude some impact of this phenomenon in human allografts, this calls for specific precautionary action on the path to the clinic, allowing for blocking precursor proliferation if need be. Potential action may involve isolation of pure striatal population with limited or no proliferative capacity, preemptive *in vitro* treatment of the grafted cells with antimitotic agents, or genetic engineering of the transplant to provide a means to eliminate unwanted dividing cells *in vivo*, such as by using a suicide gene paradigm.

Materials and Methods

Human ES Cell Culture. Human ES cells (SA-01, XY, passages 20–80; Cellartis; and H9, XX, passages 40–60; WiCell Research Institute) were maintained on a layer of mitotically inactivated STO (ATCC no. CRL-1503) feeders. The hES cells were cultured in DMEM/F12 Glutamax supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, 0.55 mM 2-mercaptoethanol, and 10 ng/ml recombinant human FGF2 (all from Invitrogen). Cultures were fed daily and manually passaged every 5–7 days.

Induction and Differentiation of Striatal Progenitors. Induction of striatal progenitors and GABAergic neurons from hES cells was performed by using a modification of a previously described protocol (7). Briefly, hES cells were plated on mitotically inactivated murine bone marrow-derived stromal feeder cells M55 in serum replacement medium containing DMEM/F12 supplemented with 15% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, and 0.55 mM 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen). After 12 days in these conditions, serum replacement medium was replaced with an N2 medium that consisted of DMEM/F12 supplemented with insulin (25 μ g/ml), transferrin (50 μ g/ml), putrescine (100 μ M), selenium chloride (30 nM), and progesterone (20 nM) (all from Sigma–Aldrich). Medium was changed every 2–3 days, and growth factors were added as described: 200 ng/ml SHH, 100 ng/ml DKK1, 20 ng/ml BDNF (R & D Systems), 0.5 mM dbcAMP (Sigma–Aldrich), and 0.5 mM valpromide (Lancaster Synthesis). After \approx 3 weeks of differentiation, rosette structures were collected mechanically and transferred to 15 μ g/ml polyornithine/1 μ g/ml laminin-coated culture dishes in N2 medium supplemented with SHH, DKK1, and BDNF (passage 1). After 8–12 days, cells were exposed to Ca²/Mg²-free Hanks balanced salt solution (HBSS) for 3 h at 37°C, spun at 150 \times g for 5 min, resuspended in N2 medium, and then plated onto coated culture dishes in the presence of SHH, DKK1, and BDNF (passage 2). After another two or three passages in the same conditions, cells were differentiated by replating them onto coated culture dishes (25–50 \times 10³ cells per cm²) in the presence of BDNF, dbcAMP, and valproic acid. Approximately 10⁴ hES cells were plated (three colonies 2–3 mm in diameter) per 6-cm plate of M55 feeder. At stage A (3 weeks *in vitro*), between 500,000 and 1 million neural progenitors could be harvested. These neural cells were expanded (first passage plating ratio 1:1, following passage plating ratio 1:3: 10⁵ cells per cm²) up to stage D. After 45–60 days of culture, the initial 10⁴ hES cells may generate up to 3 \times 10⁶ cells ready to be grafted, corresponding to an average doubling time of 4–5 days.

Real-Time Q-PCR. Total RNA was isolated by using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer’s instructions (Qiagen). A total of 1 μ g of RNA was reverse transcribed into cDNA with SuperScript II (Invitrogen) using random primers.

Real-time Q-PCRs were performed with Power SYBR Green PCR Mix (Applied Biosystems) and a Chromo 4TM Real-Time system (Bio-Rad). The amplification efficiency of each pair of primers was determined by comparison with a standard curve generated with serially diluted cDNA of fetal brain (FB) (Clontech). Quantification was performed at a threshold detection line (C_t value). The C_t of each target gene was normalized against that of the cyclophilin housekeeping gene. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to determine the relative level of expression of each gene, and FB cDNA was used as calibrator. Data were expressed as mean \pm SEM. Primer sequences are listed in Table S1.

Quinolinic Acid Lesion and Cell Transplantation. All animal experiments were conducted in accordance with the Direction des Services Vétérinaires, Ministère de l'Agriculture de France, and with the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Adult OFA and Nude rats (weight 220–260 g at the time of grafting; Charles River Laboratories) were used. All surgical procedures were achieved under full anesthesia using a mixture of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (3 mg/kg; Bayer Health Care) and using a stereotaxic frame. Unilateral lesions were made by injecting 1 μ l of 80 nmol/ μ l quinolinic acid dissolved in 0.1 M PBS into the right striatum, according to the following coordinates (in mm): anteroposterior (A) = +0.3; lateral (L) = -2.7; ventral (V) = -4.7; and tooth bar = -3. One week after the lesion, rats received transplants of cells (50,000–200,000 in 2 μ l of HBSS supplemented with 0.05% DNase I; Invitrogen) (A = +0.3; L = -3; and V = -5.5 and -4.5).

Tissue Processing. At different times after transplantation, rats were terminally anesthetized with 1 g/kg i.p. sodium pentobarbital (Ceva Santé Animale), and their brains were fixed by transcardial perfusion with 100–150 ml of 0.1 M PBS (pH 7.4), followed by 250 ml of buffered 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed, postfixed overnight at 4°C in 4% PFA, and then cryoprotected in 30% sucrose solution at 4°C. Coronal brain sections (50 μ m) were cut on a freezing Microtome, collected serially (interspace, 600 μ m), and stored at -20°C in a cryoprotectant solution until analysis.

For *in vitro* culture, FACS (see SI Methods), and gene expression analyses of 3-month-old grafts, rats were transcardially perfused with PBS, brains were removed, and the grafted cells were dissociated in HBSS. Cells were cultured on coated culture dishes in N2 medium containing 2% FBS and were passaged every week with trypsin (Invitrogen). Terminal differentiation was induced by replating the cells at lower density in N2 medium supplemented with 20 ng/ml BDNF.

Immunocytochemistry and Immunohistochemistry. Cells were fixed with 4% PFA for 10 min at room temperature and incubated with primary antibody overnight at 4°C. Secondary antibodies and DAPI counterstain were applied for 1 h at room temperature. Brain sections were incubated with primary antibodies for 36 h at 4°C. Secondary antibodies and DAPI counterstain were applied for 3 h at room temperature.

Both cells and tissue were stained with the primary antibodies listed in SI Methods. Confocal analysis was performed on a Leica TCS SP2 microscope (Leica Microsystems).

Quantification. Quantitative immunocytochemical analysis was performed on randomly selected visual fields from at least two independent differentiation experiments. In each field, images of separate channels were acquired at 20 \times magnification on a fluorescence microscope (ImagerZ1; Carl Zeiss) using the Axiovision image capture equipment and software and exported to an imaging software (Adobe Photoshop; Adobe Systems), where separate channel images as well as the corresponding overlaid images were counted. On average, 10 visual fields were acquired per 16-mm coverslip, and a total of 100–500 cells were counted per field. The total number of cells expressing the different markers was plotted as a percentage for either all cells (DAPI) or neurons (MAP2⁺ cells).

Graft volumes were estimated by using Histolab software (Microvision Instruments). In the grafts, cell number was quantified per uniform randomly selected section within the region of interest. Data are presented as mean \pm SEM.

Electrophysiology. See SI Methods.

Statistical Analysis. The data were processed using JMP7 software (SAS). Values are reported as mean and SEM. Comparisons among values for all groups were performed by one-way ANOVA, and Tukey–Kramer multiple-comparison test was used to determine the level of significance.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Stéphane Supplisson, Marc Lechuga, Michael Melkus, and Daniel Stockholm for their assistance. This work was supported in part by additional grants from the European Commission (STEM-HD, FP6), Genopole, and the cluster MediCen Paris Region (IngeCELL). L.A. is the recipient of fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale (Prix Pomaret Delalande 2005), Association Huntington France, and Fédération Huntington Espoir.

- Peschanski M, Bachoud-Levi AC, Hantraye P (2004) Integrating fetal neural transplants into a therapeutic strategy: The example of Huntington's disease. *Brain* 127:1219–1228.
- Bachoud-Levi AC, et al. (2006) Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: A long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 5:303–309.
- Bachoud-Levi AC, et al. (2000) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356:1975–1979.
- Gaura V, et al. (2004) Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. *Brain* 127:65–72.
- Peschanski M, Dunnett SB (2002) Cell therapy for Huntington's disease, the next step forward. *Lancet Neurol* 1:81.
- Sonntag KC, et al. (2007) Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. *Stem Cells* 25:411–418.
- Perrier AL, et al. (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12543–12548.
- Elkabatz Y, et al. (2008) Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22:152–165.
- Roy NS, et al. (2006) Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12:1259–1268.
- Tao W, Lai E (1992) Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* 8:957–966.
- Corbin JG, Rutlin M, Gaiano N, Fishell G (2003) Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* 130:4895–4906.
- Jain M, Armstrong RJ, Barker RA, Rosser AE (2001) Cellular and molecular aspects of striatal development. *Brain Res Bull* 55:533–540.
- Zhang SC, et al. (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:1129–1133.
- Ericson J, et al. (1995) Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81:747–756.
- Machold R, et al. (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39:937–950.
- Watanabe K, et al. (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8:288–296.
- Watanabe K, et al. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25:681–686.
- Laeng P, et al. (2004) The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. *J Neurochem* 91:238–251.
- Sanchez-Pernaute R, et al. (2005) Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyno-1) after transplantation. *Stem Cells* 23:914–922.
- Fricker-Gates RA, White A, Gates MA, Dunnett SB (2004) Striatal neurons in striatal grafts are derived from both post-mitotic cells and dividing progenitors. *Eur J Neurosci* 19:513–520.
- Dunnett SB, Rosser AE (2007) Stem cell transplantation for Huntington's disease. *Exp Neurol* 203:279–292.
- Stern CD (2001) Initial patterning of the central nervous system: How many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2:92–98.
- Li XJ, et al. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:215–221.
- Freeman TB, et al. (2000) Transplantation of human fetal striatal tissue in Huntington's disease: Rationale for clinical studies. *Novartis Found Symp* 231:129–138; discussion 139–147.
- Freeman TB, et al. (2000) Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: Phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13877–13882.
- Ferrari D, et al. (2006) Transplanted dopamine neurons derived from primate ES cells preferentially innervate DARPP-32 striatal progenitors within the graft. *Eur J Neurosci* 24:1885–1896.
- Bellion A, Metin C (2005) Early regionalisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res Bull* 66:402–409.
- Stenman JM, Wang B, Campbell K (2003) Tlx controls proliferation and patterning of lateral telencephalic progenitor domains. *J Neurosci* 23:10568–10576.
- Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423–432.
- Geny C, et al. (1994) Long-term delayed vascularization of human neural transplants to the rat brain. *J Neurosci* 14:7553–7562.

Supporting Information

Aubry *et al.* 10.1073/pnas.0808488105

SI Methods

List of Primary Antibodies Used for *in Vitro* and *in Vivo* Immunocytochemistry. Rabbit polyclonal antibodies were used against nestin, 1:1,000 dilution (AbCam); GFAP, 1:1,000 (Dako); TH, 1:1,000 (Jacques Boy); DARPP32, 1:400 (Santa Cruz Biotechnology); calretinin, 1:1,000 (Chemicon); PAX6, 1:400 (Covance); calbindin, 1:2,000 (Swant); GABA, 1:10,000 (Sigma). Mouse monoclonal antibodies were used for TH, 1:5,000 (Sigma); MAP2, 1:500 (Sigma); NCAM clone Eric1, 1:75 (Santa Cruz Biotechnology); class III tubulin, 1:1,000 (Tuj1; Covance); Ki67, 1:1,000 (Dako); NeuN, 1:400 (AbCam); IB4, 1:200 (Molecular Probes); and GFAP, 1:1,000; HNA, 1:400; and Oct4, 1:400 (all from Chemicon). Appropriate Alexa 488-labeled and Alexa 555-labeled secondary antibodies (Molecular Probes) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) counterstain were used for visualization. Acetylcholinesterase histochemistry was performed as described in ref. 1.

To identify human cells in the rodent brain, we used the human-specific antibody against HNA.

FACS Analyses. Immunophenotyping was carried out by using a FACScalibur and Cell Quest software (Becton Dickinson Biosciences). More than 10,000 events were acquired for each sample and analyzed. Cells were collected with trypsin (trypsin/EDTA; Invitrogen) and resuspended at $2\text{--}5 \times 10^5$ cells in PBS/10% FBS. Cells were stained for 30 min at room temperature with one of the following anti-human antibodies: CD56-

phycoerythrin (PE; clone B159), mouse IgG1-PE isotype control (clone MOPC-21) from Becton Dickinson, or anti-human nestin-PE (clone 196908; R & D Systems). For cytoplasmic staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, washed, and permeabilized with 0.1% saponin for 10 min. Saponin was used in both the staining and washing steps.

Electrophysiology. For electrophysiological recordings, hES-derived striatal neurons were terminally differentiated on polyornithine/laminin-coated culture dishes. Recordings were performed 14 days after replating of striatal progenitors in differentiation medium containing BDNF and dbcAMP. Fetal bovine serum (2%) was added the last 6 days of differentiation. Whole-cell patch-clamp recordings were carried out in the current clamp configuration using a multiclamp 700B amplifier controlled by pCLAMP 10 acquisition software (Molecular Devices) and performed at $\approx 30^\circ\text{C}$. Currents were filtered at 4 kHz and sampled at 20 kHz using a Digidata 1440A (Molecular Devices). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Hilgenberg) and had resistances of 5–7 M Ω . Cells were maintained at a holding potential of -70 mV. Pipettes were filled with an internal solution containing 155 mM potassium gluconate, 4 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 5 mM Mg-ATP, and 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.4 with KOH. Cells were continuously bathed with an external solution containing 140 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 10 mM glucose, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 10 mM Hepes, pH 7.4.

1. Bernard V, Legay C, Massoulié J, Bloch B (1995) Anatomical analysis of the neurons expressing the acetylcholinesterase gene in the rat brain, with special reference to the striatum. *Neuroscience* 64:995–1005.

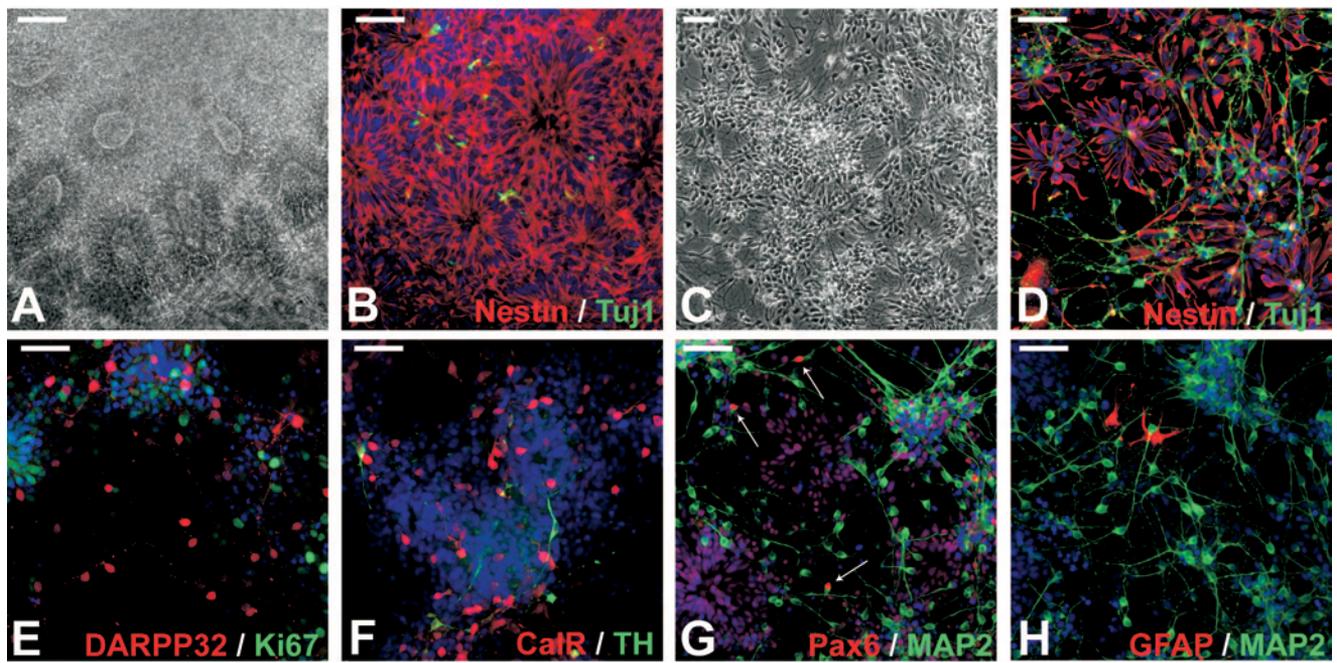


Fig. S1. Neural and neuronal differentiation of hES cells *in vitro*. (A and C). Phase-contrast observations showing the morphology of hES cell-derived neural progenitors organized in rosette structures (stage A, DIV 20) and neuronal precursors (stage D, DIV 45). (B and D) Nestin⁺ (red) rosettes and Tuj1⁺ neurons (green) at stages A and D. (E–H) At stage E, DARPP32⁺ neurons (red) are postmitotic Ki67⁻ (green). Few neurons express TH (green) (F) or Pax6 (red), a cortical marker when coexpressed with MAP2 (green) (arrows) (G); GFAP⁺ (red) cells are hardly ever detected (H). (Scale bars: 100 μ m.)

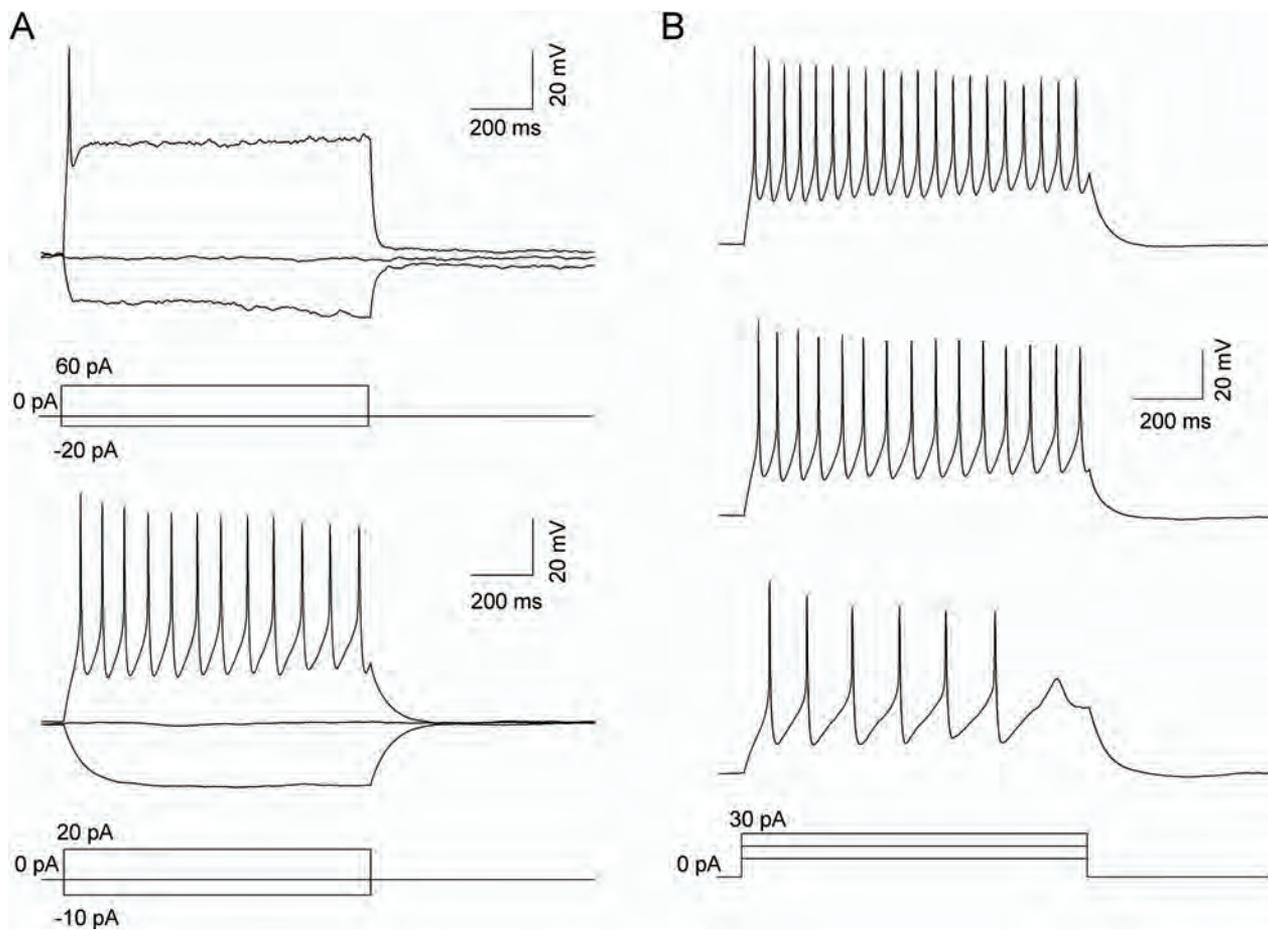


Fig. S2. Representative firing properties of hES cell-derived neurons. (A) Action potentials were elicited by depolarizing current injections, as indicated below recording traces. In five of nine cells, a single-action potential was evoked by injecting depolarizing current (*Upper*), whereas in four of nine cells, rhythmic activity was elicited (*Lower*). (B) Representative change in firing properties as a function of depolarizing current. The frequency of action potentials firing increases with the amplitude of depolarizing current.

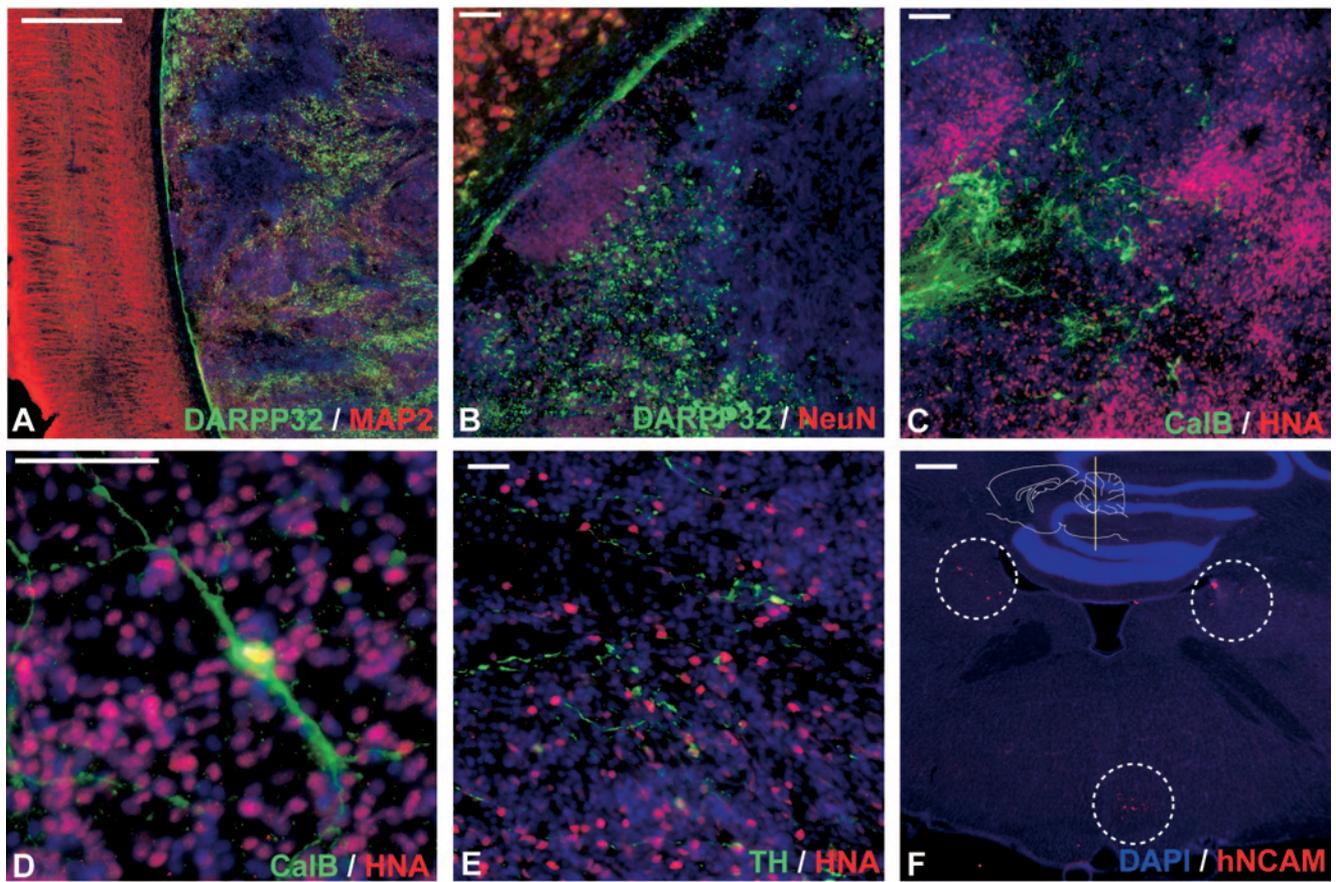


Fig. S3. Phenotypic characterization of the graft 3 months after transplantation. (A–E) Neuronal (MAP2, red; NeuN, red) and striatal (DARPP32, green; CalB, green) or dopaminergic (TH, green) markers. (F) Extensive neuritic outgrowth of human NCAM⁺ (red) cells is detected several millimeters away from the core graft (circles). (Scale bars: A, 1 mm; B, C, E, and F, 100 μ m; D, 50 μ m.)

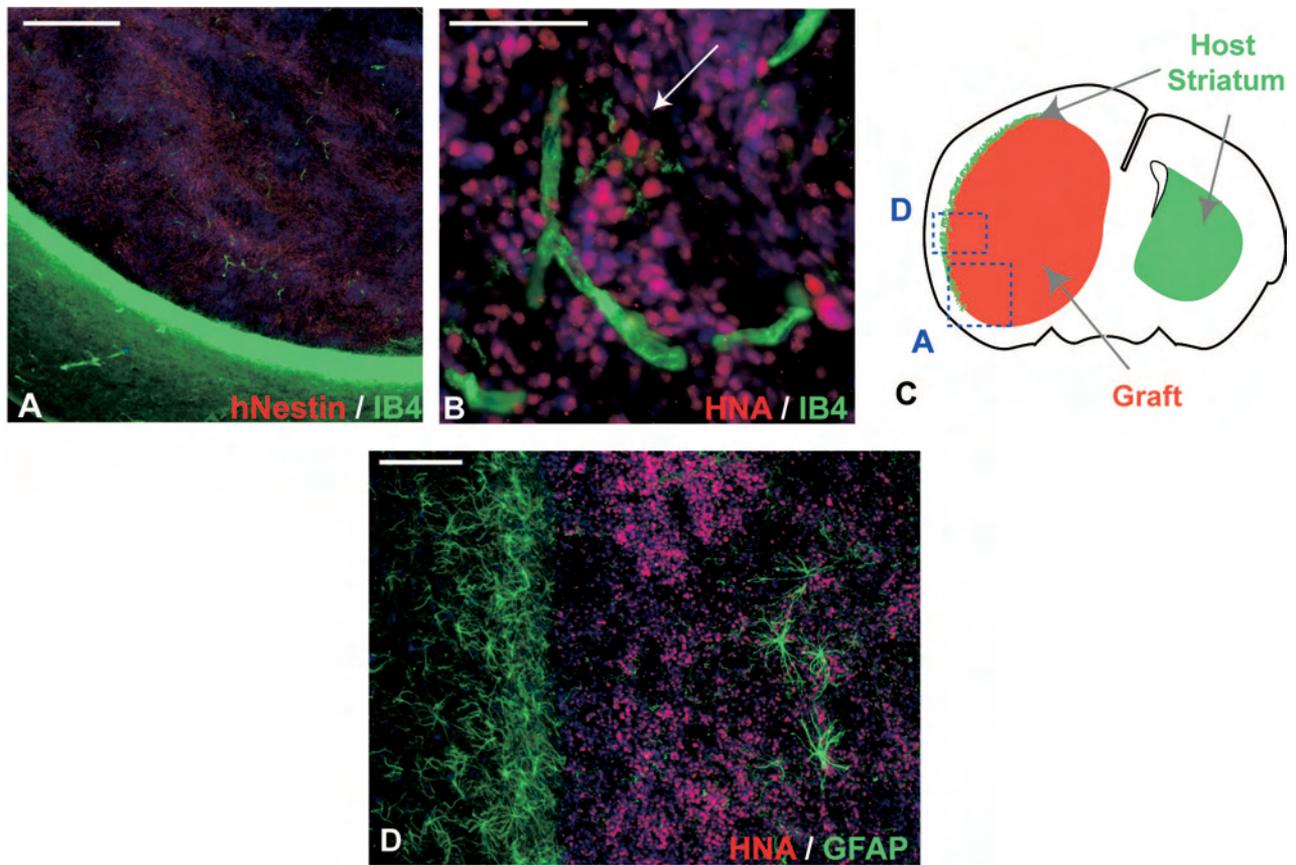


Fig. 54. Numerous host cells in human-to-rat xenografts. (A) IB4⁺ (green) microglia and endothelial cells forming blood vessels. (B) IB4⁺ (green)/HNA⁻ (red) microglia (arrows) and blood vessel. (D) A dense host population of GFAP⁺/HNA⁻ astrocytes (green) at the graft–host interface. (C) Approximate location of A and D images on a schematic coronal section outline showing the graft location (red) and DARPP32⁺ host region (green). (Scale bars: A, 1 mm; D, 200 μ m; B, 50 μ m.)

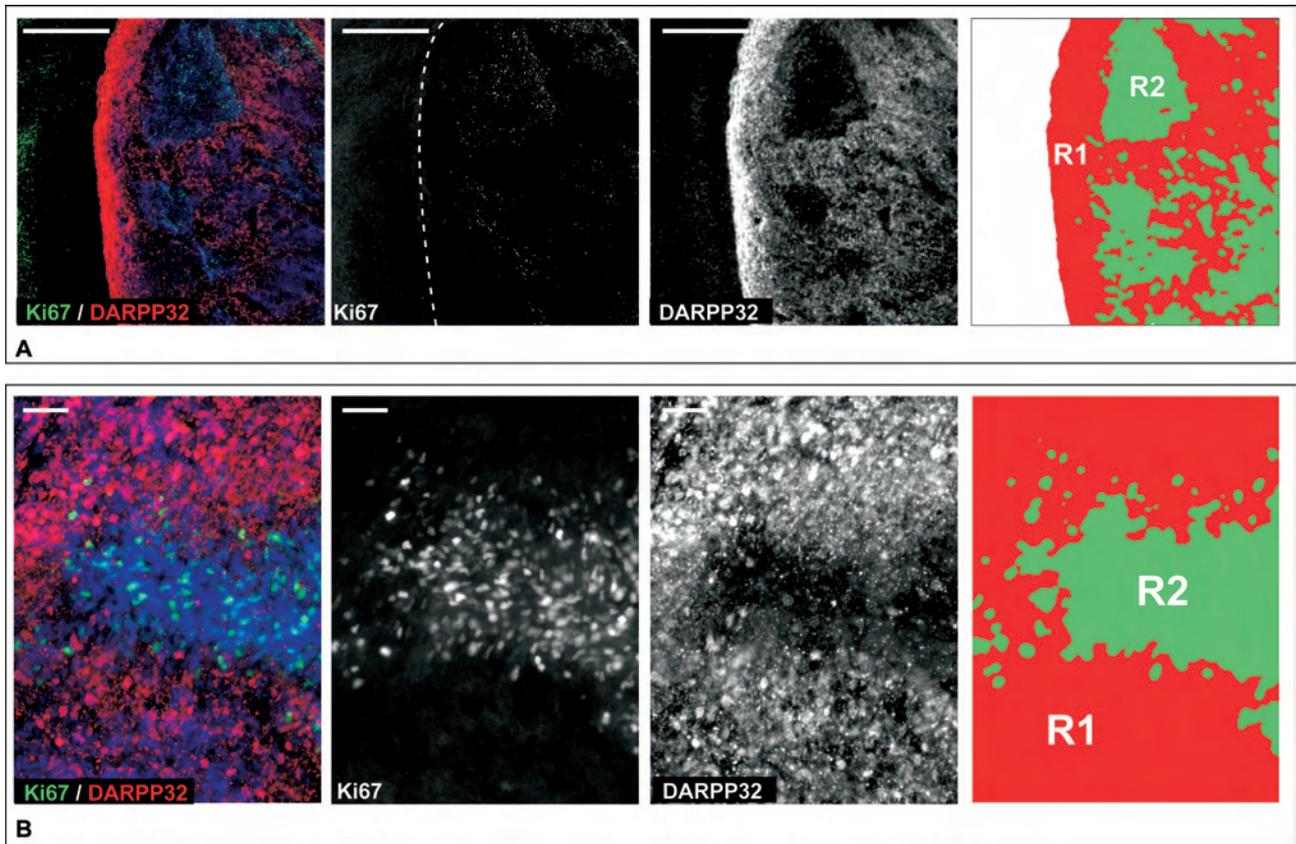
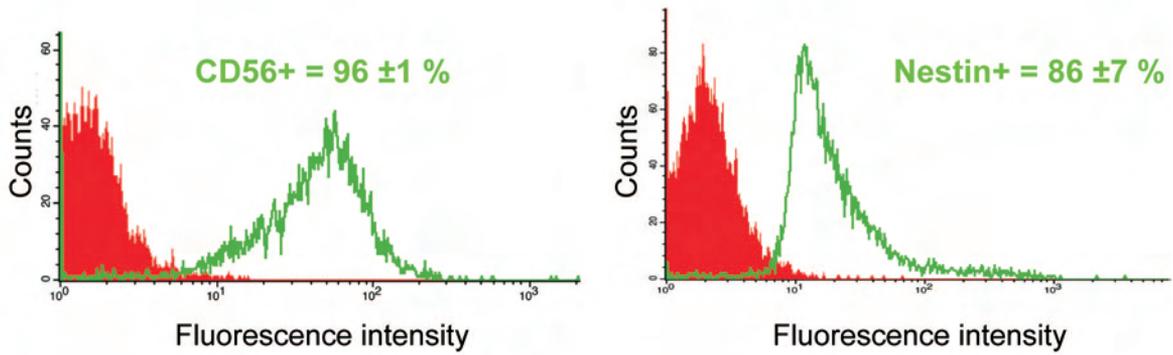


Fig. 55. Mosaic of the two different regions in the 3-month-old graft. (A) Low and (B) high magnification of the two areas containing either DARPP32⁺ neurons (R1, red) or proliferative Ki67⁺ cells (R2, green). (A and B) From left to right: merged pictures of DARPP32 and Ki67 staining, Ki67 staining, DARPP32 staining and a schematic representation outlining the two different regions (R1, red: DARPP32⁺ region, and R2, green: Ki67⁺ region). Dashed line in A shows the limit of the graft. (Scale bars: A, 1 mm; B, 100 μ m.)

A



B

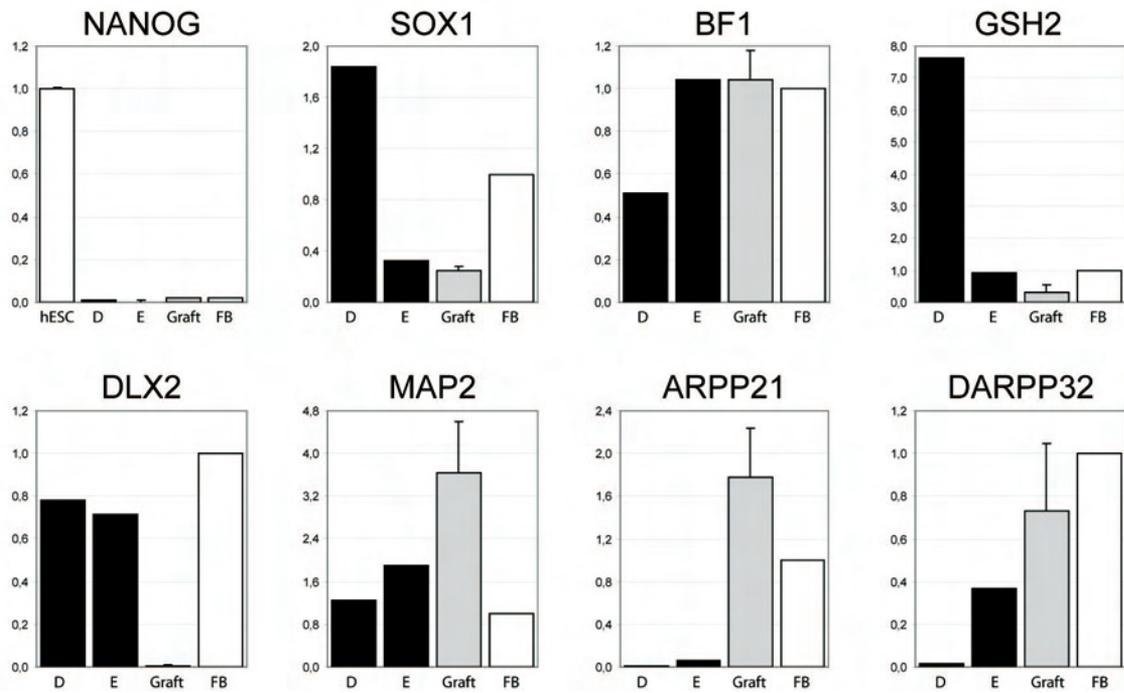


Fig. S6. Flow cytometry and Q-PCR analyses of 3-month-old grafts. (A) Most grafted cells are neural (CD56⁺ left; nestin⁺ right). (B) Real-time Q-PCR analyses of the cells at stage D (just before grafting; D) following neuronal differentiation in culture at stage E (E), and 3 months after transplantation (graft). Fetal brain (FB) or undifferentiated hES cell (hESC) RNAs were used to normalize expression and as a control, respectively.

Table S1. List of Q-PCR primers

mRNA	Primer sequence 5' to 3'
NANOG	CAAAGGCAAACAACCCACTT TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
SIX3	CCGGAAGAGTTGTCCATGTT CGACTCGTGTGTTGTTGATGG
SOX1	ATGCACCGCTACGACATGG CTCATGTAGCCCTGCGAGTTG
MAP2	AAAGCTGATGAGGGCAAGAA GGCCCTGAATAAATTCAT
BF1	TGGGAGATAGGAAAGAGGTGAAAA GCACCAGGCTGTTGATGCT
GSH2	TCACTAGCACGCAACTCCTG CCCTCCTTCTGTGCTTCAC
DLX2	GCCTCAACAACGTCCTTACT TCACTATCCAATTCAGGCTCA
DARPP32	CCTGAAGGTATCAGGCAGT GGTCTTCACTTGGTCCTCA
GAD67	CCAAGGTGCTGGACTTTCAT AAATCGAGGATGACCTGTGC
CALB1	TCAGGACGGCAATGGATACA AAGAGCAAGATCCGTTCCGGT
Cyclophilin A	TGTGCCAGGGTGGTGACTT TCAAATTTCTCCGTAGATGGACTT

2. Optimisation du protocole d'induction neurale : produire plus efficacement des précurseurs neuraux d'une manière plus directement applicable aux essais cliniques.

Les résultats précédemment décrits démontrent notre capacité à produire *in vitro* des populations neurales et neuronales, enrichies en cellules possédant un phénotype striatal, à partir de cellules hES. Malgré ces résultats très prometteurs, il nous est apparu que plusieurs aspects, concernant plus particulièrement l'étape d'induction neurale, limitaient l'efficacité et l'application thérapeutique de notre protocole. Comme nous l'avons vu précédemment, repose sur la co-culture des cellules hES avec des cellules stromales murines de moelle osseuse (MS5). Or, ce système d'induction neurale s'est révélé très peu pratique et difficilement reproductible, du fait notamment de l'utilisation de ces cellules stromales. Pendant la dernière partie de ma thèse, j'ai donc exploré d'autres méthodes de spécification neurale des cellules hES, dans la perspective de remplacer avantageusement notre méthode précédente. Cette exploration s'est faite en collaboration étroite avec le Dr Alexandra Benchoua, chercheur post-doctorant de l'équipe. Le résultat, encore préliminaire de cette collaboration, est le développement d'un protocole d'induction neurale permettant la production robuste, rapide et sans étape de co-culture, de cellules neuroépithéliales en rosette. Certains aspects de ce nouveau protocole d'induction neurale ont fait l'objet d'une déclaration d'invention au près des services de propriétés industriels de l'Inserm (Inserm-transfert) et devrait donner lieu à un dépôt de brevet.

2.1. Induction neurale des cellules hES en milieu « N2B27 » *in vitro*.

Afin d'élaborer un nouveau protocole d'induction neurale plus efficace et robuste des cellules hES, nous nous sommes appuyés sur une étude publiée en 2003 et réalisée sur des ES murines (mES) (Ying and Smith, 2003). Le système utilisé dans cette étude permet une induction neurale des cellules mES en monocouche adhérente et en milieu défini sans apport de facteurs extrinsèques. Ces travaux ont démontré la faisabilité d'une induction neurale des cellules mES en l'absence de cellules nourricières ou de formation de corps embryoïdes. Le transfert de cette technique aux cellules hES fut publié en 2006, par l'un des membres de l'équipe, le Dr Alexandra Benchoua (Lowell et al., 2006). Les travaux préliminaires présentés ci-dessous ont été menés sur la lignée de cellules souches embryonnaires humaines H9. Brièvement, les cellules hES sont isolées mécaniquement des cellules nourricières (STO) puis transférées dans des boîtes de culture traitées avec de la polyornithin et de la laminine en milieu « N2B27 ». Dans ces conditions, après 8 à 10 jours de culture *in vitro* plusieurs populations cellulaires morphologiquement distinctes peuvent être identifiées (Figure 1C et D). Parmi celles-ci on note notamment l'apparition de cellules neuroépithéliales organisées en rosettes neurales (Fig. 1D). L'analyse immunocytochimique de ces cultures cellulaires révèle la présence de cellules hES indifférenciées (Oct4+/Sox2+), de cellules neurales (Oct4- /Sox2+/Pax6+), et de cellules ni

neurales ni indifférenciées (Oct4-/Sox2-/Pax6-) (Figure 1E-F). Afin de quantifier ces populations cellulaires, nous avons analysé l'expression des marqueurs Oct4 et Sox2 simultanément par FACS. Les résultats obtenus montrent que 22 % des cellules co-expriment ces deux facteurs de transcription, 47 % sont Oct4- /Sox2+, et 30 % sont Oct4-/Sox2- (Figure 1G). Ces résultats indiquent que les populations cellulaires obtenues après 8 jours de culture en milieu « N2B27 » sont globalement très hétérogènes, même si des cellules neurales y sont clairement identifiables. De nombreuses cellules hES sont encore présentes après 8 jours de culture et seulement la moitié des cellules totales ont été spécifiées vers la voie neurale. Ces premiers résultats ont confirmé que le protocole fondé sur la culture en monocouche adhérente en milieu « N2B27 » des cellules hES ne permet pas d'induire la spécification neurale de ces cellules de manière efficace.

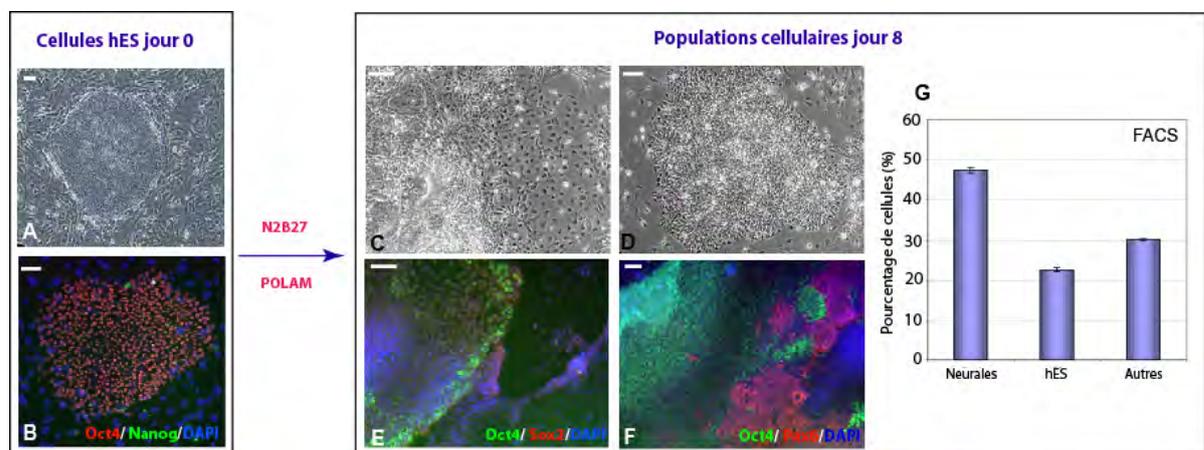


Figure 1 : Analyse morphologique et phénotypique des cellules issues de cellules hES après 8 jours de culture en milieu « N2B27 ». (A, C et D) Images en contraste de phase d'une colonie de cellules hES (A), et des populations cellulaires obtenus après 8 jours de culture, permettant d'identifier une colonie de cellules neuroépithéliales organisées en rosettes (D) et des cellules morphologiquement distinctes des cellules neurales (C). (B, E et F) Immunocytochimie des marqueurs Oct4, Nanog, Pax6 et Sox2. Barres d'échelle = 100 μ m. (G) Quantification par FACS du nombre de cellules exprimant uniquement le marqueur Sox2 (cellules neurales), co-exprimant les marqueurs Oct4 et Sox2 (cellules hES), et n'exprimant ni l'un ni l'autre (autres) (n=5).

2.2. Effets des inhibiteurs Noggin et SB431254 sur l'induction neurale des hES *in vitro*.

Nous avons par conséquent cherché quelles conditions nous permettraient d'améliorer ce protocole. De nombreuses études du développement neural réalisés dans divers paradigmes expérimentaux, animaux (ovipares et mammifères non primates) ou cellulaires (cellules mES et hES), ont permis d'identifier plusieurs facteurs ou voies de signalisation capables de moduler l'induction neurale. Parmi ceux-ci on compte les FGFs (Fibroblast growth factor), la voie de signalisation Wnt, l'acide rétinolique, Notch, et des membres de la famille des TGF β tels que les BMPs (Bone morphogenetic Protein) et la voie Activine/Nodal (Gaulden and Reiter, 2008). Le rôle inhibiteur des

BMPs dans le processus d'induction neurale apparait particulièrement important et fait actuellement consensus. De nombreux travaux ont en effet démontrés que l'inhibition des BMPs par des antagonistes naturels tels que Noggin était essentiel au bon déroulement du développement du système nerveux central *in vivo* (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997 ; Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002). Des études rapportent également une amélioration de la spécification des cellules hES vers la voie neurale en présence de la protéine Noggin, avec toutefois une efficacité limitée (Gerrard et al., 2005 ; Itsykson et al., 2005 ; Sonntag et al., 2007). D'autres membres de la superfamille des TGF β , Activin et Nodal, jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'état indifférencié des cellules hES (Vallier et al., 2005 ; James et al., 2005 ; Xiao et al., 2006). Leur inhibition par des antagonistes naturels (Lefty ou Cerberus) ou chimiques (SB431542) semble promouvoir l'apparition de marqueurs du neuroectoderme (Sox1 et Nestine), à partir de cellules mES ou hES (Watanabe et al., 2005 ; Smith et al., 2008). L'inhibition des voies BMPs et Activin/Nodal apparait ainsi jouer un rôle essentiel dans l'induction neurale. Nous avons donc étudié l'effet de deux de leurs inhibiteurs respectifs Noggin et SB431542 sur la transformation phénotypique des cellules hES en précurseurs neuraux.

Afin de réaliser cette étude les cellules hES sont, tel que décrit précédemment, isolées mécaniquement des cellules nourricières STO puis transférées dans des boîtes de culture traitées avec de la polyornithin et de la laminine en milieu N2B27 sans ou supplémenté avec 400ng/ml de Noggin et/ou 20 μ M de SB431542. Afin d'étudier le phénotype des populations cellulaires obtenues 8 à 10 jours après culture dans ces conditions nous avons analysé l'expression de différents marqueurs, cités précédemment, par immunocytochimie, PCR quantitative et FACS. L'analyse immunocytochimique des cultures cellulaires traitées uniquement avec la protéine Noggin révèle la présence de cellules hES indifférenciées (Oct4+/Sox2+), de cellules neurales (Oct4- /Sox2+ et Oct4-/Pax6+), et de cellules ni neurales ni indifférenciées (Oct4-/Sox2- et Oct4-/Pax6-) (Figure 2A et B). La quantification par FACS de la proportion respective de ces population, par l'analyse simultanée des marqueurs Oct4 et Sox2, nous a permis de déterminer qu'en présence de Noggin 60 % des cellules sont neurales (Oct4-/Sox2+), 27 % sont des cellules hES encore non différenciées (Oct4+/Sox2+), et 12 % sont d'un autre phénotype (Oct4-/Sox2-) (Figure 2H). Les résultats, obtenus après culture des cellules en présence de SB431542 uniquement, démontrent que 1,5 % co-expriment les deux facteurs de transcription Oct4 et Sox2 (cellules hES non différenciées), 80% sont Oct4-/Sox2+ (cellules neurales), et 18 % sont Oct4-/Sox2- (Figure 2H). Ces données indiquent une forte diminution de la présence de cellules hES lorsque les cellules sont traitées avec du SB431542. Cette observation a été confirmée par les analyses immunocytochimiques (Figure 2C et D). Enfin, la culture des cellules en présence des deux antagonistes, Noggin et SB431542 permet d'obtenir seulement 0,52 % de cellules hES, 90% de cellules neurales, et 9 % de cellules ayant un autre phénotype (Figure 2H). La combinaison des deux molécules semble ainsi permettre d'obtenir des populations cellulaires beaucoup plus homogènes et très enrichies en cellules neurales. Ceci est confirmé par immunocytochimie (Figure 2E et F). L'analyse transcriptionnelle des marqueurs de cellules indifférenciées OCT4 et NANOG, et, des

marqueurs de cellules neurales PAX6 et SOX1 démontre une augmentation de l'expression des marqueurs neuraux et une diminution des marqueurs de cellules indifférenciées en présence de Noggin et SB431542, en comparaison des autres conditions (Figure 2 G).

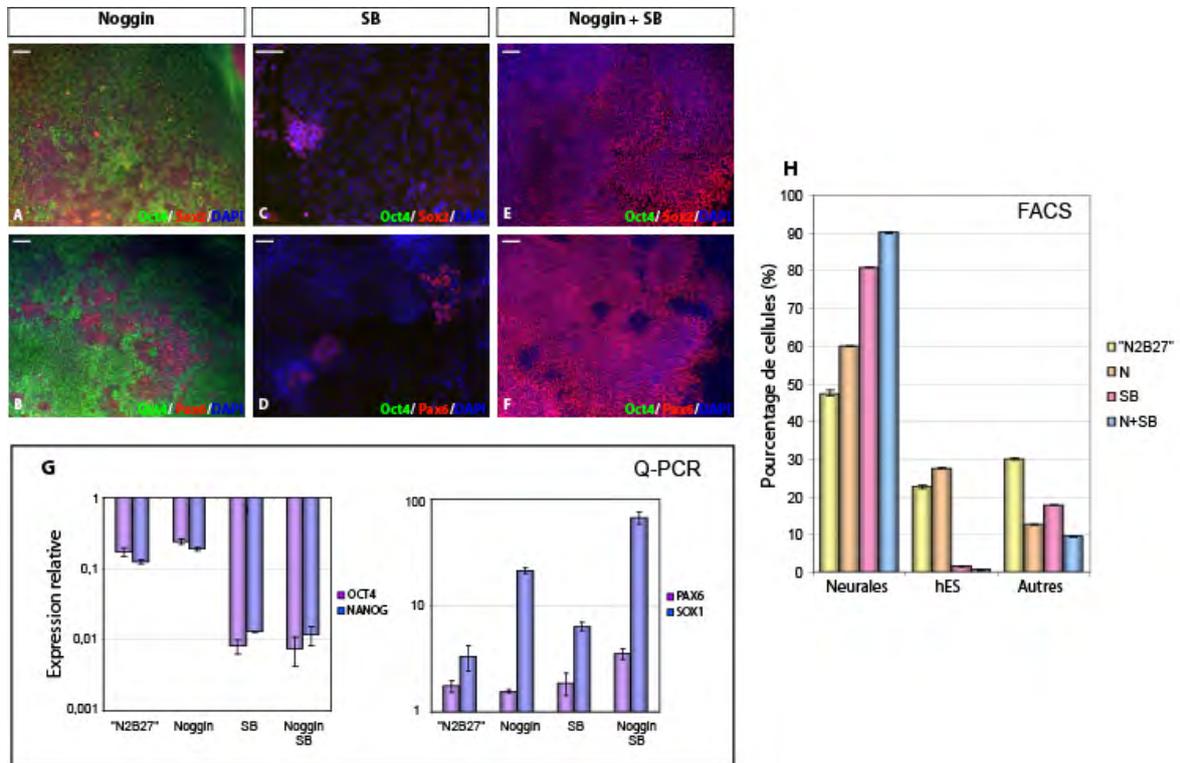


Figure 2 : Analyses phénotypiques et transcriptionnelles des cellules issues de cellules hES après 8 jours de culture en milieu « N2B27 » supplémenté avec Noggin (N), ou SB431542 (SB), ou Noggin et SB. (A-F) Immunocytochimie des marqueurs Oct4, Pax6 et Sox2. Barres d'échelle = 100 µm. (G) Analyse de l'expression relative des transcrits OCT4, NANOG, PAX6 et SOX1, normalisée à celle des cellules hES (n=3). (H) Quantification par FACS du nombre de cellules exprimant uniquement le marqueur Sox2 (cellules neurales), co-exprimant les marqueurs Oct4 et Sox2 (cellules hES), et n'exprimant ni l'un ni l'autre (autres) (n=5).

2.3. Conclusion.

L'ensemble de ces résultats préliminaires semblent ainsi indiquer que la culture des cellules hES en milieu « N2B27 » complémenté avec les deux inhibiteurs respectifs de la voie BMP et de la voie Activine/Nodal, Noggin et SB431542, permettent d'induire de manière efficace et reproductible la spécification des cellules hES vers la voie neurale. Ce protocole n'a à ce jour et à notre connaissance, jamais fait l'objet d'une publication. Le résultat final de cette technique est la production de cellules neurales en rosettes, qui semblent très proches voir identiques à celles obtenues après induction neurale de cellules hES sur cellules MS5. Si cette analogie est vérifiée, il semble totalement envisageable de substituer cette nouvelle technique à la première étape du protocole que nous avons décrit précédemment (Aubry et al., 2008).

Discussion et perspectives

1. Discussion

L'identification d'une source cellulaire alternative aux tissus fœtaux, est l'enjeu majeur du développement clinique de la thérapie cellulaire de la maladie de Huntington (MH). La découverte des cellules souches embryonnaires humaines (hES), il y a plus de dix ans, a ouvert de très intéressantes perspectives dans ce domaine, qui cependant reste encore entièrement à valider et à mettre en application. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte scientifique. Au cours de ces années de recherche, j'ai ainsi commencé à évaluer la pertinence de l'utilisation des cellules hES, et plus précisément de leurs dérivés striataux, pour la thérapie substitutive de la MH.

1.1. Des cellules souches embryonnaires humaines aux populations striatales : Clefs de lecture de la production *in vitro* de greffons pour la thérapie cellulaire de la MH.

Un des enjeux majeurs d'une approche de thérapie cellulaire est de disposer de cellules adéquates, capables de remplacer fonctionnellement les cellules défectueuses ou détruites, en raison de la pathologie. Logiquement, des cellules exogènes dont le phénotype correspond à celui des cellules lésées, ou étant déterminées à acquérir ce phénotype, ont *a priori* les meilleures capacités à s'intégrer aux tissus de l'hôte, et surtout à rétablir les fonctions perdues. L'utilisation des cellules hES en thérapie substitutive n'est envisageable que si leur différenciation vers le lignage cellulaire d'intérêt est maîtrisée. Cette étape incontournable a été la première tâche de mon travail de recherche. Dans la MH, la dégénérescence affecte tout d'abord les neurones GABAergiques moyens épineux (MSN) du striatum (DARPP-32+). C'est la substitution de ce phénotype cellulaire précis qui est ciblé lors des essais cliniques de thérapie cellulaire de la MH. Dans la première partie de ma thèse, j'ai donc développé et validé un protocole définissant les conditions dans lesquelles les cellules hES peuvent acquérir un phénotype de MSN.

Le système d'induction neurale que nous avons utilisé, précédemment décrit dans la littérature, est basé sur la co-culture des cellules hES avec des cellules MS5 (Perrier 2004). Il m'a permis d'obtenir, à partir de cellules hES, une population de cellules neuroépithéliales organisées en rosettes neurales. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de marqueurs neuraux (Pax6, *SOX1*), et sont semblables à celles décrites depuis plusieurs années dans la littérature (Zhang et al., 2001 ; Perrier et al., 2004 ; Elkabetz et al., 2008). Mon analyse du profil transcriptionnel des cellules hES, au cours de leur spécification en cellules neurales, montre un pic d'expression du marqueur *SIX3* (facteur de transcription exprimé précocement dans la partie antérieure du système nerveux central (SNC) en développement) ainsi qu'un début d'expression du marqueur *BFI* (facteur de transcription spécifique du télencéphale). Ces résultats indiquent que les cellules neuroépithéliales que nous obtenons adoptent par défaut, *i.e.* en l'absence de tous signaux extrinsèques inducteurs, un phénotype rostral. Cette

analyse est conforme avec ce que nous savons de la neurogenèse chez les mammifères, et concorde également avec plusieurs travaux réalisés *in vitro* à partir de cellules mES et hES. En effet, au cours de l'élaboration du SNC les cellules neuroépithéliales de la plaque neurale, se développent en premier lieu dans la partie antérieure de l'embryon (Stern, 2001 ; Sasai and De Robertis, 1997). Seulement plus tard et sous l'action de morphogènes, elles peuvent être spécifiées vers les régions plus caudales (Sasai and De Robertis, 1997). Un processus similaire a été décrit *in vitro* lors d'études de la spécification neurale des cellules hES. Plusieurs expériences ont ainsi mis en évidence l'identité rostrale par défaut, caractérisée notamment par l'expression de *BFI*, des cellules neurales en rosettes. Elles ont également démontré la possibilité sous l'action de signaux extrinsèques précis, tels que l'acide rétinoïque, de « caudaliser » l'identité régionale initiale de ces cellules, afin de produire par exemple des précurseurs de motoneurones spinaux (Pankratz et al., 2007), stem cells, directed neural diff of hESC via an obligd anterior stage (Lee et al., 2007 ; Elkabetz et al., 2008). L'ensemble de ces données valide notre interprétation du phénotype télencéphalique par défaut, des cellules neurales en rosettes produites à partir de cellules hES. Nos travaux démontrent ainsi notre capacité à reproduire approximativement *in vitro*, les premières étapes du développement du SNC.

Une fois les cellules hES spécifiées en précurseurs neuraux, l'étape cruciale de notre protocole a été d'orienter le phénotype de ces précurseurs vers celui des cellules du LGE, *i.e.* la région ventrale du télencéphale embryonnaire à l'origine de la majorité des MSN, et d'une partie des interneurones striataux. Nous avons ainsi démontré que l'ajout de SHH et DKK1 (un inhibiteur de la voie Wnt) dans nos cultures de cellules neuroépithéliales, augmentait significativement l'expression des transcrits *GSH2* et *DLX2*. Ceci indique un enrichissement de nos cultures en cellules du télencéphale ventral. Comme cela a été abordé dans l'introduction, au cours de la sous-régionalisation du télencéphale, l'activation des voies de signalisation Wnt et Shh ont deux effets opposés. La première participe à la « dorsalisation » du télencéphale tandis que la seconde a un effet « ventralisant ». *In vitro*, cet antagonisme des voies Wnt et Shh lors de la régionalisation des précurseurs neuraux, est décrit par deux études menées par Watanabe et ses collaborateurs (Watanabe et al., 2005 ; Watanabe et al., 2007). Ces travaux, réalisés avec des cellules ES murines (mES) et humaines, ont montré une augmentation de l'expression du marqueur du subpallium *Nkx2.1*, dans des cultures de précurseurs télencéphaliques (*Bf1+*) traitées par la protéine Shh. Au contraire, lorsque ces derniers sont cultivés en présence d'un agoniste de la voie Wnt, les auteurs observent une élévation de l'expression des marqueurs du pallium. L'ensemble de ces données ainsi que nos résultats, indiquent qu'il est possible de reproduire *in vitro*, du moins partiellement, la spécification sous-régionale du télencéphale, en activant certaines voies de signalisation clefs par des molécules extrinsèques. Cependant, au cours du développement la différenciation de la plaque neurale en SNC est le fruit de régulations extrêmement fines et complexes. Celles-ci dépendent en partie du niveau et de la chronobiologie d'expression de morphogènes spécifiques. L'induction d'une identité striatale de nos cultures étant loin d'être

complète, des améliorations devront être apportées à cette étape de notre protocole. Celles-ci nécessiteront probablement une étude plus approfondie de différentes combinaisons de doses et de temps d'exposition d'agonistes et d'antagonistes des voies Shh et Wnt, afin d'augmenter la proportion de progéniteurs de neurones striataux dans nos cultures. L'élément clef de cette partie de mes travaux de thèse, reste néanmoins la démonstration de la possibilité d'infléchir l'identité régionale des cellules neurales issues de cellules hES, vers un phénotype striatal, par l'application de facteurs extrinsèques pertinents.

Au cours de notre étude *in vitro*, la production de neurones post-mitotiques, possédant des propriétés électrophysiologiques simples, indique notre capacité à récapituler en culture les grandes lignes de la neurogenèse du télencéphale humain. Indépendamment de nos objectifs de recherche relatifs à la maladie de Huntington, notre protocole nous est apparu être un outil potentiellement utile, à l'étude du rôle de certains gènes dans la neurogenèse humaine. Dans le cadre d'une collaboration avec Jérôme Bonnefont du laboratoire de Karl-Heinz Krause à Genève, j'ai mis en pratique cette idée en participant à l'analyse du rôle d'un cluster de gène, *RFPL1,2,3* (*Ret finger protein-like 1,2,3*), dans le développement du néocortex chez l'homme. L'analyse de l'expression des gènes *RFPL1,2,3* pendant la différenciation neuronale des cellules hES, a renforcé l'hypothèse d'une divergence fonctionnelle de ces gènes au cours de l'histoire évolutive de l'Homme. Plus particulièrement il apparaît suite à cette étude, que les gènes *RFPL1,2,3* jouent sous le contrôle du gène *PAX6*, un rôle dans les étapes précoces de la corticogenèse humaine, contrairement à d'autres espèces (Bonnefont et al., 2008 – Annexe 1). Comme le démontre cette collaboration fructueuse, notre capacité à recréer *in vitro* certains aspects de la neurogenèse humaine, présente un intérêt pour la recherche fondamentale. La différenciation neurale et neuronale des cellules hES en culture, constitue ainsi un paradigme expérimental de choix pour l'étude du développement du SNC, et de la fonction de ses composantes cellulaires. Il semble en effet désormais possible d'étudier de manière plus aisée, les mécanismes cellulaires, moléculaires, génétiques et épigénétiques, essentiels à la spécification, à la détermination, et au fonctionnement, des cellules du télencéphale humain.

Le résultat majeur de mes études *in vitro* est toutefois l'observation d'une différenciation des cellules hES en neurones striataux. Entre un tiers et la moitié des neurones produits synthétisent du GABA et expriment la protéine DARPP-32. Ce résultat valide clairement la détermination striatale d'au moins une partie de la population cellulaire, dite « enrichie » en progéniteurs striataux, obtenue en suivant notre protocole. Plusieurs publications antérieures à nos travaux, ont décrit la différenciation des cellules mES ou hES en neurones GABAergiques. Cependant, aucune n'a démontré l'expression de la protéine striatale DARPP-32 parmi ces neurones (Zhang et al., 2001 ; Reubinoff et al., 2001 ; Sarichelou et al., 2008) . A l'inverse, les travaux plus récents de Watanabe et ses collaborateurs (cités précédemment et relatifs à la spécification des cellules ES en progéniteurs du

télocéphale ventral), ne font pas état du potentiel de différenciation neuronale de leurs progéniteurs « ventralisés ». Cela ne permet donc ni de juger du degré d'engagement « striatal ou ventral » de ces progéniteurs, ni de préjuger des types de neurones que ces cellules auraient pu engendrer. Le fruit de nos expériences *in vitro* constitue donc, à notre connaissance, la première démonstration d'une différenciation de cellules pluri/multipotentes auto-renouvelables en progéniteurs et en neurones striataux GABAergiques.

Nos populations cellulaires, obtenues au stade le plus différencié (stade E), présentent par ailleurs d'autres caractéristiques phénotypiques, également importantes à souligner. Tout d'abord, plus de 60% de ces cellules expriment encore des marqueurs de cellules neurales immatures prolifératives, tels que Nestine et Pax6. Ce résultat met clairement en exergue l'inachèvement de la différenciation neuronale de nos cultures. Il révèle en outre un manque substantiel de synchronisation de l'état de différenciation de nos cellules en culture. Ceci pourrait être une des explications au problème de surprolifération observé dans nos greffons. Cet aspect sera abordé plus loin dans la discussion. Ensuite, une proportion très importante de neurones exprimant la calrétinine (55%) est observée dans nos cultures terminales. Elle pourrait s'expliquer par l'origine embryonnaire de ce type de neurones. Au cours de la neurogenèse du striatum certains interneurons naissent dans une région ventrale du télencéphale : le MGE, voisine immédiate du LGE (Marin et al., 2000). Ces deux territoires des éminences ganglionnaires expriment, de manière parfois difficilement distinguable, certains facteurs de transcription. Ainsi, bien que *Gsh2* soit plus fortement exprimé dans le LGE, il peut également, de même que *Dlx2*, être exprimé dans le MGE (Jain et al., 2001 ; Panganiban and Rubenstein, 2002 ; Corbin et al., 2003). L'enrichissement qualifié par nous de « striatal », visualisé par l'augmentation de l'expression de *Gsh2* et *Dlx2* dans l'étape de spécification régionale de notre protocole, n'est donc pas incompatible avec une spécification concomitante des cellules hES en cellules du LGE et du MGE. Mon hypothèse est que les progéniteurs ayant acquis une identité de cellules de LGE génèrent principalement des MSN (DARPP32+), tandis que ceux ayant acquis un phénotype de cellule de MGE produisent des interneurons calrétinine. Ceci expliquerait ainsi les deux principales populations neuronales (DARPP-32+, et calrétinine+) identifiées dans nos cultures différenciées. Dans le contexte particulier de la thérapie cellulaire de la MH, le fait d'avoir un greffon constitué de cellules du LGE et du MGE ne constitue pas à priori un handicap, bien au contraire. L'utilisation, au cours d'essai clinique de thérapie cellulaire de la MH, de neuroblastes fœtaux humains issus d'éminences ganglionnaires entières (LGE et MGE), a permis des améliorations cliniques sur le long terme (Bachoud-Levi et al., 2000a ; Bachoud-Levi et al., 2006). Par conséquent, la présence de cellules dérivées du MGE dans nos cultures, si elle était avérée, ne constituerait pas à priori un obstacle majeur.

L'ensemble de mes études *in vitro* a ainsi permis d'établir un protocole, permettant de générer le type de population striatale *a priori* recherché pour la thérapie cellulaire de la maladie de Huntington.

Ce résultat, bien qu'incontournable, n'a été que la première étape de l'exploration du potentiel thérapeutique des cellules hES pour le traitement de cette pathologie.

1.2. Greffons neuraux issus de cellules hES : maturation striatale *in vivo* et perspectives thérapeutiques.

Un deuxième aspect de mon travail de recherche, à consister en l'étude du « comportement » *in vivo*, des progéniteurs neuronaux dérivés de cellules hES. Pour ce faire, nous nous sommes placés dans un contexte lésionnel mimant la neurodégénérescence striatale observée dans la MH, chez le rat. Notre premier objectif a été d'identifier un stade de différenciation *in vitro*, produisant un greffon optimal en vue d'une application thérapeutique. Nos analyses montrent que les greffons issus des stades de différenciation *in vitro* les plus précoces (stades A et B), forment dans la majorité des cas des tératomes. Les tératomes sont des structures hétérogènes constituées de cellules issues de plus d'un feuillet embryonnaire. Les cellules ES, lorsqu'elles sont implantées dans un site ectopique hors du contexte embryonnaire, forment des tératomes (Thomson et al., 1998). L'observation de ce type de structures dans nos greffons, suggère donc le maintien de cellules hES bien au delà des premiers jours d'induction neurale. Ce résultat confirme les données issues de la littérature, relatives à la greffe de précurseurs neuraux immatures, dérivés de cellules hES et obtenus par une autre méthode de différenciation (Brederlau et al., 2006). L'observation de tératomes, corrobore notre hypothèse évoquée plus haut, d'un certain manque de synchronisation de l'état de différenciation de nos populations cellulaires. Ce manque de synchronisation est dans le contexte d'une application clinique un facteur de risque très important. Ce risque de formation de tératomes, induit par la présence résiduelle de cellules indifférenciées dans le greffon, a maintes fois été mentionné dans la littérature. Dans notre cas, cela ne semble pas cependant être un obstacle insurmontable. En effet, les greffons plus matures que nous avons testés n'ont induit aucun tératome. A l'inverse, les greffons au stade le plus différencié que nous avons testé (stade E) survivent globalement mal après transplantation. Ceci pourrait s'expliquer par une forte mortalité au cours de la procédure d'injection, probablement consécutive à leur plus grande « fragilité ». Cette observation a déjà été décrite pour la greffe des neurones post-mitotiques d'origine fœtale. L'analyse des transplantations de greffons obtenus aux stades intermédiaires de notre protocole, indique que les cellules différenciées entre 45 et 59 jours *in vitro* (stade D), forment les greffons les plus prometteurs en termes d'application thérapeutique. Malgré la relativement courte période de maturation *in vivo* (moins de 6 semaines), ces greffons contiennent de petites régions de neurones qui expriment les protéines DARPP-32 et calbindine, deux marqueurs de neurones striataux de projections. Ce résultat est particulièrement intéressant, en comparaison de ceux rapportés par le peu d'études ayant utilisées des progénies neurales issues de cellules ES, dans un modèle de la MH. Seulement deux articles, publiés à dix ans d'écart par Dinsmore et collaborateurs. et Dihné et collaborateurs, ont démontré la différenciation de cellules ES de souris en neurones GABAergiques, six semaines après greffe dans un striatum lésé de rongeur

(Dinsmore et al., 1996 ; Dihne et al., 2006). Une seule autre publication décrit à ce jour la transplantation de précurseurs neuraux issus de cellules hES, dans des rats modèles phénotypiques de la MH (Song et al., 2007). Dans ces trois études, les auteurs de ces travaux bien qu'ayant démontré la présence de neurones GABAergiques dans leurs greffons, n'identifient en revanche aucun neurone exprimant la protéine DARPP-32.

Les études expérimentales puis cliniques de thérapie cellulaire de la MH ont montré que des neuroblastes issus des éminences ganglionnaires, disséquées à un stade de développement fœtal compris entre 7,5 et 9 semaines, procurent les meilleurs effets thérapeutiques (Naimi et al., 1996 ; Bachoud-Levi et al., 2000a ; Bachoud-Levi et al., 2006). Il est intéressant de noter que le stade D (stade optimal dont la durée de différenciation *in vitro* est comprise entre 6,5 et 8,5 semaines), correspond grossièrement au stade développemental actuellement utilisé en clinique. Ceci semble suggérer, pour la différenciation neurale et striatale, une concordance entre la chronobiologie des cellules souches embryonnaires au cours du développement embryonnaire, et celle de ces mêmes cellules dans un contexte artificiel *in vitro*.

Au cours de nos expériences de xéno greffes à long terme, nous avons pu détecter un grand nombre de neurones striataux DARPP-32+ humains au sein des greffons. Ceci constitue à notre connaissance, la première démonstration d'une maturation striatale *in vivo*, de progéniteurs neuronaux dérivés de cellules hES. Ce résultat démontre clairement l'engagement striatal, et le fort potentiel de différenciation *in vivo*, des progéniteurs neuronaux greffés. Comme déjà mentionné dans l'introduction, les expériences d'allogreffes de neuroblastes fœtaux chez le rat ont montré que la proportion de zones-P (zones contenant notamment des cellules exprimant la protéine DARPP-32) est déterminante pour l'établissement des connexions fonctionnelles et l'observation d'améliorations comportementales (Nakao et al., 1996 ; Fricker et al., 1997). Dans le cas des xéno greffes de tissus fœtaux humains, la proportion de zones-P au sein des greffons est relativement faible, 30 à 50 %, en comparaison de celle observée au cours d'allogreffe (Grasbon-Frodl et al., 1996 ; Naimi et al., 1996). La fonctionnalité de greffons humains étant par ailleurs très difficile à évaluer chez le rat, seules les études d'allogreffe chez le singe puis les essais cliniques chez l'homme ont permis de démontrer l'efficacité de tels greffons. Etant donné ces observations, dans notre étude nous nous sommes volontairement limités à l'analyse de la biologie cellulaire des cellules que nous avons implantées. Sur la base de ces résultats, la proportion de neurones DARPP-32+ humains observés dans nos greffons, laisse ainsi espérer un possible effet thérapeutique des cellules implantées.

Dans le cadre de xéno greffe, une des caractéristiques majeures des greffons de tissus fœtaux humains est leur lente maturation. Ceci se traduit à travers la littérature à plusieurs niveaux : (1)- malgré la présence de neurones DARPP-32+, les marqueurs de neurones plus matures apparaissent en général tardivement, pas avant environ 6 mois (Grasbon-Frodl et al., 1996), (2)- la vascularisation des

greffons est très limitée, même 3 mois après transplantation (Geny et al., 1994), et (3)- très peu de connexions synaptiques sont établies 3 mois après greffe (Belkadi et al., 1997). (1)- Les expériences de xénogreffe de tissus fœtaux humains chez le rat ne rapportent qu'une très faible proportion de neurones calbindine+ six mois après transplantation, et un marquage AChE variable (Grasbon-Frodl et al., 1996). Une étude d'allogreffes de tissu fœtal de rat montre par ailleurs que 2 mois après transplantation le marqueur calbindine n'est pas détecté au sein du greffon tandis que seize mois après greffe, la densité de neurones exprimant cette protéine représente environ 60% du greffon (Roberts and Difulgia, 1988). Ces résultats indiquent que l'expression de marqueurs de MSN, nécessite une maturation qui peut prendre plus d'une année pour des cellules de rats. Il semble donc logique que dans notre cas nous n'observions que rarement des neurones exprimant la protéine calbindine et aucune cellules n'exprimant l'acétylcholinestérase (AChE), 3 à 5 mois après transplantation. (2)- Nos expériences de xénogreffes montrent la présence de rares microgliocytes et cellules endothéliales de l'hôte 3 mois après transplantation, indiquant un éventuel début d'angiogenèse. Cette angiogenèse est très faible et n'apparaît pas avant plusieurs mois. Les cellules greffées semblent ainsi pouvoir survivre pendant une longue période en l'absence de toute vascularisation. Cette observation est en accord avec ce qui a été précédemment observé dans une étude de xénogreffe de tissu fœtal humain (Geny et al., 1994). Dans cette expérience, les auteurs démontrent que les greffons humains ne semblent pas vascularisés avant au moins un mois, et que la densité de vaisseaux sanguins est faible trois mois après transplantation. Cependant, au cours de cette expérience la formation des vaisseaux semble en partie due à la présence de cellules endothéliales dans les tissus fœtaux greffés. Ceci ne peut *a priori* pas être le cas dans nos greffons si l'on conjugue l'efficacité de notre protocole d'induction neurale et l'origine embryonnaire strictement « non neuroectodermique » des cellules endothéliales. (3)- L'analyse de la détection du marqueur hNCAM dans nos greffons, a révélé la présence de quelques neurites en dehors du striatum, notamment vers le corps calleux et dans le faisceau pyramidal au-delà du tronc cérébral. Outre ce type de marquage, nous avons également cherché à étudier une éventuelle fonctionnalité des cellules greffées, en analysant l'expression du proto-oncogène c-Fos, après stimulation par de l'amphétamine. Ces expériences n'ont pas permis d'établir, contrairement à certaines études de xénogreffes de tissus fœtaux humains (Victorin et al., 1990 ; Pundt et al., 1996), la présence de connexions entre nos cellules et le parenchyme de l'hôte. Ceci peut s'expliquer en partie par le phénomène de surprolifération observé dans nos greffons. Cet aspect est abordé plus loin dans la discussion.

Nos données confirment l'ensemble de ces résultats obtenus avec un greffon d'origine fœtale humaine et souligne la relative lenteur de la maturation des greffons striataux humains ce qui rend leur analyse difficile ou même incompatible avec le modèle classique de la MH chez le rongeur.

1.3. Surprolifération des greffons neuraux issus de cellules hES : un obstacle majeur de nature « pathologique » ou « physiologique » pour l'application clinique.

Le deuxième résultat majeur de nos expériences de xéno greffes est la mise en évidence du fort potentiel tumorigène des cellules implantées. Cette surprolifération est massive et relativement rapide. Le nombre de cellules humaines implantées augmentent, en 2 à 5 mois, de 50000 cellules initialement implantées à plus de 100 million de cellules (200 mm^3 à 800 mm^3 soit plus de dix fois la taille du striatum). Rétrospectivement, nous avons constaté que cette surprolifération peut se deviner déjà 4 à 6 semaines après transplantation. Pour les animaux greffés cette prolifération est dramatique, puisqu'elle provoque une paralysie partielle rapidement suivie de la mort des animaux concernés, entre 2 et 5 mois après transplantation. Les tumeurs ainsi formées ne résultent pas de la présence de cellules hES indifférenciées, tel qu'observé lors de transplantation de greffon peu mature ou de cellules hES. Ces néoplasmes sont plutôt le fait de progéniteurs neuraux mitotiques persistants. Ce problème est parfaitement distinct de celui bien connu et discuté précédemment, concernant la formation de tératome consécutive à la présence de cellules hES résiduelle. Il est intéressant de souligner que des résultats similaires aux nôtres, ont été observés dans le cas de greffes de progéniteurs neuraux, issus de cellules hES et de cellules ES de primates non-humains, dans des animaux modèles de la maladie de Parkinson (Roy et al., 2006 ; Sanchez-Pernaute et al., 2005 ; Ferrari et al., 2006). Dans leur publication, Roy et ses collaborateurs décrivent la greffe de neurones dopaminergiques issus de cellules hES dans des rats. Ils observent, 10 semaines après transplantation, un greffon occupant un volume moyen de 15 à 20 mm^3 , sachant que le volume normal d'un striatum de rat est de 33 mm^3 (Christophersen and Brundin, 2007). Dans notre cas la surprolifération est au moins 10 fois plus importante. Un phénomène similaire entraînant une compression du parenchyme de l'hôte, bien que moins important que ce que nous décrivons, a également été relaté au cours d'expériences de xéno greffes de tissus fœtaux dans des striata lésés de rats (Grasbon-Frodl et al., 1996 ; Naimi et al., 1996 ; Pundt et al., 1996). L'interprétation de ces résultats, très problématiques pour la continuité de l'évaluation des greffons issus de cellules hES, pose la question de la nature « pathologique » ou « physiologique » du phénomène de surprolifération observé.

Les principales hypothèses pouvant expliquer que le phénomène de surprolifération serait d'ordre pathologique, sont les suivantes. Tout d'abord, au cours de notre protocole nous utilisons le morphogène Sonic hedgehog (Shh) afin d'induire la ventralisation de nos précurseurs télencéphaliques. Or, cette molécule agit également en tant que mitogène, aussi bien au cours du développement du SNC, qu'au niveau des cellules souches neurales chez l'adulte (Lai et al., 2003 ; Fuccillo et al., 2006 ; Han et al., 2008). La voie Shh est par ailleurs impliquée dans des processus néoplasiques tels que la formation de médulloblastome (Yang et al., 2008b). Une des cibles de Shh serait l'oncogène *N-myc*, connu pour stimuler la prolifération des progéniteurs du système nerveux, et inhiber leur différenciation neuronale (Hatton et al., 2006). Enfin, l'autorenouvellement des cellules

neuroépithéliales en rosettes est dépendant de l'activation de la voie Shh (Elkabetz et al., 2008). La culture prolongée de nos précurseurs neuraux en présence de SHH, pourrait ainsi entraîner une activation auto-entretenu anormale de la voie hedgehog et de ses cibles, telles que *N-myc*. Ceci conduirait alors à une dérégulation du cycle cellulaire, en faveur d'un état prolifératif prolongé et d'une inhibition de la différenciation neuronale. Une autre explication, qui pourrait alimenter l'hypothèse de la nature « pathologique » du phénomène de surprolifération, repose sur d'éventuelles altérations du génome des cellules greffées. En culture, les cellules hES peuvent au cours des passages acquérir des anomalies caryotypiques, telles que des trisomies 12 ou 17 (Draper et al., 2004 ; Hoffman and Carpenter, 2005). Ces anomalies leur confèrent un avantage sélectif qui pourrait expliquer la prédominance de cellules tumorales dans les cultures cellulaires. Une étude récente de l'équipe a démontré par ailleurs que ce genre d'altérations n'était pas seulement restreint à des aberrations chromosomiques. Il apparaît en effet que des duplications de fragments d'ADN, de seulement quelques millions de paire de base (Mbp), peuvent survenir et être positivement sélectionnées au cours des passages des cellules hES. Alors que les trisomies sont assez facilement identifiables par des analyses caryotypiques classiques (G-band), les anomalies dont la taille est de l'ordre du Mpb le sont beaucoup moins. La détection de ce type d'aberrations nécessite le recours à des techniques nettement plus sensibles (caryotype moléculaire sur puce ou FISH), qui ne sont pour l'instant jamais utilisés en routine dans les laboratoires. Dans notre contexte, il serait par conséquent très intéressant d'analyser l'intégrité chromosomique des cellules implantées surprolifératives.

A l'inverse des hypothèses précitées, le phénomène de surprolifération observé au cours de nos expériences de xéno greffes, pourrait être de nature « physiologique ». Au cours du développement embryonnaire des mammifères, les cellules neuroépithéliales de la plaque neurale subissent des phases d'intense prolifération, afin d'aboutir à l'élaboration de toutes les structures du SNC. L'édification de ce dernier démarre chez l'homme au cours de la 3^e semaine, et aboutit à la fin de la 12^e semaine à la mise en place de la quasi totalité des composantes cellulaires cérébrales. La naissance des différents sous-types neuronaux s'effectue selon une séquence temporelle spécifique propre à chaque sous-type. A titre d'exemple, la neurogenèse striatale prend place lors de la 6^e semaine de gestation tandis que la corticogenèse débute pendant la septième semaine (Jain et al., 2001). D'autre part, au cours de la neurogenèse striatale, la formation des neurones moyens épineux précède celle des interneurons (Jain et al., 2001). Comme pour toutes les régions du cerveau, la neurogenèse striatale laisse progressivement la place à la genèse des astrocytes puis des oligodendrocytes du striatum. L'ensemble de ce processus implique que des précurseurs neuraux non déterminés, ayant un potentiel prolifératif important, persistent pendant plusieurs semaines. Ceux contenus dans nos greffons pourraient ainsi suivre cette chronobiologie. Caricaturalement, la taille du greffon qui apparaît excessive en comparaison du cerveau de l'hôte, peut ainsi être due au fait que les cellules greffées sont « programmées » pour édifier un cerveau humain, et non un cerveau de rat, entre lesquels il existe une différence considérable de taille.

Le potentiel néoplasique des greffons issus de cellules hES, empêche dans les conditions actuelles, toute application clinique de cette thérapie substitutive. Il est à noter que très récemment l'agence américaine du médicament (FDA), a bloqué toute utilisation clinique de produits de thérapies cellulaires, issus de cellules hES. Cette décision pourrait s'expliquer en partie en raison de ce type de risque, qui reste globalement très peu étudié, d'où l'impérative nécessité du développement de mesures spécifiques pour sécuriser les greffons issus de cellules hES. Dans cette perspective plusieurs stratégies peuvent être envisagées, qui impliquent une intervention pré- ou postopératoire sur le greffon. Parmi les stratégies que l'on pourrait qualifier de préventives, le traitement des cellules à greffer par des agents anti-mitotiques tels que la mitomycine C (antibiotique anti-tumoral utilisé notamment dans le traitement du cancer de la vessie), est le plus souvent cité. Cette approche permettrait d'éliminer les cellules prolifératives. Cependant, transplanter des cellules ayant atteint leur différenciation terminale n'apparaît pas comme une solution adéquate dans le contexte de la maladie de Huntington. En effet, ces cellules post-mitotiques sont réputées plus fragiles et survivent mal *in vivo* notamment en raison de l'acte chirurgical d'injection. Une autre approche « préventive » consisterait à développer des procédés afin d'obtenir des populations plus synchronisées et homogénéisées de progéniteurs striataux. Notre protocole d'induction neurale, fondé sur la co-culture des cellules hES avec des cellules stromales (MS5), conduit après expansion et régionalisation des progéniteurs en rosette à la production *in vitro* de populations dites « striatales », relativement hétérogènes. Celles-ci sont constituées à la fois de précurseurs neuraux immatures, de progéniteurs striataux, encore prolifératifs, et parfois de neurones post-mitotiques. Comme évoqué à plusieurs reprises dans cette discussion, cela traduit notamment un manque de synchronisation de nos cultures. Un moyen d'accéder à des populations plus homogènes pourrait reposer sur une étape de tri cellulaire (FACS ou MACS). Cette technique est fondée sur la détection d'antigènes membranaires spécifiques aux cellules d'intérêt. La pertinence d'une telle approche repose sur l'identification préalable de marqueurs spécifiques d'un état de maturation et de spécification précis, permettant de discriminer efficacement divers sous-types de progéniteurs neuronaux. Plusieurs marqueurs ont déjà été identifiés, et la faisabilité d'une telle approche de sélection, à partir de cellules neurales et neuronales dérivées de cellules hES, a déjà été établie (Pruszek et al., 2007 ; Elkabetz et al., 2008). Parmi ces marqueurs de surface, Forse1 (forebrain surface embryonic antigen-1), semble particulièrement intéressant dans notre cas. Au cours du développement du SNC de la souris, Forse-1 est exprimé précocement, avant Bf1, au niveau du télencéphale (Tole and Patterson, 1995 ; Tole et al., 1995). D'autre part, des rosettes neurales dérivées de cellules hES et triées par la protéine Forse-1, expriment toutes le facteur de transcription Bf1 (Elkabetz et al., 2008). Ceci démontre non seulement une corrélation entre le développement embryonnaire et la différenciation *in vitro*, mais également la faisabilité d'un tri cellulaire permettant l'obtention de populations télencéphaliques purifiées. Grâce à cette approche de tri, les précurseurs neuraux immatures non engagés vers un phénotype télencéphalique pourraient être

écartés de la population à greffer. Les populations obtenues seraient alors plus homogènes, et possèderaient un potentiel prolifératif nettement plus limité. Une approche alternative, non exclusive de la précédente, pour améliorer la synchronisation des cellules striatales que nous produisons, a consisté à modifier notre méthode d'induction neurale. L'intérêt de cette nouvelle méthode qui est encore en cours de développement est discuté plus loin.

D'autres stratégies de sécurisation des greffons issus de cellules hES supposent une intervention préopératoire, *i.e.* l'élimination des cellules prolifératives après transplantation. Une approche possible, qui a fait l'objet d'essais cliniques en thérapie génique anticancéreuse (Klatzmann et al., 1998), repose sur l'utilisation d'un système de gène suicide. Ce dernier est fondé sur un couple enzyme/prodrogue, et implique une étape de transduction des cellules hES ou de leurs progénies, avec le gène codant pour l'enzyme utilisée. Ce système permettrait d'induire en présence de la prodrogue la mort sélective, en théorie, des cellules prolifératives. Cela entraînerait en théorie l'élimination des cellules pro-tumorales, tout en préservant les neurones post-mitotiques potentiellement thérapeutiques. Une condition nécessaire à l'application de cette approche dans un contexte de greffe intracérébrale, est, bien sûr, que la prodrogue franchisse la barrière hématoencéphalique. Ceci est le cas pour une des prodrogues substrat de l'enzyme « suicide » thymidine kinase, le ganciclovir. La faisabilité de ce type d'approche a déjà été établie au niveau expérimental avec des cellules hES (Schuldiner et al., 2003). Cependant, la nécessaire transgénèse que cette stratégie implique est en soit un nouveau facteur de risque pour une application clinique.

1.4. Induction neurale : une nouvelle méthode de production de précurseurs neuraux plus efficace et rapide.

Comme nous venons de le voir, les résultats précédemment décrits démontrent notre capacité à produire *in vitro*, à partir de cellules hES, des populations neurales et neuronales, enrichies en cellules possédant un phénotype striatal. Malgré ces résultats très encourageants, il nous est apparu que plusieurs aspects techniques limitaient l'efficacité et les perspectives d'application thérapeutique de notre protocole. Comme abordé lors de la présentation des résultats, plusieurs de ces aspects sont relatifs à l'étape de co-culture des cellules hES avec des cellules stromales. Ceci m'a poussé à explorer, au cours de la dernière partie de ma thèse, en étroite collaboration avec le Dr Alexandra Benchoua, chercheur post-doctorant de l'équipe, d'autres méthodes d'induction neurale. Cette exploration s'est principalement concentrée sur les quatre principaux aspects limitants suivants : 1) La relative lenteur de l'étape d'induction neurale par co-culture sur cellules MS5, ce qui nuit à la synchronisation du phénotype des cellules issues de hESC. 2) La faible reproductibilité à long terme de cette étape due à la variation de la qualité des MS5 au gré de leur passage, voir de leur lot. 3) La quasi incompatibilité « pratique » de cette étape avec l'approche qui consiste à traiter les cellules hES en différenciation avec des molécules de signalisation extrinsèques, telle que nous l'avons utilisée avec succès dans les étapes suivantes du protocole. Lors de l'induction neurale sur cellules MS5, un

faible nombre de cellules hES se trouve en présence d'un très grand nombre de cellules MS5 dans un grand volume de culture (le rapport entre le nombre de cellules hES, cible réelle des molécules et le nombre de cellules stromales, non ciblées est défavorable). 4) La très faible compatibilité de nos procédures avec les critères de production de greffons de « grade clinique », en particulier à cause de l'interaction directe des cellules hES avec des cellules animales.

Le nouveau protocole que nous avons développé permet de répondre en partie aux problèmes que nous avons rencontrés. Tout d'abord, il autorise la production efficace, rapide, et reproductible de cellules neuroépithéliales en rosette, grâce à l'association des actions inhibitrices des molécules Noggin (inhibiteur des BMPs) et SB431542 (antagoniste de la voie Activine/Nodal). Les résultats que nous obtenons semblent corrélés aux données de la littérature, relatives aux rôles des voies BMPs et Activine/Nodal dans les cellules hES, et au cours de la neurogénèse chez l'animal. De nombreux travaux ont en effet démontré que l'inhibition des BMPs, par des antagonistes naturels tels que Noggin, était essentiel au bon déroulement de l'induction neurale au cours de l'embryogenèse (Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002). Certains auteurs rapportent également, une amélioration de la spécification neurale des cellules hES en présence de la protéine Noggin, avec toutefois une efficacité limitée (Gerrard et al., 2005 ; Itsykson et al., 2005). D'autre part, la voie Activine/Nodal joue un rôle essentiel dans le maintien de l'état indifférencié des cellules hES (Vallier et al., 2005 ; Xiao et al., 2006). Leur inhibition par des antagonistes naturels (Lefty ou Cerberus) ou chimiques (SB431542) semble promouvoir l'apparition de marqueurs du neuroectoderme (Sox1 et Nestine), à partir de cellules mES ou hES (Watanabe et al., 2005 ; Smith et al., 2008). Sur la base de ces données, il semble que l'inhibition de la voie Activine/Nodal permet d'empêcher l'auto-renouvellement des cellules hES, tandis que l'inhibition de la voie BMP permet la spécification de ces cellules vers la voie neurale. Si l'inhibition des voies BMPs d'une part, et Activine/Nodal d'autre part, a permis de démontrer de manière indépendante une amélioration, relativement efficace, de l'induction neurale, aucune étude n'avait à ce jour étudié l'inhibition simultanée de ces deux voies, et démontré une efficacité telle que nous l'observons.

Nous avons développé notre nouveau protocole en nous appuyant sur un système de culture des cellules hES en « monocouche » adhérente. L'application d'un tel système à ces cellules a déjà fait l'objet d'une publication (Lowell et al., 2006). Dans cette étude les auteurs n'utilisent pas de molécules pour promouvoir l'induction neurale des cellules hES. Ceci peut expliquer le fait qu'ils obtiennent des résultats beaucoup moins satisfaisants que ceux observés dans notre cas. Ce constat suggère que les cellules hES ne suivent pas un modèle d'induction neurale par « défaut », mais qu'elles nécessitent la présence de signaux extrinsèques permissifs, tels que l'inhibition des voies BMP et Activine/Nodal. L'amélioration de l'efficacité de notre approche peut également être attribuée à l'utilisation de laminine comme support matriciel. Les interactions des cellules hES avec certains composants de la matrice extracellulaire sont en effet critiques pour le maintien de leur état indifférencié d'une part, et pour leur différenciation vers une voie spécifique d'autre part. La laminine

constitue ainsi un composé essentiel à la différenciation des cellules hES vers la voie neurale (Ma 2008). Le système de culture en « monocouche », contrairement aux protocoles basés sur la formation de corps embryoides (EBs), même optimisé en bioréacteur rotatif (Come et al 2008- Annexe 2), ou la culture sur cellules nourricières, procure par ailleurs une méthode d'induction neurale simplifiée. En réduisant l'agrégation non contrôlée des cellules hES ou l'apport non maîtrisé de signaux extrinsèques (par les cellules stromales), il permet un accès optimal et homogène des cellules hES aux molécules utilisées. Ceci semble permettre une meilleure synchronisation et homogénéisation des populations cellulaires obtenues.

L'ensemble de nos résultats préliminaires démontrent ainsi notre capacité à induire de manière efficace, rapide et homogène, la spécification neurale des cellules hES en milieu défini et en absence de cellules animales. Le résultat final de cette approche est la production de cellules neurales en rosettes. Ces dernières semblent très proches voir identiques à celles obtenues après induction neurale des cellules hES sur cellules MS5. Si cette analogie complète se vérifie, il semble totalement envisageable de substituer cette nouvelle technique à la première étape du protocole que nous avons décrit précédemment. Nous pourrions ainsi disposer, en s'affranchissant des cellules d'origine animale, d'une méthode de production de greffons beaucoup plus compatibles avec les contraintes des productions cellulaires de « grade clinique ». Cette évolution technique pourrait constituer un élément important pour l'application clinique de greffons issus de cellules hES pour la thérapie cellulaire de la MH.

1.5. Neuroblastes fœtaux humains et progéniteurs dérivés de cellules hES : des limites des uns aux avantages des autres.

Une des limites de l'utilisation de tissus fœtaux est le manque de matériel biologique disponible. De nombreuses études ont par le passé, tenté de contourner ce problème en essayant d'amplifier *in vitro* les neuroblastes fœtaux humains. Dans cette optique, ces neuroblastes ont été, une fois isolés, cultivés en présence de facteur de croissance. Or, il semble que de telles conditions de culture favorisent, au cours des passages, la prolifération des cellules au détriment de leur potentiel neurogénique et de leur capacité de différenciation striatale *in vitro* mais également *in vivo* (Zietlow et al., 2005). La modification des propriétés des cellules fœtales après amplification limite ainsi leur exploitation thérapeutique. Notre protocole de différenciation permet d'obtenir à partir d'environ 10000 cellules hES entre 500000 et 1 million de cellules neuroépithéliales. Après expansion de ces cellules, nous pouvons disposer de plusieurs millions de progéniteurs neuronaux prêts à être greffés. Ces progéniteurs possèdent un fort potentiel de différenciation striatale *in vivo*. En effet, alors qu'au moment de la greffe aucune cellule n'exprimait la protéine DARPP-32 *in vitro*, trois mois après transplantation plus de 7% des cellules du greffon (près de 7 millions en tout), expriment cette protéine. Ces résultats démontrent ainsi la possibilité de produire en grand nombre des cellules

amplifiables capables d'adopter, *in vitro* et *in vivo*, le phénotype recherché. Les progéniteurs dérivés de hES pourraient ainsi répondre au problème d'amplification posé par les cellules fœtales.

Les neuroblastes fœtaux, comme nous l'avons déjà évoqué, trouvent également leur limite au niveau de leur accessibilité. Idéalement, pour qu'une approche substitutive soit applicable à un grand nombre de patients, les chirurgiens doivent pouvoir s'approvisionner en matériel biologique de manière aisée et en fonction de leurs besoins. Or, le nombre de fœtus issus d'interruption volontaire de grossesse (IVG) nécessaires à une intervention chirurgicale, n'est pas toujours disponible. L'isolement des éminences ganglionnaires nécessite en outre d'obtenir des fœtus intacts. La fragilité particulière du pôle céphalique peut cependant, au moment de l'IVG, conduire à l'obtention de tissus endommagés qui ne peuvent plus alors être exploités. Les progéniteurs neuraux dérivés de cellules hES, sont potentiellement plus facilement accessibles que les tissus fœtaux. Certains de mes résultats préliminaires indiquent par ailleurs que ces progéniteurs peuvent être remis en culture, et survivre pendant plusieurs jours, après un cycle de congélation/décongélation. Leur capacité à se différencier après décongélation en neurones DARPP-32 n'a cependant pas encore été testée. Dans la mesure où ces progéniteurs garderaient leur potentiel de différenciation après décongélation, cela permettrait de créer des banques de cellules qui faciliteraient grandement l'approvisionnement en matériel biologique.

Comme pour les neuroblastes fœtaux humains, l'éventuel processus de préparation de lot clinique de greffons issus de cellules hES, sera une étape strictement réglementée qui doit s'organiser très en amont de la préparation des essais cliniques. Initialement, les propriétés de ces greffons doivent bien sûr être suffisamment déterminées. Ensuite, les techniques de production de tels greffons doivent être rendues compatibles avec les nombreux critères des agences réglementaires (AFSSAPS, FDA etc..) qui définissent pour chaque pays, les niveaux de contrainte pour la production de lot clinique de thérapie cellulaire. Bien avant les applications cliniques, un pré-requis important est donc par exemple l'élimination de tout composé d'origine animal des étapes de dérivation et de différenciation des cellules hES. Les cellules stromales murines (MS5), que nous avons utilisées dans nos études, pose a priori problème car elles pourraient non seulement transmettre des pathogènes aux cellules humaines, mais aussi certains constituants des glycoprotéines, pourraient induire une réponse immunitaire après greffe (Martin et al., 2005). S'affranchir de ce type de problèmes sera donc indispensable pour assurer une transposition rapide et sécurisée des résultats de recherches expérimentales à la clinique. La dérivation de lignées de cellules hES, compatibles avec une utilisation clinique, est un premier pas important dans cette direction, et a déjà été initiée dans plusieurs pays y compris en France. Plus particulièrement, en ce qui concerne le traitement de la MH par thérapie cellulaire, l'intégration de la nouvelle technique d'induction neurale dans notre protocole de différenciation striatale, s'inscrit dans cette optique.

2. Perspectives.

Au regard de ce qui précède, il apparaît que mes travaux de recherche ont permis l'élaboration et la validation d'un protocole de spécification des cellules hES en progéniteurs striataux, capables de se différencier ultérieurement, *in vitro* et *in vivo*, en neurones GABAergiques moyens épineux (DARPP-32+). Jusqu'à présent un tel protocole n'avait jamais fait l'objet d'une publication. Aux vues de nos résultats, les cellules hES pourraient, si leur potentiel thérapeutique était avéré, répondre aux problèmes posés par les tissus fœtaux et constituer une alternative à ces derniers. Cependant, avant d'envisager toute application clinique, il est impératif d'évaluer pleinement le potentiel thérapeutique et l'innocuité des progéniteurs striataux dérivés de cellules ES, obtenus grâce à notre protocole. Dans cette perspective, des allogreffes devront être réalisées dans des primates non humains modèles de la MH. Ce modèle du fait de la similitude de l'organisation de ses structures corticales et sous-corticales avec celles du cerveau humain, représente un paradigme de choix pour les prédictions en neurologie humaine, et plus particulièrement pour le traitement des maladies neurodégénératives. C'est en effet le seul modèle qui autorisera une analyse précise de l'efficacité du greffon, ainsi que de la récupération des déficits cognitifs associés à la MH, impossible à tester chez le rongeur. Ce modèle présente par ailleurs une durée de vie suffisamment longue pour étudier la survie du greffon, ainsi que les conséquences à long terme des transplantations. Il permettra ainsi de tester les approches de sécurisation des cellules greffées citées précédemment, dans le cadre de la prévention de la surprolifération des cellules greffées, ou encore d'examiner une éventuelle alloimmunisation. Le risque d'un rejet immunitaire du greffon est en effet un point important à considérer dans le cadre d'une approche substitutive. Bien que le cerveau soit depuis longtemps considéré comme un site immuno-privilegié, une étude récente, réalisée au cours d'un essai clinique de thérapie cellulaire de la MH, a démontré qu'une réponse immunitaire était possible après arrêt du traitement immunosuppresseur (Krystkowiak et al., 2007). Ce phénomène est cependant réversible dès rétablissement du traitement. Même si un phénomène de rejet du greffon a été établi chez un seul patient, cette étude démontre clairement l'importance de prendre en considération la réponse immunitaire cérébrale.

Enfin, malgré des bénéfices cliniques avérés et une amélioration de la qualité de vie des patients pendant plusieurs années, l'approche substitutive ne peut cependant pas s'opposer à la progression de la maladie. Des stratégies combinées de thérapies cellulaire et neuroprotectrice devront probablement être envisagées pour obtenir des résultats optimaux.

Références Bibliographiques

Aebischer, P., Schlupe, M., Deglon, N., Joseph, J. M., Hirt, L., Heyd, B., Goddard, M., Hammang, J. P., Zurn, A. D., Kato, A. C., *et al.* (1996). Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2, 696-699.

Alexander, G. E., DeLong, M. R., and Strick, P. L. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9, 357-381.

Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 200, 225-232.

Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 70, 837-845.

Anderson, S. A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D. D., Meneses, J., Pedersen, R., and Rubenstein, J. L. (1997). Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19, 27-37.

Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M. A., and *et al.* (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 398-403.

Aoto, K., Nishimura, T., Eto, K., and Motoyama, J. (2002). Mouse *GLI3* regulates *Fgf8* expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud. *Dev Biol* 251, 320-332.

Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martin, M. A., Rubio, J. C., Ablanado, P., and Cabello, A. (1998). Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* 43, 397-400.

Armstrong, R. J., Watts, C., Svendsen, C. N., Dunnett, S. B., and Rosser, A. E. (2000). Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model of Huntington's disease. *Cell Transplant* 9, 55-64.

Aubin, J., Davy, A., and Soriano, P. (2004). In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev* 18, 1482-1494.

Aylward, E. H., Sparks, B. F., Field, K. M., Yallapragada, V., Shpritz, B. D., Rosenblatt, A., Brandt, J., Gourley, L. M., Liang, K., Zhou, H., *et al.* (2004). Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63, 66-72.

Bachoud-Levi, A. C., Deglon, N., Nguyen, J. P., Bloch, J., Bourdet, C., Winkel, L., Remy, P., Goddard, M., Lefaucheur, J. P., Brugieres, P., *et al.* (2000a). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* 11, 1723-1729.

Bachoud-Levi, A. C., Gaura, V., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Boisse, M. F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M. J., Bourdet, C., Remy, P., *et al.* (2006). Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 5, 303-309.

Bachoud-Levi, A. C., Remy, P., Nguyen, J. P., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Bourdet, C., Baudic, S., Gaura, V., Maison, P., Haddad, B., *et al.* (2000b). Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356, 1975-1979.

Backman, M., Machon, O., Mygland, L., van den Bout, C. J., Zhong, W., Taketo, M. M., and Krauss, S. (2005). Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev Biol* 279, 155-168.

Baharvand, H., Hashemi, S. M., and Shahsavani, M. (2008). Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 76, 465-477.

Bailey, C. D., and Johnson, G. V. (2005). Tissue transglutaminase contributes to disease progression in the R6/2 Huntington's disease mouse model via aggregate-independent mechanisms. *J Neurochem* 92, 83-92.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E., and Gottlieb, D. I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol* 168, 342-357.

Baker, D. E., Harrison, N. J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H. D., Shaw, P. J., Heath, P. R., Holden, H., and Andrews, P. W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. *Nat Biotechnol* 25, 207-215.

Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M. E., Topf, N., *et al.* (2003). Neural subtype specification of fertilization and

nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21, 1200-1207.

Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B. R., and Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13, 4181-4192.

Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurek, M. F., Swartz, K. J., and Martin, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321, 168-171.

Belkadi, A. M., Geny, C., Naimi, S., Jeny, R., Peschanski, M., and Riche, D. (1997). Maturation of fetal human neural xenografts in the adult rat brain. *Exp Neurol* 144, 369-380.

Benchoua, A., Trioulier, Y., Diguët, E., Malgorn, C., Gaillard, M. C., Dufour, N., Elalouf, J. M., Krajewski, S., Hantraye, P., Deglon, N., and Brouillet, E. (2008). Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum Mol Genet* 17, 1446-1456.

Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M. C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J. M., Hirsch, E., Hantraye, P., *et al.* (2006). Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol Biol Cell* 17, 1652-1663.

Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Herve, D., Valjent, E., and Girault, J. A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28, 5671-5685.

Bibb, J. A., Yan, Z., Svenningsson, P., Snyder, G. L., Pieribone, V. A., Horiuchi, A., Nairn, A. C., Messer, A., and Greengard, P. (2000). Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6809-6814.

Bjorklund, A., and Stenevi, U. (1979). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* 177, 555-560.

Bloch, J., Bachoud-Levi, A. C., Deglon, N., Lefaucheur, J. P., Winkel, L., Palfi, S., Nguyen, J. P., Bourdet, C., Gaura, V., Remy, P., *et al.* (2004). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15, 968-975.

Bogush, A., Pedrini, S., Pelta-Heller, J., Chan, T., Yang, Q., Mao, Z., Sluzas, E., Gieringer, T., and Ehrlich, M. E. (2007). AKT and CDK5/p35 mediate brain-derived neurotrophic factor induction of DARPP-32 in medium size spiny neurons *in vitro*. *J Biol Chem* 282, 7352-7359.

Bonnefont, J., Nikolaev, S. I., Perrier, A. L., Guo, S., Cartier, L., Sorce, S., Laforge, T., Aubry, L., Khativich, P., Peschanski, M., *et al.* (2008). Evolutionary forces shape the human RFPL1,2,3 genes toward a role in neocortex development. *Am J Hum Genet* 83, 208-218.

Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S., and Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 63, 2642-2660.

Braam, S. R., Denning, C., Matsa, E., Young, L. E., Passier, R., and Mummery, C. L. (2008). Feeder-free culture of human embryonic stem cells in conditioned medium for efficient genetic modification. *Nat Protoc* 3, 1435-1443.

Brederlau, A., Correia, A. S., Anisimov, S. V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., *et al.* (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of *in vitro* differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* 24, 1433-1440.

Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S., and Schulz, T. C. (2004). Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 13, 585-597.

Brouillet, E., Conde, F., Beal, M. F., and Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59, 427-468.

Brouillet, E., and Hantraye, P. (1995). Effects of chronic MPTP and 3-nitropropionic acid in nonhuman primates. *Curr Opin Neurol* 8, 469-473.

Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R. J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N. W., and Beal, M. F. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7105-7109.

Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D., and Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* *41*, 646-653.

Butt, S. J., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J. G., and Fishell, G. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* *48*, 591-604.

Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G., and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* *6*, 1162-1168.

Campbell, K., Kalen, P., Wictorin, K., Lundberg, C., Mandel, R. J., and Bjorklund, A. (1993). Characterization of GABA release from intrastriatal striatal transplants: dependence on host-derived afferents. *Neuroscience* *53*, 403-415.

Campbell, K., Wictorin, K., and Bjorklund, A. (1992). Differential regulation of neuropeptide mRNA expression in intrastriatal striatal transplants by host dopaminergic afferents. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10489-10493.

Campbell, K., Wictorin, K., and Bjorklund, A. (1995). Neurotransmitter-related gene expression in intrastriatal striatal transplants--I. Phenotypical characterization of striatal and non-striatal graft regions. *Neuroscience* *64*, 17-33.

Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z. Y., Jackson, J., Sherman, S., Seiger, A., and Wahlberg, L. U. (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol* *158*, 265-278.

Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P., and Rao, M. S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* *172*, 383-397.

Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., and Sipione, S. (2001). Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* *24*, 182-188.

Cayuso, J., and Marti, E. (2005). Morphogens in motion: growth control of the neural tube. *J Neurobiol* *64*, 376-387.

Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* *102*, 906-915.

Chen, L., and Daley, G. Q. (2008). Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet* *17*, R23-27.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* *383*, 407-413.

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

Christophersen, N. S., and Brundin, P. (2007). Large stem cell grafts could lead to erroneous interpretations of behavioral results? *Nat Med* *13*, 118; author reply 118-119.

Clarke, D. J., and Dunnett, S. B. (1993). Synaptic relationships between cortical and dopaminergic inputs and intrinsic GABAergic systems within intrastriatal striatal grafts. *J Chem Neuroanat* *6*, 147-158.

Clarke, D. J., Dunnett, S. B., Isacson, O., and Bjorklund, A. (1988). Striatal grafts in the ibotenic acid-lesioned neostriatum: ultrastructural and immunocytochemical studies. *Prog Brain Res* *78*, 47-53.

Cohen, M. A., Itsykson, P., and Reubinoff, B. E. (2007). Neural differentiation of human ES cells. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 23*, Unit 23 27.

Corbin, J. G., Gaiano, N., Juliano, S. L., Poluch, S., Stancik, E., and Haydar, T. F. (2008). Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J Neurochem* *106*, 2272-2287.

Corbin, J. G., Gaiano, N., Machold, R. P., Langston, A., and Fishell, G. (2000). The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* *127*, 5007-5020.

Corbin, J. G., Rutlin, M., Gaiano, N., and Fishell, G. (2003). Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* 130, 4895-4906.

Coyle, J. T., and Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263, 244-246.

Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N., and Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127, 59-69.

D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazar, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., and Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.

de Almeida, L. P., Zala, D., Aebischer, P., and Deglon, N. (2001). Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8, 433-446.

de la Monte, S. M., Vonsattel, J. P., and Richardson, E. P., Jr. (1988). Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 47, 516-525.

De Marchis, S., Bovetti, S., Carletti, B., Hsieh, Y. C., Garzotto, D., Peretto, P., Fasolo, A., Puche, A. C., and Rossi, F. (2007). Generation of distinct types of periglomerular olfactory bulb interneurons during development and in adult mice: implication for intrinsic properties of the subventricular zone progenitor population. *J Neurosci* 27, 657-664.

Deckel, A. W., Moran, T. H., and Robinson, R. G. (1986). Behavioral recovery following kainic acid lesions and fetal implants of the striatum occurs independent of dopaminergic mechanisms. *Brain Res* 363, 383-385.

Dedeoglu, A., Kubilus, J. K., Jeitner, T. M., Matson, S. A., Bogdanov, M., Kowall, N. W., Matson, W. R., Cooper, A. J., Ratan, R. R., Beal, M. F., *et al.* (2002). Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 22, 8942-8950.

DiFiglia, M. (1990). Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13, 286-289.

DiFiglia, M., Schiff, L., and Deckel, A. W. (1988). Neuronal organization of fetal striatal grafts in kainate- and sham-lesioned rat caudate nucleus: light- and electron-microscopic observations. *J Neurosci* 8, 1112-1130.

Dihne, M., Bernreuther, C., Hagel, C., Wesche, K. O., and Schachner, M. (2006). Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem Cells* 24, 1458-1466.

Dinsmore, J., Ratliff, J., Deacon, T., Pakzaban, P., Jacoby, D., Galpern, W., and Isacson, O. (1996). Embryonic stem cells differentiated *in vitro* as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 5, 131-143.

Dinsmore, J., Ratliff, J., Jacoby, D., Wunderlich, M., and Lindberg, C. (1998). Embryonic stem cells as a model for studying regulation of cellular differentiation. *Theriogenology* 49, 145-151.

Divac, I., Fonnum, F., and Storm-Mathisen, J. (1977). High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature* 266, 377-378.

Dompierre, J. P., Godin, J. D., Charrin, B. C., Cordelieres, F. P., King, S. J., Humbert, S., and Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27, 3571-3583.

Donoghue, J. P., and Herkenham, M. (1986). Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* 365, 397-403.

Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T. P., Thomson, J. A., and Andrews, P. W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 53-54.

Dunnett, S. B., Isacson, O., Sirinathsinghji, D. J., Clarke, D. J., and Bjorklund, A. (1988). Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions--III. Recovery from dopamine-dependent motor asymmetry and deficits in skilled paw reaching. *Neuroscience* 24, 813-820.

Dunnett, S. B., and Rosser, A. E. (2007). Stem cell transplantation for Huntington's disease. *Exp Neurol* 203, 279-292.

Durr, A., and Viville, S. (2007). [Huntington disease: presymptomatic testing, prenatal diagnosis, preimplantation genetic diagnosis experience]. *Gynecol Obstet Fertil* 35, 1051-1054.

Eisenstat, D. D., Liu, J. K., Mione, M., Zhong, W., Yu, G., Anderson, S. A., Ghattas, I., Puelles, L., and Rubenstein, J. L. (1999). DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J Comp Neurol* 414, 217-237.

Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V., and Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22, 152-165.

Emerich, D. F., Lindner, M. D., Winn, S. R., Chen, E. Y., Frydel, B. R., and Kordower, J. H. (1996). Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* 16, 5168-5181.

Emerich, D. F., Winn, S. R., Hantraye, P. M., Peschanski, M., Chen, E. Y., Chu, Y., McDermott, P., Baetge, E. E., and Kordower, J. H. (1997). Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386, 395-399.

Englund, U., Bjorklund, A., and Wictorin, K. (2002). Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 134, 123-141.

Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81, 747-756.

Estrada Sanchez, A. M., Mejia-Toiber, J., and Massieu, L. (2008). Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res* 39, 265-276.

Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Cipolloni, P. B., Storey, E., and Beal, M. F. (1993). Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 119, 46-71.

Ferrari, D., Sanchez-Pernaute, R., Lee, H., Studer, L., and Isacson, O. (2006). Transplanted dopamine neurons derived from primate ES cells preferentially innervate DARPP-32 striatal progenitors within the graft. *Eur J Neurosci* 24, 1885-1896.

Fisone, G., Hakansson, K., Borgkvist, A., and Santini, E. (2007). Signaling in the basal ganglia: postsynaptic and presynaptic mechanisms. *Physiol Behav* 92, 8-14.

Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marin, O., Pachnis, V., and Kessaris, N. (2007). Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* 27, 10935-10946.

Folstein, S. E., Leigh, R. J., Parhad, I. M., and Folstein, M. F. (1986). The diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* 36, 1279-1283.

Freeman, T. B., Cicchetti, F., Hauser, R. A., Deacon, T. W., Li, X. J., Hersch, S. M., Nauert, G. M., Sanberg, P. R., Kordower, J. H., Saporta, S., and Isacson, O. (2000). Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13877-13882.

Fricker-Gates, R. A., Lundberg, C., and Dunnett, S. B. (2001). Neural transplantation: restoring complex circuitry in the striatum. *Restor Neurol Neurosci* 19, 119-138.

Fricker, R. A., Torres, E. M., Hume, S. P., Myers, R., Opacka-Juffrey, J., Ashworth, S., Brooks, D. J., and Dunnett, S. B. (1997). The effects of donor stage on the survival and function of embryonic striatal grafts in the adult rat brain. II. Correlation between positron emission tomography and reaching behaviour. *Neuroscience* 79, 711-721.

Fuccillo, M., Joyner, A. L., and Fishell, G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7, 772-783.

Gage, F. H., Ray, J., and Fisher, L. J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18, 159-192.

Gaulden, J., and Reiter, J. F. (2008). Neur-ons and neur-offs: regulators of neural induction in vertebrate embryos and embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 17, R60-66.

Gaura, V., Bachoud-Levi, A. C., Ribeiro, M. J., Nguyen, J. P., Frouin, V., Baudic, S., Brugieres, P., Mangin, J. F., Boisse, M. F., Palfi, S., *et al.* (2004). Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. *Brain* 127, 65-72.

- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelieres, F. P., De Mey, J., MacDonald, M. E., Lessmann, V., Humbert, S., and Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* *118*, 127-138.
- Geng, X., Speirs, C., Lagutin, O., Inbal, A., Liu, W., Solnica-Krezel, L., Jeong, Y., Epstein, D. J., and Oliver, G. (2008). Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev Cell* *15*, 236-247.
- Geny, C., Naimi-Sadaoui, S., Jeny, R., Belkadi, A. M., Juliano, S. L., and Peschanski, M. (1994). Long-term delayed vascularization of human neural transplants to the rat brain. *J Neurosci* *14*, 7553-7562.
- Gerfen, C. R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* *311*, 461-464.
- Gerfen, C. R. (1985). The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* *236*, 454-476.
- Gerfen, C. R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* *15*, 133-139.
- Gerfen, C. R., Herkenham, M., and Thibault, J. (1987). The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* *7*, 3915-3934.
- Gerrard, L., Rodgers, L., and Cui, W. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem Cells* *23*, 1234-1241.
- Goetz, A. K., Scheffler, B., Chen, H. X., Wang, S., Suslov, O., Xiang, H., Brustle, O., Roper, S. N., and Steindler, D. A. (2006). Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 11063-11068.
- Grasbon-Frodl, E. M., Nakao, N., Lindvall, O., and Brundin, P. (1996). Phenotypic development of the human embryonic striatal primordium: a study of cultured and grafted neurons from the lateral and medial ganglionic eminences. *Neuroscience* *73*, 171-183.
- Graybiel, A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* *13*, 244-254.
- Graybiel, A. M. (1995). Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* *5*, 733-741.
- Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W., and Kimura, M. (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* *265*, 1826-1831.
- Graybiel, A. M., Liu, F. C., and Dunnett, S. B. (1989). Intra-striatal grafts derived from fetal striatal primordia. I. Phenotypy and modular organization. *J Neurosci* *9*, 3250-3271.
- Graybiel, A. M., and Ragsdale, C. W., Jr. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 5723-5726.
- Graybiel, A. M., and Ragsdale, C. W., Jr. (1979). Fiber connections of the basal ganglia. *Prog Brain Res* *51*, 237-283.
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* *39*, 385-389.
- Han, Y. G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* *11*, 277-284.
- Handley, O. J., Naji, J. J., Dunnett, S. B., and Rosser, A. E. (2006). Pharmaceutical, cellular and genetic therapies for Huntington's disease. *Clin Sci (Lond)* *110*, 73-88.
- Hansson, O., Guatteo, E., Mercuri, N. B., Bernardi, G., Li, X. J., Castilho, R. F., and Brundin, P. (2001). Resistance to NMDA toxicity correlates with appearance of nuclear inclusions, behavioural deficits and changes in calcium homeostasis in mice transgenic for exon 1 of the huntington gene. *Eur J Neurosci* *14*, 1492-1504.
- Hantraye, P., Riche, D., Maziere, M., and Isacson, O. (1990). A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* *108*, 91-104.

Hantraye, P., Riche, D., Maziere, M., and Isacson, O. (1992). Intra-striatal transplantation of cross-species fetal striatal cells reduces abnormal movements in a primate model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 4187-4191.

Hatton, B. A., Knoepfler, P. S., Kenney, A. M., Rowitch, D. H., de Alboran, I. M., Olson, J. M., and Eisenman, R. N. (2006). N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res* *66*, 8655-8661.

Hebert, J. M., and Fishell, G. (2008). The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci*.

Hebert, J. M., and McConnell, S. K. (2000). Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol* *222*, 296-306.

Heins, N., Englund, M. C., Sjoblom, C., Dahl, U., Tønning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C., and Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* *22*, 367-376.

Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. (1997). Vertebrate neural induction. *Annu Rev Neurosci* *20*, 43-60.

Hockly, E., Richon, V. M., Woodman, B., Smith, D. L., Zhou, X., Rosa, E., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Mahal, A., Lowden, P. A., *et al.* (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2041-2046.

Hoffman, L. M., and Carpenter, M. K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *23*, 699-708.

Hong, S., Kang, U. J., Isacson, O., and Kim, K. S. (2008). Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *J Neurochem* *104*, 316-324.

Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M., and Wilson, S. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* *35*, 255-265.

Imarisio, S., Carmichael, J., Korolchuk, V., Chen, C. W., Saiki, S., Rose, C., Krishna, G., Davies, J. E., Ttofi, E., Underwood, B. R., and Rubinsztein, D. C. (2008). Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem J* *412*, 191-209.

Isacson, O., Brundin, P., Kelly, P. A., Gage, F. H., and Bjorklund, A. (1984). Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* *311*, 458-460.

Isacson, O., Pritzel, M., Dawbarn, D., Brundin, P., Kelly, P. A., Wiklund, L., Emson, P. C., Gage, F. H., Dunnett, S. B., and Bjorklund, A. (1987). Striatal neural transplants in the ibotenic acid-lesioned rat neostriatum. Cellular and functional aspects. *Ann N Y Acad Sci* *495*, 537-555.

Itsykson, P., Ilouz, N., Turetsky, T., Goldstein, R. S., Pera, M. F., Fishbein, I., Segal, M., and Reubinoff, B. E. (2005). Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci* *30*, 24-36.

Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* *132*, 567-582.

Jain, M., Armstrong, R. J., Barker, R. A., and Rosser, A. E. (2001). Cellular and molecular aspects of striatal development. *Brain Res Bull* *55*, 533-540.

Jain, M., Armstrong, R. J., Elneil, S., Rosser, A. E., and Barker, R. A. (2003). Migration and differentiation of transplanted human neural precursor cells. *Neuroreport* *14*, 1257-1262.

James, D., Levine, A. J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* *132*, 1273-1282.

Kan, L., Israsena, N., Zhang, Z., Hu, M., Zhao, L. R., Jalali, A., Sahni, V., and Kessler, J. A. (2004). Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. *Dev Biol* *269*, 580-594.

Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., and Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* *28*, 31-40.

Keene, C. D., Sonnen, J. A., Swanson, P. D., Kopyov, O., Leverenz, J. B., Bird, T. D., and Montine, T. J. (2007). Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients. *Neurology* 68, 2093-2098.

Kendall, A. L., Rayment, F. D., Torres, E. M., Baker, H. F., Ridley, R. M., and Dunnett, S. B. (1998). Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nat Med* 4, 727-729.

Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Ahn, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., Lee, L. A., Suh, C. S., Kim, S. H., Kim, D. W., and Moon, S. Y. (2005). Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 1228-1233.

Klatzmann, D., Valery, C. A., Bensimon, G., Marro, B., Boyer, O., Mokhtari, K., Diquet, B., Salzmann, J. L., and Philippon, J. (1998). A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther* 9, 2595-2604.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., and Lanza, R. (2007). Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat Protoc* 2, 1963-1972.

Kobayashi, D., Kobayashi, M., Matsumoto, K., Ogura, T., Nakafuku, M., and Shimamura, K. (2002). Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129, 83-93.

Krystkowiak, P., Gaura, V., Labalette, M., Rialland, A., Remy, P., Peschanski, M., and Bachoud-Levi, A. C. (2007). Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease. *PLoS ONE* 2, e166.

Kumar, M., Kaushalya, S. K., Gressens, P., Maiti, S., and Mani, S. (2008). Optimized derivation and functional characterization of 5-HT neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*.

Kunig, G., Leenders, K. L., Sanchez-Pernaute, R., Antonini, A., Vontobel, P., Verhagen, A., and Gunther, I. (2000). Benzodiazepine receptor binding in Huntington's disease: [¹¹C]flumazenil uptake measured using positron emission tomography. *Ann Neurol* 47, 644-648.

Labandeira-Garcia, J. L., and Guerra, M. J. (1994). Cortical stimulation induces fos expression in intrastriatal striatal grafts. *Brain Res* 652, 87-97.

Labandeira-Garcia, J. L., Victorin, K., Cunningham, E. T., Jr., and Bjorklund, A. (1991). Development of intrastriatal striatal grafts and their afferent innervation from the host. *Neuroscience* 42, 407-426.

Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puellas, L., Russell, H. R., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 368-379.

Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., and Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nat Neurosci* 6, 21-27.

Lee, H., Al Shamy, G., Elkabetz, Y., Schoefield, C. M., Harrision, N. L., Panagiotakos, G., Socci, N. D., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Directed Differentiation And Transplantation of Human Embryonic Stem Cell Derived Motoneurons. *Stem Cells*.

Li, S. H., Gutekunst, C. A., Hersch, S. M., and Li, X. J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J Neurosci* 18, 1261-1269.

Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., 3rd, Li, X. J., Margolis, R. L., Stine, O. C., Wagster, M. V., Abbott, M. H., Franz, M. L., Ranen, N. G., and et al. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11, 985-993.

Li, X. J., Du, Z. W., Zarnowska, E. D., Pankratz, M., Hansen, L. O., Pearce, R. A., and Zhang, S. C. (2005a). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 215-221.

Li, X. J., Hu, B. Y., Jones, S. A., Zhang, Y. S., Lavaute, T., Du, Z. W., and Zhang, S. C. (2008). Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. *Stem Cells* 26, 886-893.

Li, Y., Kolb, B., and Robinson, T. E. (2003). The location of persistent amphetamine-induced changes in the density of dendritic spines on medium spiny neurons in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuropsychopharmacology* 28, 1082-1085.

Li, Y., Powell, S., Brunette, E., Lebkowski, J., and Mandalam, R. (2005b). Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol Bioeng* 91, 688-698.

Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B., and Smith, A. G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol* 4, e121.

Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., *et al.* (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24, 185-187.

Lundberg, C., Martinez-Serrano, A., Cattaneo, E., McKay, R. D., and Bjorklund, A. (1997). Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol* 145, 342-360.

Lundberg, C., Winkler, C., Whittemore, S. R., and Bjorklund, A. (1996). Conditionally immortalized neural progenitor cells grafted to the striatum exhibit site-specific neuronal differentiation and establish connections with the host globus pallidus. *Neurobiol Dis* 3, 33-50.

Lupo, G., Harris, W. A., and Lewis, K. E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7, 103-114.

Ma, W., Tavakoli, T., Derby, E., Serebryakova, Y., Rao, M. S., and Mattson, M. P. (2008). Cell-Extracellular Matrix Interactions Regulate Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *BMC Dev Biol* 8, 90.

Mahant, N., McCusker, E. A., Byth, K., and Graham, S. (2003). Huntington's disease: clinical correlates of disability and progression. *Neurology* 61, 1085-1092.

Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., Sui, G., Cutler, D. J., Liu, Y., Brimble, S. N., *et al.* (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37, 1099-1103.

Mallon, B. S., Park, K. Y., Chen, K. G., Hamilton, R. S., and McKay, R. D. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1063-1075.

Mandel, R. J., Wictorin, K., Cenci, M. A., and Bjorklund, A. (1992). Fos expression in intrastriatal striatal grafts: regulation by host dopaminergic afferents. *Brain Res* 583, 207-215.

Marin, O., Anderson, S. A., and Rubenstein, J. L. (2000). Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20, 6063-6076.

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

Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F., and Varki, A. (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11, 228-232.

Martynoga, B., Morrison, H., Price, D. J., and Mason, J. O. (2005). Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol* 283, 113-127.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21, 503-511.

McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (1976). Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine and gaba in human controls and patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J Neurochem* 26, 65-76.

McGeer, P. L., McGeer, E. G., Scherer, U., and Singh, K. (1977). A glutamatergic corticostriatal path? *Brain Res* 128, 369-373.

McGuire, J. R., Rong, J., Li, S. H., and Li, X. J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem* 281, 3552-3559.

Mittoux, V., Ouary, S., Monville, C., Lisovoski, F., Poyot, T., Conde, F., Escartin, C., Robichon, R., Brouillet, E., Peschanski, M., and Hantraye, P. (2002). Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 22, 4478-4486.

Mo, Z., and Zecevic, N. (2007). Is Pax6 Critical for Neurogenesis in the Human Fetal Brain? *Cereb Cortex*.

Morton, A. J., Lagan, M. A., Skepper, J. N., and Dunnett, S. B. (2000). Progressive formation of inclusions in the striatum and hippocampus of mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurocytol* 29, 679-702.

Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D. W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S. P., *et al.* (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* 1, 423-434.

Mummery, C. L., Ward, D., and Passier, R. (2007). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes by coculture with endoderm in serum-free medium. *Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 1, Unit 1F 2.*

Munoz-Sanjuan, I., and Brivanlou, A. H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* 3, 271-280.

Naimi, S., Jeny, R., Hantraye, P., Peschanski, M., and Riche, D. (1996). Ontogeny of human striatal DARPP-32 neurons in fetuses and following xenografting to the adult rat brain. *Exp Neurol* 137, 15-25.

Nakao, N., and Brundin, P. (1997). Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinic acid or 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 76, 749-761.

Nakao, N., Grasbon-Frodl, E. M., Widner, H., and Brundin, P. (1996). DARPP-32-rich zones in grafts of lateral ganglionic eminence govern the extent of functional recovery in skilled paw reaching in an animal model of Huntington's disease. *Neuroscience* 74, 959-970.

Nakao, N., and Itakura, T. (2000). Fetal tissue transplants in animal models of Huntington's disease: the effects on damaged neuronal circuitry and behavioral deficits. *Prog Neurobiol* 61, 313-338.

Oh, S. K., Kim, H. S., Ahn, H. J., Seol, H. W., Kim, Y. Y., Park, Y. B., Yoon, C. J., Kim, D. W., Kim, S. H., and Moon, S. Y. (2005). Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* 23, 211-219.

Oliveira, J. M., Jekabsons, M. B., Chen, S., Lin, A., Rego, A. C., Goncalves, J., Ellerby, L. M., and Nicholls, D. G. (2007). Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice. *J Neurochem* 101, 241-249.

Olney, J. W., Adamo, N. J., and Ratner, A. (1971). Monosodium glutamate effects. *Science* 172, 294.

Olney, J. W., and Sharpe, L. G. (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166, 386-388.

Olsson, M., Bjorklund, A., and Campbell, K. (1998). Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence. *Neuroscience* 84, 867-876.

Olsson, M., Campbell, K., Wictorin, K., and Bjorklund, A. (1995). Projection neurons in fetal striatal transplants are predominantly derived from the lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* 69, 1169-1182.

Pakzaban, P., Deacon, T. W., Burns, L. H., and Isacson, O. (1993). Increased proportion of acetylcholinesterase-rich zones and improved morphological integration in host striatum of fetal grafts derived from the lateral but not the medial ganglionic eminence. *Exp Brain Res* 97, 13-22.

Palfi, S., Brouillet, E., Jarraya, B., Bloch, J., Jan, C., Shin, M., Conde, F., Li, X. J., Aebischer, P., Hantraye, P., and Deglon, N. (2007). Expression of mutated huntingtin fragment in the putamen is sufficient to produce abnormal movement in non-human primates. *Mol Ther* 15, 1444-1451.

Palfi, S., Conde, F., Riche, D., Brouillet, E., Dautry, C., Mittoux, V., Chibois, A., Peschanski, M., and Hantraye, P. (1998). Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* 4, 963-966.

Palfi, S., Ferrante, R. J., Brouillet, E., Beal, M. F., Dolan, R., Guyot, M. C., Peschanski, M., and Hantraye, P. (1996). Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 16, 3019-3025.

Panganiban, G., and Rubenstein, J. L. (2002). Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 129, 4371-4386.

Pankratz, M. T., Li, X. J., Lavaute, T. M., Lyons, E. A., Chen, X., and Zhang, S. C. (2007). Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. *Stem Cells* 25, 1511-1520.

Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., and Greenamyre, J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5, 731-736.

Panov, A. V., Lund, S., and Greenamyre, J. T. (2005). Ca²⁺-induced permeability transition in human lymphoblastoid cell mitochondria from normal and Huntington's disease individuals. *Mol Cell Biochem* 269, 143-152.

Parent, A., and Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 91-127.

Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.

Paulsen, J. S., Zimbelman, J. L., Hinton, S. C., Langbehn, D. R., Leveroni, C. L., Benjamin, M. L., Reynolds, N. C., and Rao, S. M. (2004). fMRI biomarker of early neuronal dysfunction in presymptomatic Huntington's Disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 25, 1715-1721.

Peiffer, I., Barbet, R., Zhou, Y. P., Li, M. L., Monier, M. N., Hatzfeld, A., and Hatzfeld, J. A. (2008). Use of xenofree matrices and molecularly-defined media to control human embryonic stem cell pluripotency: effect of low physiological TGF-beta concentrations. *Stem Cells Dev* 17, 519-533.

Perlow, M. J., Freed, W. J., Hoffer, B. J., Seiger, A., Olson, L., and Wyatt, R. J. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204, 643-647.

Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-12548.

Peschanski, M., Cesaro, P., and Hantraye, P. (1995). Rationale for intrastriatal grafting of striatal neuroblasts in patients with Huntington's disease. *Neuroscience* 68, 273-285.

Peschanski, M., and Dunnett, S. B. (2002). Cell therapy for Huntington's disease, the next step forward. *Lancet Neurol* 1, 81.

Poitras, L., Ghanem, N., Hatch, G., and Ekker, M. (2007). The proneural determinant MASH1 regulates forebrain *Dlx1/2* expression through the *I12b* intergenic enhancer. *Development* 134, 1755-1765.

Pruszak, J., Sonntag, K. C., Aung, M. H., Sanchez-Pernaute, R., and Isacson, O. (2007). Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem Cells* 25, 2257-2268.

Pundt, L. L., Kondoh, T., Conrad, J. A., and Low, W. C. (1996). Transplantation of human striatal tissue into a rodent model of Huntington's disease: phenotypic expression of transplanted neurons and host-to-graft innervation. *Brain Res Bull* 39, 23-32.

Rallu, M., Corbin, J. G., and Fishell, G. (2002). Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci* 3, 943-951.

Ranen, N. G., Stine, O. C., Abbott, M. H., Sherr, M., Codori, A. M., Franz, M. L., Chao, N. I., Chung, A. S., Pleasant, N., Callahan, C., and et al. (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet* 57, 593-602.

Rash, B. G., and Grove, E. A. (2007). Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog? *J Neurosci* 27, 11595-11603.

Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134-1140.

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.

Reuter, I., Tai, Y. F., Pavese, N., Chaudhuri, K. R., Mason, S., Polkey, C. E., Clough, C., Brooks, D. J., Barker, R. A., and Piccini, P. (2008). Long-term clinical and positron emission tomography outcome of fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 948-951.

Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12, 4565-4574.

Ribeiro, L. A., El-Jaick, K. B., Muenke, M., and Richieri-Costa, A. (2006). SIX3 mutations with holoprosencephaly. *Am J Med Genet A* 140, 2577-2583.

Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., and Cattaneo, E. (2001). Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* 276, 14545-14548.

Roberts, R. C., and DiFiglia, M. (1988). Localization of immunoreactive GABA and enkephalin and NADPH-diaphorase-positive neurons in fetal striatal grafts in the quinolinic-acid-lesioned rat neostriatum. *J Comp Neurol* 274, 406-421.

Rockabrand, E., Slepko, N., Pantalone, A., Nukala, V. N., Kazantsev, A., Marsh, J. L., Sullivan, P. G., Steffan, J. S., Sensi, S. L., and Thompson, L. M. (2007). The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Hum Mol Genet* 16, 61-77.

Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., and Carpenter, M. K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 229, 259-274.

Rosser, A. E., Barker, R. A., Armstrong, R. J., Elneil, S., Jain, M., Hurelbrink, C. B., Prentice, A., Carne, C., Thornton, S., Hutchinson, H., and Dunnett, S. B. (2003). Staging and preparation of human fetal striatal tissue for neural transplantation in Huntington's disease. *Cell Transplant* 12, 679-686.

Rossi, F., and Cattaneo, E. (2002). Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 3, 401-409.

Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F., and Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12, 1259-1268.

Roze, E., Saudou, F., and Caboche, J. (2008). Pathophysiology of Huntington's disease: from huntingtin functions to potential treatments. *Curr Opin Neurol* 21, 497-503.

Rutherford, A., Garcia-Munoz, M., Dunnett, S. B., and Arbuthnott, G. W. (1987). Electrophysiological demonstration of host cortical inputs to striatal grafts. *Neurosci Lett* 83, 275-281.

Sanchez-Pernaute, R., Studer, L., Ferrari, D., Perrier, A., Lee, H., Vinuela, A., and Isacson, O. (2005). Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyno-1) after transplantation. *Stem Cells* 23, 914-922.

Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N., Hashikawa, T., Uchiyama, Y., Tohyama, K., Bhide, P. G., Vonsattel, J. P., and DiFiglia, M. (2001). Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 161-172.

Sarichelou, I., Cappuccio, I., Ferranti, F., Mosillo, P., Ciceroni, C., Sale, P., Stocchi, F., Battaglia, G., Nicoletti, F., and Melchiorri, D. (2008). Metabotropic glutamate receptors regulate differentiation of embryonic stem cells into GABAergic neurons. *Cell Death Differ* 15, 700-707.

Sasai, Y., and De Robertis, E. M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol* 182, 5-20.

Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003). Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells* 21, 257-265.

Schwarcz, R., Whetsell, W. O., Jr., and Mangano, R. M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219, 316-318.

Semb, H. (2005). Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. *Apmis* 113, 743-750.

Seong, I. S., Ivanova, E., Lee, J. M., Choo, Y. S., Fossale, E., Anderson, M., Gusella, J. F., Laramie, J. M., Myers, R. H., Lesort, M., and MacDonald, M. E. (2005). HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet* 14, 2871-2880.

Sermon, K., De Rijcke, M., Lissens, W., De Vos, A., Platteau, P., Bonduelle, M., Devroey, P., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. (2002). Preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease with exclusion testing. *Eur J Hum Genet* 10, 591-598.

Shimamura, K., and Rubenstein, J. L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124, 2709-2718.

Smith, J. R., Vallier, L., Lupo, G., Alexander, M., Harris, W. A., and Pedersen, R. A. (2008). Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol* 313, 107-117.

Song, J., Lee, S. T., Kang, W., Park, J. E., Chu, K., Lee, S. E., Hwang, T., Chung, H., and Kim, M. (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesions. *Neurosci Lett* 423, 58-61.

Sonntag, K. C., Pruszak, J., Yoshizaki, T., van Arensbergen, J., Sanchez-Pernaute, R., and Isacson, O. (2007). Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. *Stem Cells* 25, 411-418.

Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B. L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y. Z., Greenwald, M., *et al.* (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739-743.

Stern, C. D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2, 92-98.

Stewart, R., Stojkovic, M., and Lako, M. (2006). Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer* 42, 1257-1272.

Stipanovich, A., Valjent, E., Matamales, M., Nishi, A., Ahn, J. H., Maroteaux, M., Bertran-Gonzalez, J., Brami-Cherrier, K., Enslin, H., Corbille, A. G., *et al.* (2008). A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 453, 879-884.

Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T., and Stojkovic, M. (2005). An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 306-314.

Storm, E. E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J. M., Martinez, S., McConnell, S. K., Martin, G. R., and Rubenstein, J. L. (2006). Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* 133, 1831-1844.

Strong, T. V., Tagle, D. A., Valdes, J. M., Elmer, L. W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K. W., Collins, F. S., and Albin, R. L. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5, 259-265.

Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2008). Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development* 135, 2969-2979.

Suter, D. M., and Krause, K. H. (2008). Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy. *J Pathol* 215, 355-368.

Szucsik, J. C., Witte, D. P., Li, H., Pixley, S. K., Small, K. M., and Potter, S. S. (1997). Altered forebrain and hindbrain development in mice mutant for the Gsh-2 homeobox gene. *Dev Biol* 191, 230-242.

Tabar, V., Panagiotakos, G., Greenberg, E. D., Chan, B. K., Sadelain, M., Gutin, P. H., and Studer, L. (2005). Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol* 23, 601-606.

Tao, W., and Lai, E. (1992). Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* 8, 957-966.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., and Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-7848.

Tole, S., Kaprielian, Z., Ou, S. K., and Patterson, P. H. (1995). FORSE-1: a positionally regulated epitope in the developing rat central nervous system. *J Neurosci* 15, 957-969.

Tole, S., and Patterson, P. H. (1995). Regionalization of the developing forebrain: a comparison of FORSE-1, Dlx-2, and BF-1. *J Neurosci* 15, 970-980.

Toresson, H., and Campbell, K. (2001). A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of Gsh2 mutant mice. *Development* 128, 4769-4780.

Toresson, H., Potter, S. S., and Campbell, K. (2000). Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development* 127, 4361-4371.

Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T. W., Rossant, J., and van der Kooy, D. (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 30, 65-78.

Trushina, E., Dyer, R. B., Badger, J. D., 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D. D., Vrieze, B. T., Legendre-Guillemin, V., McPherson, P. S., Mandavilli, B. S., *et al.* (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Biol* 24, 8195-8209.

Turner, C., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. (2007). Clinical correlates of mitochondrial function in Huntington's disease muscle. *Mov Disord* 22, 1715-1721.

Unger, C., Skottman, H., Blomberg, P., Dilber, M. S., and Hovatta, O. (2008). Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet* 17, R48-53.

Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J. C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P. J., Nairn, A. C., *et al.* (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 491-496.

Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118, 4495-4509.

van der Kooy, D. (1979). The organization of the thalamic, nigral and raphe cells projecting to the medial vs lateral caudate-putamen in rat. A fluorescent retrograde double labeling study. *Brain Res* 169, 381-387.

Vazey, E. M., Chen, K., Hughes, S. M., and Connor, B. (2006). Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 199, 384-396.

Vazin, T., Chen, J., Lee, C. T., Amable, R., and Freed, W. J. (2008). Assessment of stromal-derived inducing activity in the generation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1517-1525.

Vonsattel, J. P., and DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 369-384.

Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., and Richardson, E. P., Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44, 559-577.

Waclaw, R. R., Wang, B., and Campbell, K. (2004). The homeobox gene *Gsh2* is required for retinoid production in the embryonic mouse telencephalon. *Development* 131, 4013-4020.

Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet* 369, 218-228.

Wang, Y. L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K., and Kanazawa, I. (2005). Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci Res* 53, 241-249.

Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watanabe, Y., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8, 288-296.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S. I., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*.

Watts, C., McNamara, I. R., and Dunnett, S. B. (2000). Volume and differentiation of striatal grafts in rats: relationship to the number of cells implanted. *Cell Transplant* 9, 65-72.

Wexler, N. S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S. A., Gayan, J., *et al.* (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3498-3503.

Weydt, P., Pineda, V. V., Torrence, A. E., Libby, R. T., Satterfield, T. F., Lazarowski, E. R., Gilbert, M. L., Morton, G. J., Bammler, T. K., Strand, A. D., *et al.* (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* 4, 349-362.

Whishaw, I. Q., O'Connor, W. T., and Dunnett, S. B. (1986). The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain* 109 (Pt 5), 805-843.

Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128, 3759-3771.

Victorin, K., and Bjorklund, A. (1989). Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid-lesioned striatum--II. Cortical afferents. *Neuroscience* 30, 297-311.

Victorin, K., Brundin, P., Gustavii, B., Lindvall, O., and Bjorklund, A. (1990). Reformation of long axon pathways in adult rat central nervous system by human forebrain neuroblasts. *Nature* 347, 556-558.

Victorin, K., Isacson, O., Fischer, W., Nothias, F., Peschanski, M., and Bjorklund, A. (1988). Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid-lesioned striatum--I. Subcortical afferents. *Neuroscience* 27, 547-562.

Victorin, K., Ouimet, C. C., and Bjorklund, A. (1989). Intrinsic Organization and Connectivity of Intra-striatal Striatal Transplants in Rats as Revealed by DARPP-32 Immunohistochemistry: Specificity of Connections with the Lesioned Host Brain. *Eur J Neurosci* 1, 690-701.

Wilson, S. I., and Edlund, T. (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* 4 *Suppl*, 1161-1168.

Wu, Y., and Parent, A. (2000). Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human. *Brain Res* 863, 182-191.

Xiao, L., Yuan, X., and Sharkis, S. J. (2006). Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 1476-1486.

Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., and Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 971-974.

Xuan, S., Baptista, C. A., Balas, G., Tao, W., Soares, V. C., and Lai, E. (1995). Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* 14, 1141-1152.

Yamaguchi, T. P. (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol* 11, R713-724.

Yang, S. H., Cheng, P. H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J. J., Cheng, E. C., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., *et al.* (2008a). Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453, 921-924.

Yang, Z. J., Ellis, T., Markant, S. L., Read, T. A., Kessler, J. D., Bourbonoulas, M., Schuller, U., Machold, R., Fishell, G., Rowitch, D. H., *et al.* (2008b). Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14, 135-145.

Ying, Q. L., and Smith, A. G. (2003). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol* 365, 327-341.

Yun, K., Garel, S., Fischman, S., and Rubenstein, J. L. (2003). Patterning of the lateral ganglionic eminence by the Gsh1 and Gsh2 homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *J Comp Neurol* 461, 151-165.

Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1129-1133.

Zhou, J. M., Chu, J. X., and Chen, X. J. (2008). An improved protocol that induces human embryonic stem cells to differentiate into neural cells *in vitro*. *Cell Biol Int* 32, 80-85.

Zietlow, R., Pekarik, V., Armstrong, R. J., Tyers, P., Dunnett, S. B., and Rosser, A. E. (2005). The survival of neural precursor cell grafts is influenced by *in vitro* expansion. *J Anat* 207, 227-240.

Zuccato, C., Belyaev, N., Conforti, P., Ooi, L., Tartari, M., Papadimou, E., MacDonald, M., Fossale, E., Zeitlin, S., Buckley, N., and Cattaneo, E. (2007). Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci* 27, 6972-6983.

Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., *et al.* (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293, 493-498.

Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Timmusk, T., *et al.* (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35, 76-83.

Zuhlke, C., Riess, O., Bockel, B., Lange, H., and Thies, U. (1993). Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in the Huntington disease gene. *Hum Mol Genet* 2, 2063-2067.

Annexes

Annexe 1 - Article 2

Evolutionary forces shape the human RFPL1, 2, 3 genes toward a role in neocortex development.

Bonnefont J, Nikolaev SI, Perrier AL, Guo S, Cartier L, Sorce S, Laforge T, Aubry L, Khaitovich P, Peschanski M, Antonarakis SE, Krause KH.
Am J Hum Genet. 2008 Aug;83(2):208-18.

Evolutionary Forces Shape the Human *RFPL1,2,3* Genes toward a Role in Neocortex Development

Jérôme Bonnefont,^{1,5,*} Sergey I. Nikolaev,^{2,5} Anselme L. Perrier,³ Song Guo,⁴ Laetitia Cartier,¹ Silvia Sorce,¹ Tèrese Laforge,¹ Laetitia Aubry,³ Philipp Khaitovich,⁴ Marc Peschanski,³ Stylianos E. Antonarakis,² and Karl-Heinz Krause¹

The size and organization of the brain neocortex has dramatically changed during primate evolution. This is probably due to the emergence of novel genes after duplication events, evolutionary changes in gene expression, and/or acceleration in protein evolution. Here, we describe a human *Ret finger protein-like* (*hRFPL*)*1,2,3* gene cluster on chromosome 22, which is transactivated by the corticogenic transcription factor Pax6. High *hRFPL1,2,3* transcript levels were detected at the onset of neurogenesis in differentiating human embryonic stem cells and in the developing human neocortex, whereas the unique murine *RFPL* gene is expressed in liver but not in neural tissue. Study of the evolutionary history of the *RFPL* gene family revealed that the *RFPL1,2,3* gene ancestor emerged after the Euarchonta-Glires split. Subsequent duplication events led to the presence of multiple *RFPL1,2,3* genes in Catarrhini (~34 mya) resulting in an increase in gene copy number in the hominoid lineage. In Catarrhini, *RFPL1,2,3* expression profile diverged toward the neocortex and cerebellum over the liver. Importantly, humans showed a striking increase in cortical *RFPL1,2,3* expression in comparison to their cerebellum, and to chimpanzee and macaque neocortex. Acceleration in *RFPL*-protein evolution was also observed with signs of positive selection in the *RFPL1,2,3* cluster and two neofunctionalization events (acquisition of a specific *RFPL*-Defining Motif in all *RFPLs* and of a N-terminal 29 amino-acid sequence in catarrhinian *RFPL1,2,3*). Thus, we propose that the recent emergence and multiplication of the *RFPL1,2,3* genes contribute to changes in primate neocortex size and/or organization.

Introduction

The neocortex, which is the most recent brain structure, emerged with mammals approximately 200 million years ago (mya) and increased in size in many branches of mammalian evolution, mostly in the lineage of anthropoid primates.¹ With the emergence of the *Homo* genus (~2.5–3 mya), acceleration in cortical enlargement occurred, especially over the last two million years in which the total brain size went from 500–800 cm³ (*Homo habilis*) to 1200–1400 cm³ (*Homo sapiens*). Together with the size increase, transformations in the organization of the brain occurred as the two cerebral hemispheres developed specializations that led to the emergence of specific behavioral traits in human, such as the development of complex languages or tools, self-awareness, and cultures.²

At a developmental level, the generation of the cortical cells is triggered by modifications in cell-cycle kinetics of the neural progenitors leading to their differentiation.³ It has been reported that the cell-cycle parameters of the progenitors evolved in primates increasing the number of cortical cells produced,⁴ such an increase contributes to changes in neocortex development.^{3,5,6} However, the genetic basis of primate brain evolution remains obscure. Genome-wide approaches comparing human to other primates revealed that humans present an expansion in the copy number of genes involved in brain structure

and/or function⁷ and an increase in gene expression in the neocortex.^{8,9} Furthermore, genes involved in brain development show higher rates of protein evolution in the primate lineage leading to human.¹⁰ The latter has been particularly documented for the cell-cycle regulating *MCPH* gene family (MIM 251200), which are the only genes known to date to determine brain size.^{11–13}

The transcription factor Pax6 controls the specification of neural progenitors during corticogenesis.^{14,15} In mouse, *PAX6*-deficient cortical progenitors show during neurogenesis a shorter cell-cycle duration that impairs their differentiation,^{16–18} and in human, heterozygous *PAX6* mutation leads to cognitive impairments by altering cortical regionalization.¹⁹ However, the molecular mechanisms involved in Pax6-mediated corticogenesis are largely unknown. Interestingly, they could differ between species. Although Pax6 is found in neural progenitors of the ventricular and subventricular zones common to rodents and primates, its expression has also been detected in a large population of primate-specific neural progenitors located in the outer subventricular zone.^{6,20} Furthermore, different Pax6 binding sites have been identified in rodents and human, suggesting that Pax6 transactivates different gene networks in those species.²¹

In an effort to identify genes involved in neocortex evolution we set out to (1) identify new Pax6 target genes involved in human neurogenesis and (2) assess the

¹Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Geneva, Rue Michel-Servet 1, 1211 Geneva, Switzerland; ²Department of Genetic Medicine and Development, Faculty of Medicine, University of Geneva, Rue Michel-Servet 1, 1211 Geneva, Switzerland; ³I-STEM, INSERM/UEVE UMR 861, Genopole Campus 1, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry, France; ⁴Institute for Computational Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 320 Yue Yang Road, 200031 Shanghai, China

⁵These authors contributed equally to this work.

*Correspondence: jerome.bonnefont@medecine.unige.ch

DOI 10.1016/j.ajhg.2008.07.007. ©2008 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

evolutionary behavior of those genes. We identified the human *Ret-finger protein-like (hRFPL)1,2,3* genes as Pax6 targets and observed that they were highly expressed in human embryonic stem cell-derived neurogenesis and in human fetal neocortex. Evolutionary analyses and expression profiling of the *RFPL1,2,3* genes indicated that they showed signs of positive selection, an increase in gene copy number in the hominoid lineage, and a striking increase in cortical expression in human in comparison to chimpanzee and macaque.

Material and Methods

Cell Culture

Human HeLa-TAT cell lines were obtained from the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent; HEK293T cells were kindly provided by Dr. P. Salmon (Department of Fundamental Neurosciences, University of Geneva, Switzerland). Cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% fetal-bovine serum, penicillin and streptomycin (all from GIBCO-Invitrogen). SA-01 human embryonic stem cells (Cellartis AB) were maintained on a layer of mitotically inactivated STO feeder cells. They were cultured in DMEM/F12 Glutamax supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, penicillin and streptomycin, 0.55 mM β-mercaptoethanol (all from GIBCO-Invitrogen), and 10 ng/ml recombinant human FGF2 (Invitrogen). Cultures were fed daily and manually passed every 5–7 days.

Neuronal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells

Induction of neural progenitors and neuronal differentiation of SA-01 human embryonic stem cells were performed according to Perrier et al.,²² with slight modifications. In brief, the cells were plated on mitotically inactivated murine bone-marrow-derived stromal feeder MS5 cells in serum replacement (KSR) medium containing DMEM/F12 supplemented with 15% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, penicillin/streptomycin, and 0.55 mM β-mercaptoethanol (all from GIBCO-Invitrogen). After 12 days in these conditions, KSR medium was replaced by N2 medium (DMEM/F12 supplemented with 25 μg/ml insulin, 50 μg/ml transferrin, 100 μM putrescine, 30 nM selenium chloride, 20 nM progesterone [all from GIBCO-Invitrogen], penicillin and streptomycin). Medium was changed every 2–3 days, and growth factors were added. At day 24 of differentiation, rosette structures were mechanically collected and transferred to 15 μg/ml polyornithine- and 1 μg/ml laminin-coated culture dishes in N2 medium supplemented with growth factors. After 8–12 days, cells were exposed to Mg²⁺-free Hanks' Balanced Salt Solution for 3 hr at 37°C, spun at 500 × g for 5 min, resuspended in N2 medium, and plated onto polyornithine- and laminin-coated culture dishes (10⁵ cells per cm²). After two other passages in the same conditions, we differentiated the cells by replating them onto polyornithine- and laminin-coated culture dishes (25 to 50 × 10³ cells per cm²).

Microarray Transcriptome Analysis

Two days after transduction of HeLa cells with *GFP* or *PAX6*, total RNA from each sample was isolated, labeled, and hybridized to Affymetrix oligonucleotide-array-containing probes to 38,500 human genes. Total RNA was isolated from HeLa cells with Qiash-

redder kit (QIAGEN) and purified with QIAGEN RNeasy kit in accordance with the "RNA cleanup" protocol. All RNAs were of high and comparable quality as determined with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Biotinylation of 10 μg RNA, hybridization to Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 arrays, washing steps, and array scanning were carried out in accordance with Affymetrix protocols. Expression data were analyzed with GeneSpring GX 7 (Agilent Technologies). Arrays were scaled to the same average intensity with all probes on the array.

Real-Time Quantitative PCR

Total RNA from human embryonic stem cells was isolated with RNeasy Mini kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN). We removed residual genomic DNA by incubating the RNA solution with 30 u RNase-free DNase for 15 min at room temperature with RNase-Free DNase Set (QIAGEN). Human fetal brain total RNAs were obtained from Biochain Institute. Total RNA (1 μg) was reverse transcribed with the Superscript II kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Real-time PCR reactions were performed with a Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and a Chromo 4TM Real-Time system (Bio-Rad). The amplification efficiency of each pair of primers was determined by comparison with a standard curve generated with serially diluted cDNA of fetal brain. Quantification was performed at a threshold detection line (C_T value). The C_T of each target genes was normalized against that of the housekeeping genes, cyclophilin or eEF1A1. The 2^{-ΔΔC_T} method was used to determine the relative level of expression of each gene.²³ cDNAs from fetal or adult brain and adult testis were used as calibrators. The list of the primers used is given in Table S1, available online.

Immunocytochemistry

Three days after transduction, cells were washed in PBS and fixed with 2% paraformaldehyde (w/v) for 30 min at room temperature. After two washes in PBS/0.05% Tween-20 buffer, cells were permeabilized in PBS containing 0.5% (v/v) Triton X-100 for 30 min at room temperature and washed twice more in PBS/0.05% Tween-20 buffer. The fixed cells were then treated with PBS containing 1% fetal-calf serum (blocking buffer) for 30 min and incubated with Pax6 (1:100, Santa Cruz Biotechnology) and hRFPL1,2,3 (1:100, Abnova) primary antibodies for 1 hr at room temperature. After two washes in blocking buffer, cells were incubated with the secondary antibodies (Alexa Fluor 488 or 555 conjugates, 1:1000, Molecular Probes) for 1 hr at room temperature. The cells were finally washed twice in PBS/0.05% Tween-20 buffer, once in PBS buffer and once in distilled water before mounting with Fluorsave (Calbiochem). Visualization analysis was performed with an AxioSkop 2 Plus microscope equipped for epifluorescence and recorded with an AxioCam HR CCD camera and the AxioVision 4 software (Zeiss).

Chromatin-Immunoprecipitation Assay

We treated HeLa cells for 8 min at room temperature 48 hr after transduction with *GFP* or *PAX6* by adding to the culture medium 5 mM HEPES (pH 7.9), containing 10 mM NaCl and 1.1% formaldehyde. Fixation was stopped by an addition of 180 mM glycine. After one wash with PBS, we lysed the cells by pipetting them up and down in ice-cold 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% NP-40 supplemented with complete protease inhibitor (Roche). Nuclei were pelleted and lysed in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 0.5% sodium deoxycholate supplemented with

complete protease inhibitor. Crosslinked chromatin was sheared into 200–600 bp fragments by sonication, cleared by centrifugation at $15,000 \times g$ for 15 min, and stored at -80°C . A total of 20 μg chromatin supernatants were diluted (1:10) in ChIP buffer (200 mM HEPES [pH 7.9], 2 M NaCl, and 20 mM EDTA) supplemented with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon-sperm DNA and complete protease inhibitor. After preclearing the supernatants by rotating incubation for 30 min at 4°C with protein A-sepharose beads (Pierce), we stored half the chromatin at -20°C as the control chromatin input. The rest of the supernatant was then incubated overnight at 4°C with 20 μl of Pax6 antibody (Covance) and cleared by centrifugation at room temperature for 10 min at $8000 \times g$ before a 2 hr rotating incubation at room temperature in 20 μl protein A-sepharose beads. The beads were washed as follows: twice in ChIP buffer; twice in ChIP buffer supplemented with 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 0.1% sodium deoxycholate; twice in Tris-HCl (pH 8.0), 250 mM LiCl, 2 mM EDTA, and 0.5% sodium deoxycholate; once in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 0.1% NP-40. We eluted immune complexes by incubating them for 10 min at 65°C in 111 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1.11% SDS. Crosslinks of the immunoprecipitated DNA and the chromatin input were reversed by incubation for 2 hr at 42°C after addition of 20 mg/ml Proteinase K (QIAGEN) and 100 mM NaCl and further incubation overnight at 67°C . After extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and chloroform-isoamyl alcohol (24:1), DNA was precipitated with 100% ethanol in the presence of 20 μg glycogen (Fermentas) and 3 M sodium acetate. Chromatin pellets were resuspended in 100 μl TE buffer. The immunoprecipitated DNA and the input chromatin were analyzed by endpoint PCR (40 cycles) with Taq DNA Polymerase in a Q-solution-supplemented buffer in accordance with the manufacturer's instructions (QIAGEN) and promoter- and exon2-specific primers (Table S1). Design of the primers was performed according to the Pax6 putative binding sites identified in silico in the proximal region of the *RFPL1,2,3* promoters with the MatInspector server.

Comparative *RFPL1,2,3* Gene-Expression Array in Catarrhini

We used Affymetrix Human Exon 1.0 ST Arrays to measure gene-expression profiles in five to six humans, five to six chimpanzees, and two to four rhesus macaques from two age groups (adult and newborn) and in three tissues (neocortex, cerebellum and liver). All samples were sex and age matched to the best extent possible, and all had high RNA-quality preservation. To identify the expression differences between the species, we masked all probes that did not match the three genomes perfectly, leading to the use of three probes. Given the high homology of the three genes, we could not however discriminate them. To determine whether the signal intensity of a given probe was above the expected level of background noise, for each probe we compared its signal intensity to a distribution of signal intensities of the “antigenomic” probes with the same GC content provided by Affymetrix as an estimator of the unspecific background hybridization. The probe signal was classified as detected above the background if its intensity was greater than the 95% percentile of the background probes with the same GC content.²⁴ To further remove the possible systematic experimental differences among the arrays, we performed a PM-GCBG correction and quantile normalization by using “affy” R package. We calculated gene-expression intensities as the means of all probe intensities mapped to the *RFPL* genes. The ratios of expression levels were calculated within the species and/or tissues.

Genetic Analyses

We created the alignment of *RFPL* gene family with ENCODE genome alignment (ENM 004)²⁵ or by blasting human *RFPL* genes in the UCSC genome browser. To reveal the structure of the family, we first determined the internal structure of the catarrhinian *RFPL1,2,3* subfamily. Given the loss of the first exon of some genes (Table S6), we created the sequence alignment including the genes' intron and the second exon, which are present in all *RFPL1,2,3* sequences. The tree was rooted with a macaque *RFPL* gene closest to the *RFPL1,2,3* cluster. We next created the coding sequence alignment including all *RFPL1,2,3* genes found in the databases and the best BLAST hits of *hRFPL4,5,6* genes in Catarrhini. Out of 26 *RFPL* genes, we selected a set of 21 most likely functional genes by using the following criteria: standard gene structure (two coding exons), start of CDS with a start codon, termination with a stop codon, and no frameshift. ML phylogenetic analysis revealed the robust monophyly of *RFPL1,2,3* and *RFPL4,5,6* primate-specific clades. The phylogenetic reconstructions were performed by constraining the topology of the clusters using the best BLAST hits. We then rooted the topology with the three *RFPL* genes found in Laurasiatheria and subsequently the bifurcation between the 21 likely functional catarrhinian genes and the two genes found in Glires.

Estimations of K_A/K_S ratios (omegas) were made with CODEML program implemented in PAML package with model 1 (Figure S1). Assessment of selection acting on *RFPL1,2,3* gene family in Catarrhini after the duplication events was performed with branch-site model A (model = 2, NSSites = 2, fix_omega = 0; model = 2 options allowing two omegas, one for the foreground clade and the other for the rest of the tree). The null model was also branch-site model A with omega for the foreground clade (Catarrhini *RFPL1,2,3*) fixed to 1 (model = 2, NSSites = 2, fix_omega = 1, mega = 1). We also applied the branch model for the same clade (model = 2, NSSites = 0) with the null model specified by model = 0 and NSSites = 0. We used a likelihood ratio test (LRT) to assess the significance of the difference between the two models. Positively selected sites were estimated with the same method as well as the M2 and M8 models, whereas M1 and M7 were used as the null models respectively.

Statistical Analysis

Results are displayed as mean \pm standard error (SEM) because the criteria studied are all ratio level measurements (i.e., continuous variables). Analysis of the Pax6-elicited *hRFPL1* and *hRFPL2,3* expressions by qPCR was done with Student's unpaired t test for two group comparisons. Analyses of the *hRFPL1*, *hRFPL2,3*, and *hRFPL4,5,6* expressions during neural differentiation of human embryonic stem cells were performed by a one-way analysis of variance; this was followed by post hoc multiple comparisons with Tukey test. Analysis of correlations was performed with the Pearson product moment correlation. Expression changes in catarrhinian *RFPL1,2,3* genes were analyzed either by one-way ANOVA and then post hoc multiple comparisons with Tukey test (intraspecies divergence) or by Student's t test (interspecies divergence). For all tests, a p value that is less than 0.05 was taken as statistically significant.

Results

Pax6 Elicits the Expression of the Human *RFPL1,2,3* Genes

Given the importance of cell-cycle regulation during corticogenesis, we performed a microarray-expression analysis

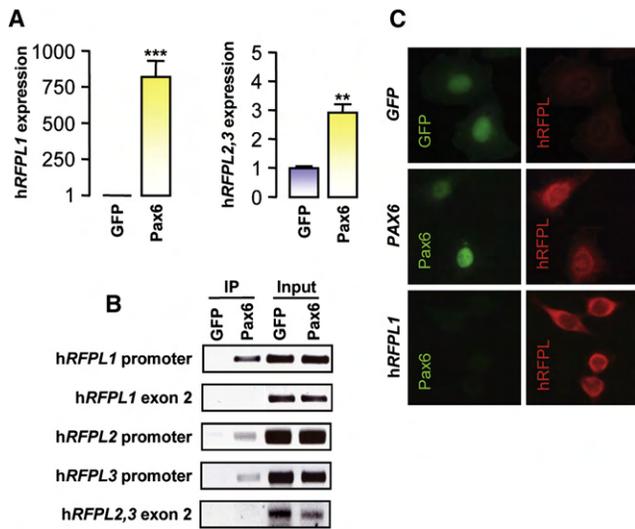


Figure 1. Pax6 Interacts with the hRFPL1,2,3 Gene Promoters and Induces Their Transcript and Protein Expressions

(A) *hRFPL1* and *hRFPL2,3* expressions were determined by real-time PCR after overexpression of GFP or Pax6 in HeLa cells. Transcript levels are indicated as the fold increase relative to the control level (GFP-transduced cells). *hRFPL2* and *hRFPL3* are detected by a common set of primers. Results are displayed as mean \pm standard error (SEM). Statistical analyses were done with Student's *t* test, $^{*}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$.

(B) In vivo binding of Pax6 to *hRFPL1,2,3* promoters was assessed by chromatin-immunoprecipitation assay. After chromatin immunoprecipitation with a Pax6 antibody, endpoint PCRs were performed with primers specific for each *hRFPL1,2,3* promoter or for exon 2 of each gene for visualization of nonspecific immunoprecipitation. "Input" represents dilutions of input chromatin used as PCR controls.

(C) Immunocytochemical detection of *hRFPL1,2,3* proteins in GFP- and Pax6-expressing HeLa cells with a pan-*hRFPL1,2,3* antibody. *hRFPL1* overexpression was used as a control for antibody specificity.

in Pax6-overexpressing HeLa cells, a reference human cell system for cell-cycle study.

Pax6 overexpression resulted in marked changes in the transcriptome (Table S6) and particularly modified the expression pattern of gene clusters involved in the control of the cell cycle (Figure S2). The most striking change was observed with the 800-fold increase in the human *Ret Finger Protein-Like 1* (*hRFPL1*) transcript level (Table S6), which was also obtained with real-time PCR (Figure 1A). We also observed a more moderate increase in *hRFPL2* and *hRFPL3* gene expressions (Table S6 and Figure 1A). Given the high homology between those two genes, we could not however discriminate their individual expression by real-time PCR. Putative Pax6 binding sites were predicted in silico on each *hRFPL1,2,3* promoters; chromatin-immunoprecipitation assay showed that Pax6 interacts in vivo with all of these promoters (Figure 1B). Finally, we examined whether Pax6-induced transcriptional changes led to *hRFPL1,2,3* protein expression. Using a pan-*hRFPL1,2,3* antibody, we observed *hRFPL* immunofluorescence in Pax6-expressing cells (Figure 1C). Taken together, those

data suggest that Pax6 could induce *hRFPL1,2,3* protein expressions through direct promoter transactivation.

hRFPL1,2,3 Genes Are Expressed during Neurogenesis In Vitro and In Vivo

We next examined *hRFPL1,2,3* expression profiles during neurogenesis in vitro and in vivo. During neural differentiation of human embryonic stem cells, virtually no *hRFPL1* and *hRFPL2,3* transcript levels were detected in *NANOG*-positive human embryonic stem cells, nor in *SIX3*- and *SOX1*-expressing neural precursors. Their expressions increased significantly at the onset of neurogenesis and were correlated to those of the GABAergic neuronal marker, *GAD67* (Figure 2A).

hRFPL1 and *hRFPL2,3* transcripts were also detected in the developing human fetal brain. *hRFPL1* transcripts were highest in the temporal lobe, and *hRFPL2,3* transcripts were highest in the frontal lobe. All transcripts were also detected in adult brain (Figure 2B).

Interestingly, a murine *RFPL* gene (*mRFPL*) was previously identified, but its expression had not been detected in the mouse adult brain.^{26–28} Thus, we further compared the expression profile of *mRFPL* with that of *hRFPL1,2,3* by PCR and did not detect any *mRFPL* transcript during mouse embryonic stem cell-derived neurogenesis, during in vitro maturation of primary cortical neurons, or in fetal, newborn, and adult brains (Figure S3).

Identification of the Likely Functional *RFPL* Genes

Given the absence of *mRFPL* brain expression, we investigated at what point during evolution the *RFPL* genes acquired brain expression by tracing their evolutionary history. We first searched for likely functional *RFPL* genes by using the ENCODE TBA genomic alignments (ENM 004)²⁵ and BLAT alignment in the UCSC genome browser. They were found only in boreoeutherian mammals, suggesting that the *RFPL* gene ancestor emerged ~100 mya (Table S2). Whereas one gene was identified in Laurasiatheria (dog, cat, and horse) and Glires (mouse and rat), multiple *RFPL* genes were found in Catarrhini (Great Apes and Old World monkeys), including six in human. Maximum-likelihood phylogenetic analysis showed that the set of likely functional genes in Catarrhini formed two isolated clusters: The first one grouped the genes orthologous to the human *hRFPL1,2,3* genes, whereas the second cluster grouped the genes orthologous to the human *hRFPL4,5,6* genes (Figure 3A).

The *RFPL1,2,3* Genes Are Restricted to Catarrhini

In addition to those likely functional genes, we identified in the marmoset genome a single degenerated *RFPL1,2,3*-like sequence and nonfunctional *RFPL4*, *RFPL5*, and *RFPL6* genes (Table S2), indicating that the duplication of the *RFPL* gene ancestor to generate the *RFPL1,2,3* and *RFPL4,5,6* gene progenitors originated at least ~57 mya, but after the Euarchonta-Glires split. Further, whereas the intrachromosomal duplication of the *RFPL4,5,6* gene

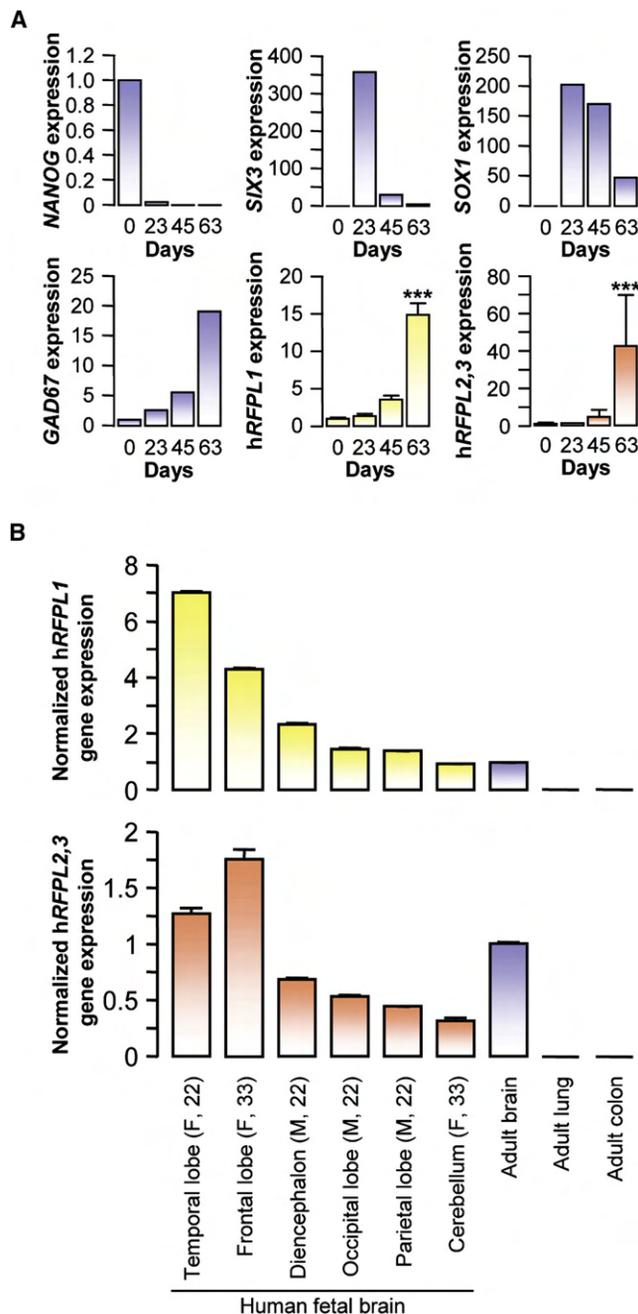


Figure 2. *hRFPL1,2,3* Genes Are Expressed during Human Neurogenesis In Vitro and In Vivo

(A) *hRFPL1* and *hRFPL2,3* expressions were determined by real-time PCR during human embryonic-stem-cells-derived neurogenesis and normalized to the cDNA level in fetal brain. Results are displayed as mean \pm standard error (SEM). *** $p < 0.001$ versus day 0 with one-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test. *hRFPL1* and *hRFPL2,3* expressions were correlated to those of the neuronal marker *GAD67* ($R^2 = 0.99$, $p = 0.003$ for *hRFPL1* versus *GAD67*; $R^2 = 0.98$, $p = 0.012$ for *hRFPL2,3* versus *GAD67* with Pearson product moment correlation). (B) *hRFPL1* and *hRFPL2,3* expressions were assessed in different structures of the developing brain and in adult neocortex by real-time PCR normalized to the level of expression observed in adult brain. The gender of the embryo (M, male; F, female) and its age in weeks are indicated in the parentheses. Results are displayed as mean \pm standard error (SEM).

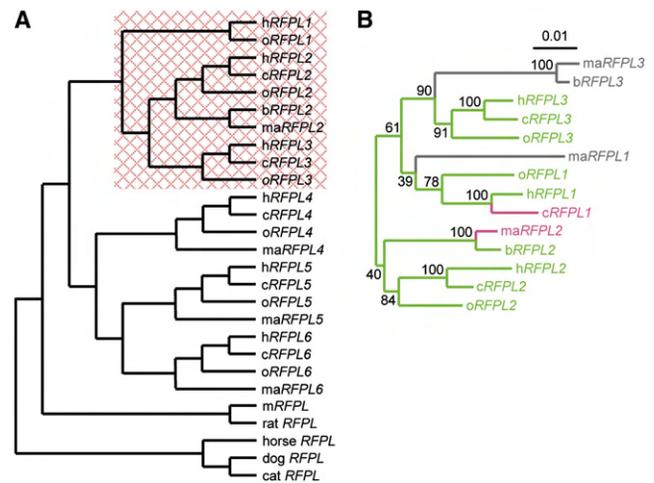


Figure 3. Topology of the RFPL Gene Family

(A) Phylogenetic tree based on *RFPL* coding sequences encoding the likely functional proteins in Laurasiatheria, Glires, and Catarrhini. The *RFPL1,2,3* clade shows a significant ($p < 0.0001$) positive selection or constraint relaxation that is indicated by the red box.

(B) ML phylogenetic tree of the catarrhinian *RFPL1,2,3* genes. The topology and branch lengths are based on concatenated alignments of the intron and the second exon. Branch lengths are scaled to the number of substitutions per site. Bootstrap support values are indicated at each node. Likely functional genes are shown in green, truncated genes are shown in pink, and nonfunctional genes are shown in gray. The following abbreviations are used in both panels: h, human; c, chimpanzee; o, orangutan; b, baboon; ma, macaque; and m, mouse.

progenitor was already present in marmoset, the lack of multiple *RFPL1,2,3*-like sequences in New World monkey suggested that the duplication of the *RFPL1,2,3* gene ancestor happened only in the Catarrhini lineage (~34 mya). This timing was supported by the calculation of pairwise K_s values among human, chimpanzee, and orangutan paralogs; such K_s values were at least two times lower than the average K_s divergence between human and marmoset genomes²⁹ (Table S3).

Not All *RFPL1,2,3* Genes Are Functional in Catarrhini

Analysis of the topology of the *RFPL1,2,3* clade with the sequences of the intron and the second exon of each gene showed that this subfamily forms three distinct clusters corresponding to the *RFPL1*, *RFPL2*, and *RFPL3* genes (Figure 3B).

However, only human and orangutan, among the genomes available, kept the complete open reading frame in the three *RFPL1,2,3* genes. In contrast, some RFPL-predicted polypeptides showed truncations (macaque *RFPL2* coding sequence has a frameshift leading to a stop codon; chimpanzee *RFPL1* 5' region including exon 1 was inverted, which might lead to the synthesis of a truncated protein only partially homologous to the other RFPLs). Macaque *RFPL1* and *RFPL3* and baboon *RFPL3* also lack an ORF after the loss of the first exon (Table S2).

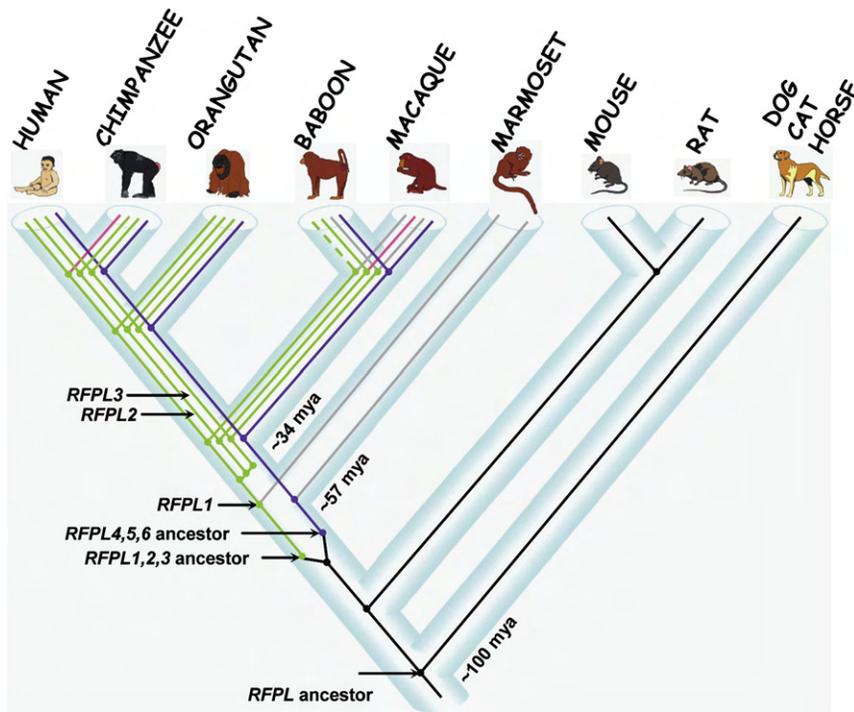


Figure 4. Timing of the Emergence of the *RFPL* Genes during Evolution

The *RFPL* gene ancestor is shown in black. Each likely functional *RFPL1*, *RFPL2*, and *RFPL3* gene is indicated in green, truncated genes are indicated in pink, and genes with no ORF are indicated in gray. Putative baboon *RFPL1* gene is indicated in a dashed line. The *RFPL4,5,6* gene cluster is represented by a single purple line. The estimated time of the gene-ancestor emergence and subsequent duplication events are indicated in millions of years (mya).

According to those results, **Figure 4** illustrates the presumptive timing of emergence and conservation of the *RFPL* genes over the course of evolution.

Only the *RFPL1,2,3* Gene Cluster Acquired Brain Expression during Evolution

We then examined by real-time PCR whether the *RFPL4,5,6* gene cluster also acquired neural expression during evolution. Similarly to the absence of *mRFPL* expression in mouse neural tissue, we did not detect any *hRFPL4,5,6* transcripts during human embryonic stem cell-derived neurogenesis or in human fetal and adult brains (**Figure S4**). Thus, *RFPL* expression in neural tissue seemed to be restricted to the catarrhinian-specific *RFPL1,2,3* gene cluster.

Cortical *RFPL1,2,3* Gene Expression Increases in Human in Comparison to Chimpanzee and Macaque

Several studies reported changes in gene expression in the brain of human and other nonhuman primates, and these findings seem to account for most phenotypic changes between those species.^{8,9} We therefore investigated whether *RFPL1,2,3* genes had different cerebral expression levels among humans, chimpanzees, and macaques and determined *RFPL1,2,3* gene-expression profiles in newborn and adult neocortex, cerebellum, and liver by using data from microarray transcriptome studies.

First, this approach showed that *RFPL1,2,3* expressions in newborn and adult brains were also detected in chimpanzees and macaques, indicating that those genes can also exert a role in brain development and function in other Catarrhini. Second, intraspecies comparisons of *RFPL1,2,3* expressions in different tissues pointed out

a change directed toward brain expression of the *RFPL1,2,3* genes through evolution. This was particularly marked in humans in which *RFPL1,2,3* transcript levels significantly increased in newborn and adult neocortex and cerebellum in comparison to the liver, used as a non-neural, *RFPL1,2,3*-expressing control tissue (**Figure 5A**). Furthermore, we observed in humans that *RFPL1,2,3* transcript levels in the neocortex were higher than in the cerebellum, both in newborn and adult tissues (**Figure 5A**). However, this divergence was not observed in chimpanzees and macaques, suggesting that the adaptation of *RFPL1,2,3* toward cortical expression is specific to human (**Figure 5A**). This was confirmed by interspecies comparisons that showed that cortical *RFPL1,2,3* transcript levels were significantly higher in humans than in chimpanzees or macaques, whereas only marginal interspecies differences were observed in the cerebellum (**Figure 5B**), and none was seen in the liver (data not shown).

Positive Selection Acted on the *RFPL1,2,3* Genes

We next examined the evolutionary forces that acted on the *RFPL1,2,3* coding sequences to determine the *RFPL1,2,3* protein evolution. First, we analyzed the structure of the *RFPL* proteins in silico to examine the acquisition of neofunctionalization (**Figure 6**). All *RFPL* proteins shared a RING domain and a B30.2 domain composed of the PRY and SPRY motifs. In addition, we identified a protein motif (Pfam B-20538) bridging those RING and B30.2 domains. Using BLAST search, we found that this domain was present in all *RFPLs* but was exclusively restricted to those proteins. We referred this first sign of neofunctionalization to as *RFPL*-defining motif (RDM; **Figure 6**). We found a second neofunctionalization event with the appearance of an upstream translational initiation site only in the catarrhinian *RFPL1,2,3* genes (except for chimpanzee and orangutan *RFPL3*). This would lead to a predicted synthesis of 29 additional amino acids on N-terminus (**Figure 6**). No putative protein domain could be defined from

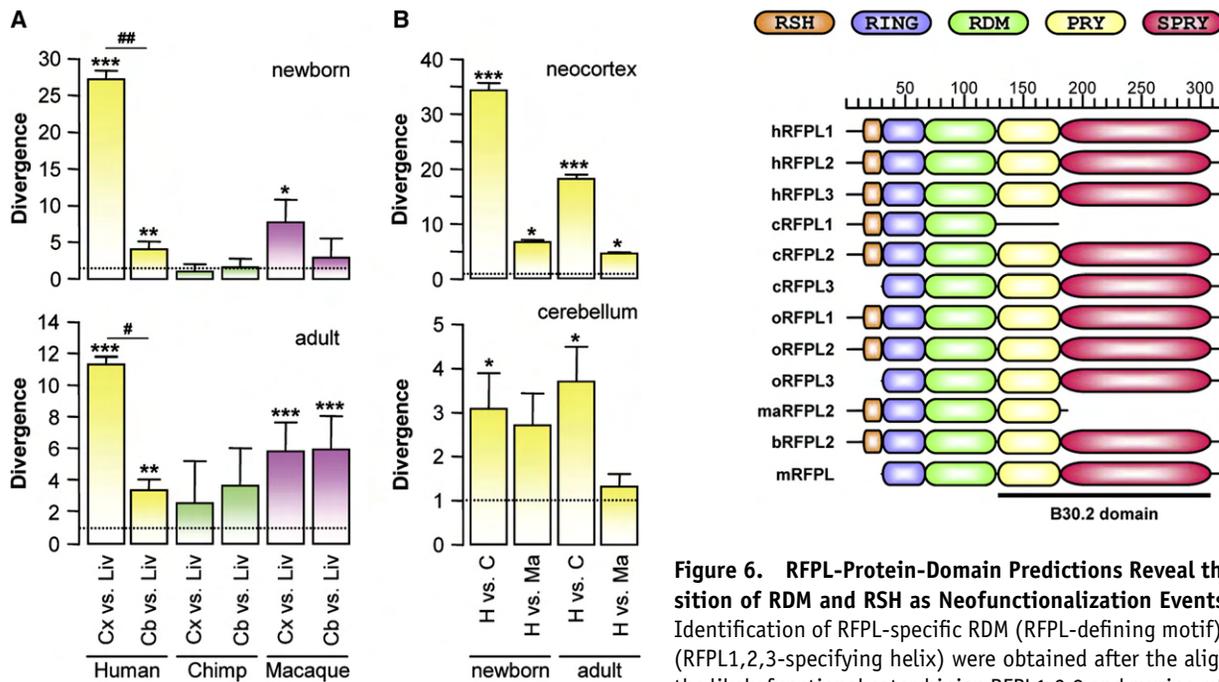


Figure 5. Expression Divergence between Human, Chimpanzee and Macaque *RFPL1,2,3* Genes in Brain

RFPL1,2,3 gene expressions were assessed in newborn and adult neocortex, cerebellum, and liver by microarray transcriptome studies in humans, chimpanzees, and macaques. Results are displayed as mean \pm standard error (SEM). The following abbreviations are used: Cx, neocortex; Cb, cerebellum; Liv, liver; H, human; C, chimpanzee; and Ma, macaque. (A) shows intraspecies divergence in *RFPL1,2,3* tissue expression. Cortical and cerebellar *RFPL1,2,3* transcript levels were normalized to that of the liver. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for neocortex or cerebellum versus liver; # $p < 0.05$ and ### $p < 0.01$ for neocortex versus cerebellum with one-way ANOVA followed by post hoc Tukey test. (B) shows interspecies divergence in cortical and cerebellar *RFPL1,2,3* expression levels. *hRFPL1,2,3* expressions were normalized to those in chimpanzee or macaque. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ with Student's t test.

the different analyses we performed. Nonetheless, secondary structure predictions indicated that this sequence contained a hydrophobic region potentially forming an alpha helix loop that we termed *RFPL1,2,3*-specifying helix (RSH). No other protein that contained the complete 29 amino acid sequence or RSH could be identified.

Second, we investigated whether the *RFPL1,2,3* genes evolved under positive selection by using the previously described topology (Figure 3A). We tested the a priori hypothesis that positive selection occurred after the duplications that led to the generation of the brain-expressed *RFPL1,2,3* cluster because selective pressure is often observed after duplication events to retain the functionality of the daughter genes.³⁰ The ratio of nonsynonymous (K_A) over synonymous (K_S) substitutions per site in *RFPL* genes was 0.53 on average, indicating that the whole family was under strong purifying selection. However, we observed a significant increase of nonsynonymous substitutions in the *RFPL1,2,3* cluster ($K_A/K_S = 0.73$), with both

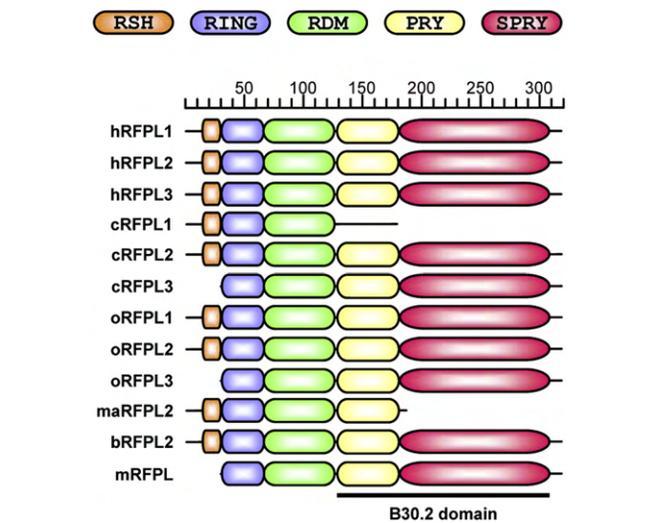


Figure 6. RFPL-Protein-Domain Predictions Reveal the Acquisition of RDM and RSH as Neofunctionalization Events

Identification of *RFPL*-specific RDM (*RFPL*-defining motif) and RSH (*RFPL1,2,3*-specifying helix) were obtained after the alignment of the likely functional catarrhinian *RFPL1,2,3* and murine *mRFPL* proteins and in silico predictions of secondary structures and protein domains. The following abbreviations are used: h, human; c, chimpanzee; o, orangutan; b, baboon; ma, macaque; and m, mouse.

branch-site and branch models, suggesting an accelerated protein evolution driven by positive selection or a relaxation of constraints (Figure 3A).

Positive selection was highly variable across sites in *RFPL1,2,3* genes. Estimates of K_A/K_S under models that allow for positive selection indicated that a fraction of sites (6.6% to 9.8%) evolved under positive selection (Table S4). The amino acid changes that occurred at sites inferred to have been under positive selection in *RFPL1,2,3* proteins in Catarrhini were mainly located in the B30.2 domain (Table S5).

Discussion

Understanding the genetic basis of human brain evolution remains a major challenge in neuroscience. Here we identified the human *RFPL1,2,3* genes (MIM 605968, 605969, and 605970) as Pax6 targets and showed that they are highly expressed at the onset of neurogenesis during neural differentiation of human embryonic stem cells. Expression of *hRFPL1,2,3* was also detected in vivo in human developing brain, and the highest levels were found in the temporal and frontal cortical lobes, which have been previously described to be developmentally influenced by Pax6.¹⁹ Given the similarity in the structure of all *RFPL*s and the interaction of *mRFPL* with cyclin B1,²⁷ *hRFPL1,2,3* could therefore affect cell-cycle parameters and exert a role in Pax6-dependent generation of cortical cells. Further, the present genetic analysis shows that the *hRFPL1,2,3* gene evolution exhibits the same features as those observed at the genome-wide level in the hominoid lineage, namely

an expansion in gene copy number, an increase in cortical expression, and an acceleration in protein evolution.

First, we observed that the *RFPL* gene family emerged recently in evolutionary terms and expanded during evolution after duplication events. However, only the *RFPL1,2,3* gene cluster acquired brain expression during this period. The *RFPL1,2,3* progenitor gene emerged after the Euarchonta-Glires split. Subsequently, intrachromosomal segmental duplications occurred in Catarrhini to generate the *RFPL1,2,3* gene cluster ~34 mya. Yet, the maintenance of the functionality of the three *RFPL1,2,3* genes was not ensured in Old World monkeys because of degeneration of some gene duplicates. Thus, an increase in *RFPL1,2,3* gene copy number occurred in the hominoid lineage; this is in accordance with the increase in gene copy number previously observed at the genome-wide level in the hominoid lineage with interspecies cDNA or BAC array-based comparative genomic hybridization.^{7,31,32} Interestingly, those changes were particularly pronounced in genes with a role in brain development and function.⁷ The regions enriched in copy-number variations have been found to be not randomly distributed in the genome but are preferentially present in regions thought to be genomically and evolutionary dynamic. This is particularly the case for the 22q11-q13 region,^{7,31} which corresponds to the chromosomal location of the *hRFPL1,2,3* gene cluster (22q12.2-q12.3).

Second, changes in transcript levels of the neocortex have been reported in several comparative studies between human and other primates.^{8,33–35} Those changes were predominantly directed toward an increase in mRNA levels in human,⁹ suggesting that constraints imposed by gene-dosage requirements are a major mechanism for the extensive modifications of brain development and physiology during primate evolution. Fitting with this concept, we observed an increase in brain *RFPL1,2,3* transcript level in humans, both in newborn and adult tissues, in comparison to chimpanzees and macaques. Such a divergence was dramatic in the neocortex. However, the fact that the number of likely functional *RFPL1,2,3* genes in Catarrhini (human = orangutan \geq chimpanzee > macaque) is not correlated with their neocortex expression level (human > macaque > chimpanzee) or with neocortex evolution in size (human > chimpanzee \approx orangutan > macaque) suggests that the increase in *RFPL1,2,3* transcript level can not be fully explained by the increase in gene copy number in the hominoid lineage. Hence, mutations in the regulatory sequences of those genes during evolution could have led to distinct transcriptional regulation of *RFPL1,2,3* expression in the developing neocortex of those different species. Remarkably, human is the only catarrhinian species among the three studied to have a *RFPL1,2,3* expression significantly higher in the neocortex than in the cerebellum, suggesting that the *RFPL1,2,3* gene expression was selectively directed toward the neocortex in the human lineage. In addition, the influence of posttranscriptional regulatory mechanisms could also be essential.

Indeed, noncoding mRNAs of *hRFPL1S* (MIM 605972) and *hRFPL3S* (MIM 605971) antisense genes covering large portions of the sense *hRFPL1* and *hRFPL3* genes have been detected.³⁶ In addition, the study of the human chromosome 22 revealed the presence of two *hRFPL* pseudogenes (*hRFPL ψ 1* and *hRFPL ψ 2*).³⁶ It has been shown that pseudogenes can still play important functional roles, notably by controlling, as antisense sequences, the stability of the messenger RNA of their homologous coding sequences.³⁷ Therefore, the *hRFPL* pseudogene copies may not be necessarily functionally silent; such a finding could also be important for the evolutionary differences in *RFPL1,2,3* expression profiles between Catarrhini.

Third, we found an acceleration in the evolution of the *RFPL* proteins. Neofunctionalization events, considered as signs of positive selection, are usually acquired to retain the functionality of the duplicate genes during evolution by providing them a new function.³⁰ In this line, the protein domains found in *RFPLs* appeared at different times of evolution and as such corroborates our estimated period of emergence of the *RFPL* gene ancestor. Whereas *SPRY* appeared in eukaryotes, *PRY* is limited to vertebrates in which it associated with *SPRY* to form the B30.2 domain. The acquisition of the RING-type zinc-finger domain in B30.2-containing proteins appeared later and led to the generation of the *TRIM* protein family that is restricted to primates, rodents, and *Xenopus*.³⁸ Here, we reported the emergence of *RFPL*-specific neofunctionalization events. One of these events was the acquisition of the *RFPL*-defining motif possibly after the gene-duplication event that led to the emergence of the *RFPL* gene ancestor. A second sign of neofunctionalization consisted of the appearance of an upstream transcriptional initiation site in catarrhinian *RFPL1,2,3* genes. Moreover, analysis of positive selection indicated that the *RFPL1,2,3* cluster showed an accelerated evolution. This was particularly notable after the duplication events that led to the emergence of the *RFPL1* ($K_A/K_S = 1.1$) and *RFPL2* ($K_A/K_S = 1.0$) genes. The observed positive selection is quantitatively moderate, and one could argue that it only reflects a relaxation of constraints. However, the different events we underlined above (gene duplication and retention, acquisition of brain expression, and emergence of new domains) are in favor of positive selection. We observed that the positive selection mainly affected the B30.2 domain, and this is in accordance with the selective pressure observed in this domain in the human lineage of other *TRIM* proteins in order to provide specificity to their protein-protein interactions.^{39–42} Indeed, the amino acids lining the binding surface of the B30.2 domain are highly variable, and it was suggested that B30.2 is a protein-interacting module recognizing specific partners rather than a consensus sequence motif.^{39,41} Moreover, binding studies with m*RFPL* indicated that its protein partners were binding to the B30.2 domain.²⁷ Therefore, the positive selection on the B30.2 domain in the *RFPL1,2,3* cluster may have provided the acquisition of new partners and/or more selectivity toward those identified with m*RFPL*.

Only a few specific genes with an impact on brain evolution and/or development have been identified so far; these are the *MCPH* genes (determining brain size), *FoxP2* (involved in speech production [MIM 605317]), *GLUD2* (a brain-specific glutamate dehydrogenase important for glutamate detoxification after neuron firing [MIM 300144]) and *HAR1* (coexpressed with reelin in Cajal-Retzius cells in human developing brain [MIM 610556]).^{43–46} The late emergence of the *RFPL1,2,3* gene cluster in Catarrhini is similar only to that of *GLUD2*, which appeared between ~18 and 23 mya after the hominoid-Old World monkey separation.⁴⁵ However, all those genes have in common a period of accelerated protein evolution that coincides together, as well as with a period of increased structural and functional complexity at the cerebral level.^{11–13,45–47} The increase in *RFPL1,2,3* gene expression in the human neocortex is also in accordance with the importance of gene-dosage constraints reported with *FoxP2* in human.⁴⁴ Thus, *RFPL1,2,3* duplications to generate a brain-expressed cluster could be an important feature for human brain development and evolution. This could be corroborated by the recent finding that a 1:22 chromosomal translocation in the q12.1-q12.3 region, where the *hRFPL1,2,3* gene cluster is located, has been observed in patients suffering from the Costello syndrome,⁴⁸ a disease showing mental retardation and multiple brain atrophies⁴⁹ (MIM 218040).

The impact of the *RFPL1,2,3* genes on neocortex development remains to be determined. Given their presumptive role on cell-cycle regulation,²⁷ one could establish parallels with other cell-cycle-progression mediators, such as p27^{Kip1} or the *MCPH* genes, and hypothesize that *RFPL1,2,3* genes may similarly control the balance between proliferative and neurogenic divisions and thereby the number of cortical cells generated. Hence, the *RFPL1,2,3* genes could alter the patterning of specific neocortical areas like the cyclin E-regulating p27^{Kip1}, whose differential expression in areas 17 and 18 of the neocortex affects neuron production that contributes to distinct areal cytoarchitectonics.⁵⁰ Alternatively, the *RFPL1,2,3* genes could affect brain morphology and size determination, like the *MCPH1-6* genes. Indeed, those genes control the type of cell division (proliferative versus neurogenic) by regulating mitotic-spindle orientation or centrosome assembly,^{3,51} and their mutations were shown to be responsible for primary microcephaly, a disorder characterized by a reduction in neocortex size due to a decrease in neuron production.⁵¹

In conclusion, our observations suggest that the recent emergence and multiplication of the *RFPL1,2,3* genes may be important for brain development and function in Catarrhini. Their role could be even more essential in humans because this species maintained the complete open reading frames in all three genes and shows a striking increase in cortical *RFPL1,2,3* expressions in comparison to chimpanzees and macaques. We therefore propose that the *RFPL1,2,3* genes may contribute to changes in cortical organization leading to the acquisition of human-specific behavioral traits.

Supplemental Data

Supplemental Data include four figures and six tables and can be found with this article online at <http://www.ajhg.org/>.

Acknowledgments

The authors thank Philippe Rousseau for his advice with the chromatin-immunoprecipitation assay, the genomic core facility of the University of Geneva for their assistance with the microarray transcriptome analysis, and Dr. Karen Bedard for helpful discussions with the manuscript. J.B. is supported by the Auvergne Regional Council and the Geneva Department of Public Education. S.E.A. is supported by grants from the Swiss National Science Foundation, the European Union, and the National Institutes of Health. K.H.K. is supported by the Swiss National Science Foundation.

Received: April 15, 2008

Revised: June 13, 2008

Accepted: July 7, 2008

Published online: July 24, 2008

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

“affy” R package, <http://www.bioconductor.org/packages/release/Software.html>

InterProScan server, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

MatInspector server, <http://www.genomatix.de>

MyHits server, <http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/index>

NCBI GenBank Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

Pfam server, <http://pfam.sanger.ac.uk/>

University of California Santa Cruz Genome Browser and Database, <http://www.genome.ucsc.edu/>

References

1. Kaas, J.H. (2005). From mice to men: The evolution of the large, complex human brain. *J. Biosci.* **30**, 155–165.
2. Kaas, J.H. (2006). Evolution of the neocortex. *Curr. Biol.* **16**, R910–R914.
3. Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 777–788.
4. Kornack, D.R., and Rakic, P. (1998). Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1242–1246.
5. Kornack, D.R. (2000). Neurogenesis and the evolution of cortical diversity: Mode, tempo, and partitioning during development and persistence in adulthood. *Brain Behav. Evol.* **55**, 336–344.
6. Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 438–450.
7. Fortna, A., Kim, Y., MacLaren, E., Marshall, K., Hahn, G., Meltesen, L., Brenton, M., Hink, R., Burgers, S., Hernandez-Bousard, T., et al. (2004). Lineage-specific gene duplication and loss in human and great ape evolution. *PLoS Biol.* **2**, E207.
8. Caceres, M., Lachuer, J., Zapala, M.A., Redmond, J.C., Kudo, L., Geschwind, D.H., Lockhart, D.J., Preuss, T.M., and Barlow, C. (2003). Elevated gene expression levels distinguish human

- from non-human primate brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 13030–13035.
9. Preuss, T.M., Caceres, M., Oldham, M.C., and Geschwind, D.H. (2004). Human brain evolution: Insights from microarrays. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 850–860.
 10. Dorus, S., Vallender, E.J., Evans, P.D., Anderson, J.R., Gilbert, S.L., Mahowald, M., Wyckoff, G.J., Malcom, C.M., and Lahn, B.T. (2004). Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell* *119*, 1027–1040.
 11. Evans, P.D., Anderson, J.R., Vallender, E.J., Choi, S.S., and Lahn, B.T. (2004). Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1139–1145.
 12. Evans, P.D., Anderson, J.R., Vallender, E.J., Gilbert, S.L., Malcom, C.M., Dorus, S., and Lahn, B.T. (2004). Adaptive evolution of *ASPM*, a major determinant of cerebral cortical size in humans. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 489–494.
 13. Evans, P.D., Vallender, E.J., and Lahn, B.T. (2006). Molecular evolution of the brain size regulator genes *CDK5RAP2* and *CENPJ*. *Gene* *375*, 75–79.
 14. Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.A., and Gotz, M. (2002). Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor *Pax6*. *Nat. Neurosci.* *5*, 308–315.
 15. Quinn, J.C., Molinek, M., Martynoga, B.S., Zaki, P.A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R.F., West, J.D., and Price, D.J. (2007). *Pax6* controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* *302*, 50–65.
 16. Gotz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). *Pax6* controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* *21*, 1031–1044.
 17. Guillemot, F. (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 639–647.
 18. Warren, N., Caric, D., Pratt, T., Clausen, J.A., Asavaritikrai, P., Mason, J.O., Hill, R.E., and Price, D.J. (1999). The transcription factor, *Pax6*, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb. Cortex* *9*, 627–635.
 19. Ellison-Wright, Z., Heyman, I., Frampton, I., Rubia, K., Chitnis, X., Ellison-Wright, I., Williams, S.C., Suckling, J., Simmons, A., and Bullmore, E. (2004). Heterozygous *PAX6* mutation, adult brain structure and fronto-striato-thalamic function in a human family. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 1505–1512.
 20. Bayatti, N., Moss, J.A., Sun, L., Ambrose, P., Ward, J.F., Lindsay, S., and Clowry, G.J. (2007). A molecular neuroanatomical study of the developing human neocortex from 8 to 17 postconceptional weeks revealing the early differentiation of the subplate and subventricular zone. *Cereb. Cortex* *18*, 1536–1548.
 21. Zhou, Y.H., Zheng, J.B., Gu, X., Saunders, G.F., and Yung, W.K. (2002). Novel *PAX6* binding sites in the human genome and the role of repetitive elements in the evolution of gene regulation. *Genome Res.* *12*, 1716–1722.
 22. Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of mid-brain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 12543–12548.
 23. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* *25*, 402–408.
 24. Clark, T.A., Schweitzer, A.C., Chen, T.X., Staples, M.K., Lu, G., Wang, H., Williams, A., and Blume, J.E. (2007). Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome Biol.* *8*, R64.
 25. Margulies, E.H., Cooper, G.M., Asimenos, G., Thomas, D.J., Dewey, C.N., Siepel, A., Birney, E., Keefe, D., Schwartz, A.S., Hou, M., et al. (2007). Analyses of deep mammalian sequence alignments and constraint predictions for 1% of the human genome. *Genome Res.* *17*, 760–774.
 26. Rajkovic, A., Lee, J.H., Yan, C., and Matzuk, M.M. (2002). The ret finger protein-like 4 gene, *Rfpl4*, encodes a putative E3 ubiquitin-protein ligase expressed in adult germ cells. *Mech. Dev.* *112*, 173–177.
 27. Suzumori, N., Burns, K.H., Yan, W., and Matzuk, M.M. (2003). *RFPL4* interacts with oocyte proteins of the ubiquitin-proteasome degradation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 550–555.
 28. Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* *445*, 168–176.
 29. Nikolaev, S.I., Montoya-Burgos, J.I., Popadin, K., Parand, L., Margulies, E.H., and Antonarakis, S.E. (2007). Life-history traits drive the evolutionary rates of mammalian coding and noncoding genomic elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 20443–20448.
 30. Lynch, M., and Conery, J.S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* *290*, 1151–1155.
 31. Goidts, V., Armengol, L., Schempp, W., Conroy, J., Nowak, N., Muller, S., Cooper, D.N., Estivill, X., Enard, W., Szamalek, J.M., et al. (2006). Identification of large-scale human-specific copy number differences by inter-species array comparative genomic hybridization. *Hum. Genet.* *119*, 185–198.
 32. Wilson, G.M., Flibotte, S., Missirlis, P.I., Marra, M.A., Jones, S., Thornton, K., Clark, A.G., and Holt, R.A. (2006). Identification by full-coverage array CGH of human DNA copy number increases relative to chimpanzee and gorilla. *Genome Res.* *16*, 173–181.
 33. Enard, W., Khaitovich, P., Klose, J., Zollner, S., Heissig, F., Gialvalisco, P., Nieselt-Struwe, K., Muchmore, E., Varki, A., Ravid, R., et al. (2002). Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* *296*, 340–343.
 34. Khaitovich, P., Muetzel, B., She, X., Lachmann, M., Hellmann, I., Dietzsch, J., Steigele, S., Do, H.H., Weiss, G., Enard, W., et al. (2004). Regional patterns of gene expression in human and chimpanzee brains. *Genome Res.* *14*, 1462–1473.
 35. Khaitovich, P., Enard, W., Lachmann, M., and Paabo, S. (2006). Evolution of primate gene expression. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 693–702.
 36. Seroussi, E., Kedra, D., Pan, H.Q., Peyrard, M., Schwartz, C., Scambler, P., Donnai, D., Roe, B.A., and Dumanski, J.P. (1999). Duplications on human chromosome 22 reveal a novel Ret Finger Protein-like gene family with sense and endogenous antisense transcripts. *Genome Res.* *9*, 803–814.
 37. Hirotsune, S., Yoshida, N., Chen, A., Garrett, L., Sugiyama, F., Takahashi, S., Yagami, K., Wynshaw-Boris, A., and Yoshiki, A. (2003). An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* *423*, 91–96.
 38. Rhodes, D.A., de Bono, B., and Trowsdale, J. (2005). Relationship between *SPRY* and *B30.2* protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology* *116*, 411–417.

39. Chae, J.J., Wood, G., Masters, S.L., Richard, K., Park, G., Smith, B.J., and Kastner, D.L. (2006). The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 9982–9987.
40. Newman, R.M., Hall, L., Connole, M., Chen, G.L., Sato, S., Yuste, E., Diehl, W., Hunter, E., Kaur, A., Miller, G.M., et al. (2006). Balancing selection and the evolution of functional polymorphism in Old World monkey TRIM5alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 19134–19139.
41. Woo, J.S., Imm, J.H., Min, C.K., Kim, K.J., Cha, S.S., and Oh, B.H. (2006). Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J.* *25*, 1353–1363.
42. Sawyer, S.L., Wu, L.I., Emerman, M., and Malik, H.S. (2005). Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 2832–2837.
43. Tang, B.L. (2006). Molecular genetic determinants of human brain size. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 911–916.
44. Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Copp, A., and Mishkin, M. (2005). FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 131–138.
45. Burki, F., and Kaessmann, H. (2004). Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat. Genet.* *36*, 1061–1063.
46. Pollard, K.S., Salama, S.R., Lambert, N., Lambot, M.A., Coppens, S., Pedersen, J.S., Katzman, S., King, B., Onodera, C., Siepel, A., et al. (2006). An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* *443*, 167–172.
47. Krause, J., Lalueza-Fox, C., Orlando, L., Enard, W., Green, R.E., Burbano, H.A., Hublin, J.J., Hanni, C., Fortea, J., de la Rasilla, M., et al. (2007). The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Curr. Biol.* *17*, 1908–1912.
48. Bertelli, M., Cecchin, S., Fabbri, A., Lapucci, C., and Gasparini, P. (2006). Exclusion of chromosome region 22q12.1-q12.3 as a second locus for Costello syndrome. *Panminerva Med.* *48*, 145–146.
49. Roberts, A., Allanson, J., Jadico, S.K., Kavamura, M.I., Noonan, J., Opitz, J.M., Young, T., and Neri, G. (2006). The cardiofaciocutaneous syndrome. *J. Med. Genet.* *43*, 833–842.
50. Lukaszewicz, A., Savatier, P., Cortay, V., Giroud, P., Huissoud, C., Berland, M., Kennedy, H., and Dehay, C. (2005). G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron* *47*, 353–364.
51. Woods, C.G., Bond, J., and Enard, W. (2005). Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): A review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am. J. Hum. Genet.* *76*, 717–728.

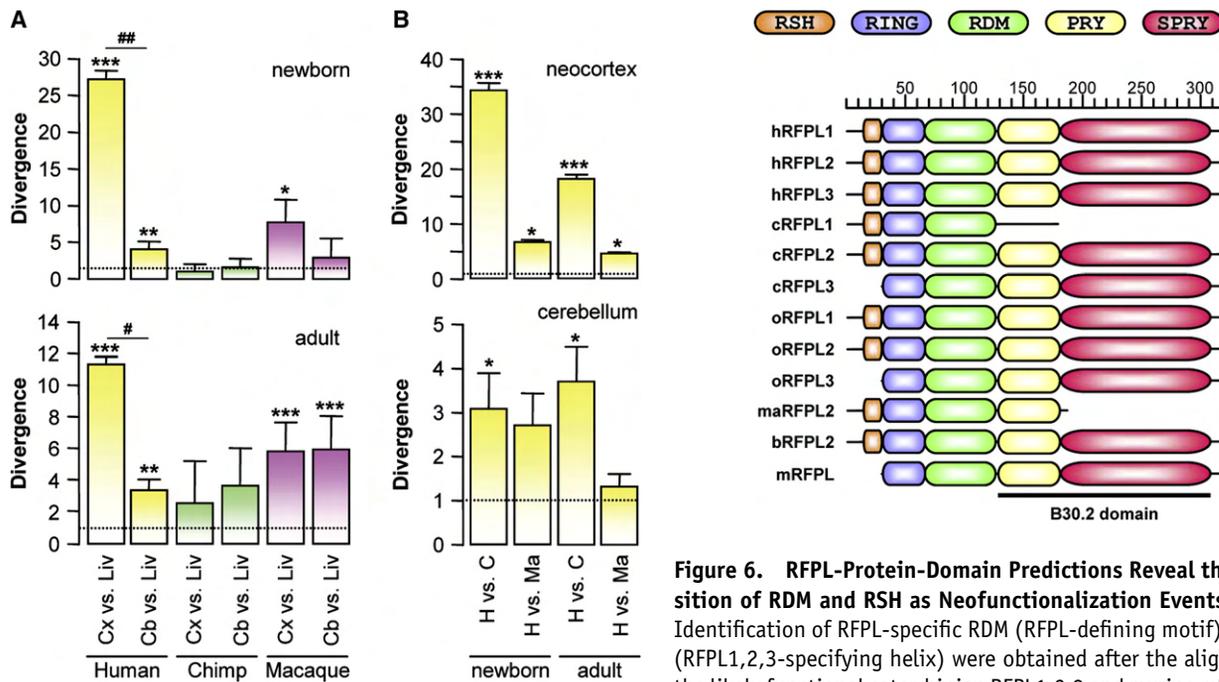


Figure 5. Expression Divergence between Human, Chimpanzee and Macaque *RFPL1,2,3* Genes in Brain

RFPL1,2,3 gene expressions were assessed in newborn and adult neocortex, cerebellum, and liver by microarray transcriptome studies in humans, chimpanzees, and macaques. Results are displayed as mean \pm standard error (SEM). The following abbreviations are used: Cx, neocortex; Cb, cerebellum; Liv, liver; H, human; C, chimpanzee; and Ma, macaque. (A) shows intraspecies divergence in *RFPL1,2,3* tissue expression. Cortical and cerebellar *RFPL1,2,3* transcript levels were normalized to that of the liver. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for neocortex or cerebellum versus liver; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ for neocortex versus cerebellum with one-way ANOVA followed by post hoc Tukey test. (B) shows interspecies divergence in cortical and cerebellar *RFPL1,2,3* expression levels. *hRFPL1,2,3* expressions were normalized to those in chimpanzee or macaque. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ with Student's t test.

the different analyses we performed. Nonetheless, secondary structure predictions indicated that this sequence contained a hydrophobic region potentially forming an alpha helix loop that we termed *RFPL1,2,3*-specifying helix (RSH). No other protein that contained the complete 29 amino acid sequence or RSH could be identified.

Second, we investigated whether the *RFPL1,2,3* genes evolved under positive selection by using the previously described topology (Figure 3A). We tested the a priori hypothesis that positive selection occurred after the duplications that led to the generation of the brain-expressed *RFPL1,2,3* cluster because selective pressure is often observed after duplication events to retain the functionality of the daughter genes.³⁰ The ratio of nonsynonymous (K_A) over synonymous (K_S) substitutions per site in *RFPL* genes was 0.53 on average, indicating that the whole family was under strong purifying selection. However, we observed a significant increase of nonsynonymous substitutions in the *RFPL1,2,3* cluster ($K_A/K_S = 0.73$), with both

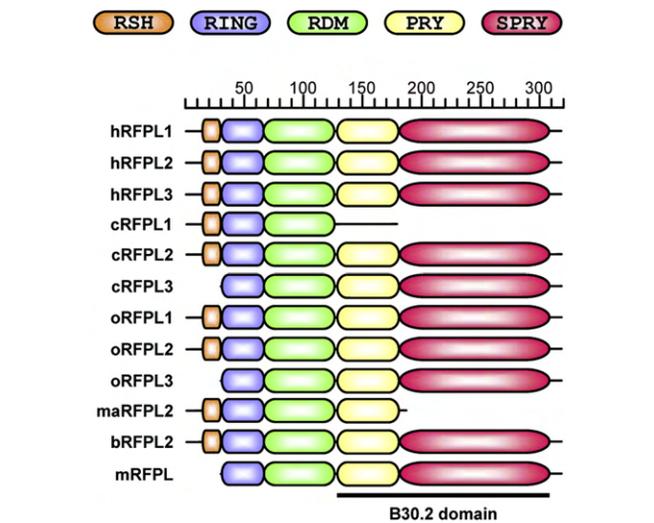


Figure 6. RFPL-Protein-Domain Predictions Reveal the Acquisition of RDM and RSH as Neofunctionalization Events

Identification of *RFPL*-specific RDM (*RFPL*-defining motif) and RSH (*RFPL1,2,3*-specifying helix) were obtained after the alignment of the likely functional catarrhinian *RFPL1,2,3* and murine *mRFPL* proteins and in silico predictions of secondary structures and protein domains. The following abbreviations are used: h, human; c, chimpanzee; o, orangutan; b, baboon; ma, macaque; and m, mouse.

branch-site and branch models, suggesting an accelerated protein evolution driven by positive selection or a relaxation of constraints (Figure 3A).

Positive selection was highly variable across sites in *RFPL1,2,3* genes. Estimates of K_A/K_S under models that allow for positive selection indicated that a fraction of sites (6.6% to 9.8%) evolved under positive selection (Table S4). The amino acid changes that occurred at sites inferred to have been under positive selection in *RFPL1,2,3* proteins in Catarrhini were mainly located in the B30.2 domain (Table S5).

Discussion

Understanding the genetic basis of human brain evolution remains a major challenge in neuroscience. Here we identified the human *RFPL1,2,3* genes (MIM 605968, 605969, and 605970) as Pax6 targets and showed that they are highly expressed at the onset of neurogenesis during neural differentiation of human embryonic stem cells. Expression of *hRFPL1,2,3* was also detected in vivo in human developing brain, and the highest levels were found in the temporal and frontal cortical lobes, which have been previously described to be developmentally influenced by Pax6.¹⁹ Given the similarity in the structure of all *RFPLs* and the interaction of *mRFPL* with cyclin B1,²⁷ *hRFPL1,2,3* could therefore affect cell-cycle parameters and exert a role in Pax6-dependent generation of cortical cells. Further, the present genetic analysis shows that the *hRFPL1,2,3* gene evolution exhibits the same features as those observed at the genome-wide level in the hominoid lineage, namely

an expansion in gene copy number, an increase in cortical expression, and an acceleration in protein evolution.

First, we observed that the *RFPL* gene family emerged recently in evolutionary terms and expanded during evolution after duplication events. However, only the *RFPL1,2,3* gene cluster acquired brain expression during this period. The *RFPL1,2,3* progenitor gene emerged after the Euarchonta-Glires split. Subsequently, intrachromosomal segmental duplications occurred in Catarrhini to generate the *RFPL1,2,3* gene cluster ~34 mya. Yet, the maintenance of the functionality of the three *RFPL1,2,3* genes was not ensured in Old World monkeys because of degeneration of some gene duplicates. Thus, an increase in *RFPL1,2,3* gene copy number occurred in the hominoid lineage; this is in accordance with the increase in gene copy number previously observed at the genome-wide level in the hominoid lineage with interspecies cDNA or BAC array-based comparative genomic hybridization.^{7,31,32} Interestingly, those changes were particularly pronounced in genes with a role in brain development and function.⁷ The regions enriched in copy-number variations have been found to be not randomly distributed in the genome but are preferentially present in regions thought to be genomically and evolutionary dynamic. This is particularly the case for the 22q11-q13 region,^{7,31} which corresponds to the chromosomal location of the *hRFPL1,2,3* gene cluster (22q12.2-q12.3).

Second, changes in transcript levels of the neocortex have been reported in several comparative studies between human and other primates.^{8,33–35} Those changes were predominantly directed toward an increase in mRNA levels in human,⁹ suggesting that constraints imposed by gene-dosage requirements are a major mechanism for the extensive modifications of brain development and physiology during primate evolution. Fitting with this concept, we observed an increase in brain *RFPL1,2,3* transcript level in humans, both in newborn and adult tissues, in comparison to chimpanzees and macaques. Such a divergence was dramatic in the neocortex. However, the fact that the number of likely functional *RFPL1,2,3* genes in Catarrhini (human = orangutan \geq chimpanzee > macaque) is not correlated with their neocortex expression level (human > macaque > chimpanzee) or with neocortex evolution in size (human > chimpanzee \approx orangutan > macaque) suggests that the increase in *RFPL1,2,3* transcript level can not be fully explained by the increase in gene copy number in the hominoid lineage. Hence, mutations in the regulatory sequences of those genes during evolution could have led to distinct transcriptional regulation of *RFPL1,2,3* expression in the developing neocortex of those different species. Remarkably, human is the only catarrhian species among the three studied to have a *RFPL1,2,3* expression significantly higher in the neocortex than in the cerebellum, suggesting that the *RFPL1,2,3* gene expression was selectively directed toward the neocortex in the human lineage. In addition, the influence of posttranscriptional regulatory mechanisms could also be essential.

Indeed, noncoding mRNAs of *hRFPL1S* (MIM 605972) and *hRFPL3S* (MIM 605971) antisense genes covering large portions of the sense *hRFPL1* and *hRFPL3* genes have been detected.³⁶ In addition, the study of the human chromosome 22 revealed the presence of two *hRFPL* pseudogenes (*hRFPL ψ 1* and *hRFPL ψ 2*).³⁶ It has been shown that pseudogenes can still play important functional roles, notably by controlling, as antisense sequences, the stability of the messenger RNA of their homologous coding sequences.³⁷ Therefore, the *hRFPL* pseudogene copies may not be necessarily functionally silent; such a finding could also be important for the evolutionary differences in *RFPL1,2,3* expression profiles between Catarrhini.

Third, we found an acceleration in the evolution of the *RFPL* proteins. Neofunctionalization events, considered as signs of positive selection, are usually acquired to retain the functionality of the duplicate genes during evolution by providing them a new function.³⁰ In this line, the protein domains found in *RFPLs* appeared at different times of evolution and as such corroborates our estimated period of emergence of the *RFPL* gene ancestor. Whereas *SPRY* appeared in eukaryotes, *PRY* is limited to vertebrates in which it associated with *SPRY* to form the B30.2 domain. The acquisition of the RING-type zinc-finger domain in B30.2-containing proteins appeared later and led to the generation of the *TRIM* protein family that is restricted to primates, rodents, and *Xenopus*.³⁸ Here, we reported the emergence of *RFPL*-specific neofunctionalization events. One of these events was the acquisition of the *RFPL*-defining motif possibly after the gene-duplication event that led to the emergence of the *RFPL* gene ancestor. A second sign of neofunctionalization consisted of the appearance of an upstream transcriptional initiation site in catarrhian *RFPL1,2,3* genes. Moreover, analysis of positive selection indicated that the *RFPL1,2,3* cluster showed an accelerated evolution. This was particularly notable after the duplication events that led to the emergence of the *RFPL1* ($K_A/K_S = 1.1$) and *RFPL2* ($K_A/K_S = 1.0$) genes. The observed positive selection is quantitatively moderate, and one could argue that it only reflects a relaxation of constraints. However, the different events we underlined above (gene duplication and retention, acquisition of brain expression, and emergence of new domains) are in favor of positive selection. We observed that the positive selection mainly affected the B30.2 domain, and this is in accordance with the selective pressure observed in this domain in the human lineage of other *TRIM* proteins in order to provide specificity to their protein-protein interactions.^{39–42} Indeed, the amino acids lining the binding surface of the B30.2 domain are highly variable, and it was suggested that B30.2 is a protein-interacting module recognizing specific partners rather than a consensus sequence motif.^{39,41} Moreover, binding studies with m*RFPL* indicated that its protein partners were binding to the B30.2 domain.²⁷ Therefore, the positive selection on the B30.2 domain in the *RFPL1,2,3* cluster may have provided the acquisition of new partners and/or more selectivity toward those identified with m*RFPL*.

Only a few specific genes with an impact on brain evolution and/or development have been identified so far; these are the *MCPH* genes (determining brain size), *FoxP2* (involved in speech production [MIM 605317]), *GLUD2* (a brain-specific glutamate dehydrogenase important for glutamate detoxification after neuron firing [MIM 300144]) and *HAR1* (coexpressed with reelin in Cajal-Retzius cells in human developing brain [MIM 610556]).^{43–46} The late emergence of the *RFPL1,2,3* gene cluster in Catarrhini is similar only to that of *GLUD2*, which appeared between ~18 and 23 mya after the hominoid-Old World monkey separation.⁴⁵ However, all those genes have in common a period of accelerated protein evolution that coincides together, as well as with a period of increased structural and functional complexity at the cerebral level.^{11–13,45–47} The increase in *RFPL1,2,3* gene expression in the human neocortex is also in accordance with the importance of gene-dosage constraints reported with *FoxP2* in human.⁴⁴ Thus, *RFPL1,2,3* duplications to generate a brain-expressed cluster could be an important feature for human brain development and evolution. This could be corroborated by the recent finding that a 1:22 chromosomal translocation in the q12.1-q12.3 region, where the *hRFPL1,2,3* gene cluster is located, has been observed in patients suffering from the Costello syndrome,⁴⁸ a disease showing mental retardation and multiple brain atrophies⁴⁹ (MIM 218040).

The impact of the *RFPL1,2,3* genes on neocortex development remains to be determined. Given their presumptive role on cell-cycle regulation,²⁷ one could establish parallels with other cell-cycle-progression mediators, such as p27^{Kip1} or the *MCPH* genes, and hypothesize that *RFPL1,2,3* genes may similarly control the balance between proliferative and neurogenic divisions and thereby the number of cortical cells generated. Hence, the *RFPL1,2,3* genes could alter the patterning of specific neocortical areas like the cyclin E-regulating p27^{Kip1}, whose differential expression in areas 17 and 18 of the neocortex affects neuron production that contributes to distinct areal cytoarchitectonics.⁵⁰ Alternatively, the *RFPL1,2,3* genes could affect brain morphology and size determination, like the *MCPH1-6* genes. Indeed, those genes control the type of cell division (proliferative versus neurogenic) by regulating mitotic-spindle orientation or centrosome assembly,^{3,51} and their mutations were shown to be responsible for primary microcephaly, a disorder characterized by a reduction in neocortex size due to a decrease in neuron production.⁵¹

In conclusion, our observations suggest that the recent emergence and multiplication of the *RFPL1,2,3* genes may be important for brain development and function in Catarrhini. Their role could be even more essential in humans because this species maintained the complete open reading frames in all three genes and shows a striking increase in cortical *RFPL1,2,3* expressions in comparison to chimpanzees and macaques. We therefore propose that the *RFPL1,2,3* genes may contribute to changes in cortical organization leading to the acquisition of human-specific behavioral traits.

Supplemental Data

Supplemental Data include four figures and six tables and can be found with this article online at <http://www.ajhg.org/>.

Acknowledgments

The authors thank Philippe Rousseau for his advice with the chromatin-immunoprecipitation assay, the genomic core facility of the University of Geneva for their assistance with the microarray transcriptome analysis, and Dr. Karen Bedard for helpful discussions with the manuscript. J.B. is supported by the Auvergne Regional Council and the Geneva Department of Public Education. S.E.A. is supported by grants from the Swiss National Science Foundation, the European Union, and the National Institutes of Health. K.H.K. is supported by the Swiss National Science Foundation.

Received: April 15, 2008

Revised: June 13, 2008

Accepted: July 7, 2008

Published online: July 24, 2008

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

“affy” R package, <http://www.bioconductor.org/packages/release/Software.html>

InterProScan server, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

MatInspector server, <http://www.genomatix.de>

MyHits server, <http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/index>

NCBI GenBank Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>

Pfam server, <http://pfam.sanger.ac.uk/>

University of California Santa Cruz Genome Browser and Database, <http://www.genome.ucsc.edu/>

References

1. Kaas, J.H. (2005). From mice to men: The evolution of the large, complex human brain. *J. Biosci.* 30, 155–165.
2. Kaas, J.H. (2006). Evolution of the neocortex. *Curr. Biol.* 16, R910–R914.
3. Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788.
4. Kornack, D.R., and Rakic, P. (1998). Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1242–1246.
5. Kornack, D.R. (2000). Neurogenesis and the evolution of cortical diversity: Mode, tempo, and partitioning during development and persistence in adulthood. *Brain Behav. Evol.* 55, 336–344.
6. Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 438–450.
7. Fortna, A., Kim, Y., MacLaren, E., Marshall, K., Hahn, G., Meltesen, L., Brenton, M., Hink, R., Burgers, S., Hernandez-Bousard, T., et al. (2004). Lineage-specific gene duplication and loss in human and great ape evolution. *PLoS Biol.* 2, E207.
8. Caceres, M., Lachuer, J., Zapala, M.A., Redmond, J.C., Kudo, L., Geschwind, D.H., Lockhart, D.J., Preuss, T.M., and Barlow, C. (2003). Elevated gene expression levels distinguish human

- from non-human primate brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 13030–13035.
9. Preuss, T.M., Caceres, M., Oldham, M.C., and Geschwind, D.H. (2004). Human brain evolution: Insights from microarrays. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 850–860.
 10. Dorus, S., Vallender, E.J., Evans, P.D., Anderson, J.R., Gilbert, S.L., Mahowald, M., Wyckoff, G.J., Malcom, C.M., and Lahn, B.T. (2004). Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell* *119*, 1027–1040.
 11. Evans, P.D., Anderson, J.R., Vallender, E.J., Choi, S.S., and Lahn, B.T. (2004). Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1139–1145.
 12. Evans, P.D., Anderson, J.R., Vallender, E.J., Gilbert, S.L., Malcom, C.M., Dorus, S., and Lahn, B.T. (2004). Adaptive evolution of *ASPM*, a major determinant of cerebral cortical size in humans. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 489–494.
 13. Evans, P.D., Vallender, E.J., and Lahn, B.T. (2006). Molecular evolution of the brain size regulator genes *CDK5RAP2* and *CENPJ*. *Gene* *375*, 75–79.
 14. Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.A., and Gotz, M. (2002). Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor *Pax6*. *Nat. Neurosci.* *5*, 308–315.
 15. Quinn, J.C., Molinek, M., Martynoga, B.S., Zaki, P.A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R.F., West, J.D., and Price, D.J. (2007). *Pax6* controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* *302*, 50–65.
 16. Gotz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). *Pax6* controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* *21*, 1031–1044.
 17. Guillemot, F. (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 639–647.
 18. Warren, N., Caric, D., Pratt, T., Clausen, J.A., Asavaritikrai, P., Mason, J.O., Hill, R.E., and Price, D.J. (1999). The transcription factor, *Pax6*, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb. Cortex* *9*, 627–635.
 19. Ellison-Wright, Z., Heyman, I., Frampton, I., Rubia, K., Chitnis, X., Ellison-Wright, I., Williams, S.C., Suckling, J., Simmons, A., and Bullmore, E. (2004). Heterozygous *PAX6* mutation, adult brain structure and fronto-striato-thalamic function in a human family. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 1505–1512.
 20. Bayatti, N., Moss, J.A., Sun, L., Ambrose, P., Ward, J.F., Lindsay, S., and Clowry, G.J. (2007). A molecular neuroanatomical study of the developing human neocortex from 8 to 17 postconceptional weeks revealing the early differentiation of the subplate and subventricular zone. *Cereb. Cortex* *18*, 1536–1548.
 21. Zhou, Y.H., Zheng, J.B., Gu, X., Saunders, G.F., and Yung, W.K. (2002). Novel *PAX6* binding sites in the human genome and the role of repetitive elements in the evolution of gene regulation. *Genome Res.* *12*, 1716–1722.
 22. Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of mid-brain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 12543–12548.
 23. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* *25*, 402–408.
 24. Clark, T.A., Schweitzer, A.C., Chen, T.X., Staples, M.K., Lu, G., Wang, H., Williams, A., and Blume, J.E. (2007). Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome Biol.* *8*, R64.
 25. Margulies, E.H., Cooper, G.M., Asimenos, G., Thomas, D.J., Dewey, C.N., Siepel, A., Birney, E., Keefe, D., Schwartz, A.S., Hou, M., et al. (2007). Analyses of deep mammalian sequence alignments and constraint predictions for 1% of the human genome. *Genome Res.* *17*, 760–774.
 26. Rajkovic, A., Lee, J.H., Yan, C., and Matzuk, M.M. (2002). The ret finger protein-like 4 gene, *Rfpl4*, encodes a putative E3 ubiquitin-protein ligase expressed in adult germ cells. *Mech. Dev.* *112*, 173–177.
 27. Suzumori, N., Burns, K.H., Yan, W., and Matzuk, M.M. (2003). *RFPL4* interacts with oocyte proteins of the ubiquitin-proteasome degradation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 550–555.
 28. Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* *445*, 168–176.
 29. Nikolaev, S.I., Montoya-Burgos, J.I., Popadin, K., Parand, L., Margulies, E.H., and Antonarakis, S.E. (2007). Life-history traits drive the evolutionary rates of mammalian coding and noncoding genomic elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 20443–20448.
 30. Lynch, M., and Conery, J.S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* *290*, 1151–1155.
 31. Goidts, V., Armengol, L., Schempp, W., Conroy, J., Nowak, N., Muller, S., Cooper, D.N., Estivill, X., Enard, W., Szamalek, J.M., et al. (2006). Identification of large-scale human-specific copy number differences by inter-species array comparative genomic hybridization. *Hum. Genet.* *119*, 185–198.
 32. Wilson, G.M., Flibotte, S., Missirlis, P.I., Marra, M.A., Jones, S., Thornton, K., Clark, A.G., and Holt, R.A. (2006). Identification by full-coverage array CGH of human DNA copy number increases relative to chimpanzee and gorilla. *Genome Res.* *16*, 173–181.
 33. Enard, W., Khaitovich, P., Klose, J., Zollner, S., Heissig, F., Gialvalisco, P., Nieselt-Struwe, K., Muchmore, E., Varki, A., Ravid, R., et al. (2002). Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* *296*, 340–343.
 34. Khaitovich, P., Muetzel, B., She, X., Lachmann, M., Hellmann, I., Dietzsch, J., Steigele, S., Do, H.H., Weiss, G., Enard, W., et al. (2004). Regional patterns of gene expression in human and chimpanzee brains. *Genome Res.* *14*, 1462–1473.
 35. Khaitovich, P., Enard, W., Lachmann, M., and Paabo, S. (2006). Evolution of primate gene expression. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 693–702.
 36. Seroussi, E., Kedra, D., Pan, H.Q., Peyrard, M., Schwartz, C., Scambler, P., Donnai, D., Roe, B.A., and Dumanski, J.P. (1999). Duplications on human chromosome 22 reveal a novel Ret Finger Protein-like gene family with sense and endogenous antisense transcripts. *Genome Res.* *9*, 803–814.
 37. Hirotsune, S., Yoshida, N., Chen, A., Garrett, L., Sugiyama, F., Takahashi, S., Yagami, K., Wynshaw-Boris, A., and Yoshiki, A. (2003). An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* *423*, 91–96.
 38. Rhodes, D.A., de Bono, B., and Trowsdale, J. (2005). Relationship between *SPRY* and *B30.2* protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology* *116*, 411–417.

39. Chae, J.J., Wood, G., Masters, S.L., Richard, K., Park, G., Smith, B.J., and Kastner, D.L. (2006). The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 9982–9987.
40. Newman, R.M., Hall, L., Connole, M., Chen, G.L., Sato, S., Yuste, E., Diehl, W., Hunter, E., Kaur, A., Miller, G.M., et al. (2006). Balancing selection and the evolution of functional polymorphism in Old World monkey TRIM5alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 19134–19139.
41. Woo, J.S., Imm, J.H., Min, C.K., Kim, K.J., Cha, S.S., and Oh, B.H. (2006). Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J.* *25*, 1353–1363.
42. Sawyer, S.L., Wu, L.I., Emerman, M., and Malik, H.S. (2005). Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 2832–2837.
43. Tang, B.L. (2006). Molecular genetic determinants of human brain size. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 911–916.
44. Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Copp, A., and Mishkin, M. (2005). FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 131–138.
45. Burki, F., and Kaessmann, H. (2004). Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux. *Nat. Genet.* *36*, 1061–1063.
46. Pollard, K.S., Salama, S.R., Lambert, N., Lambot, M.A., Coppens, S., Pedersen, J.S., Katzman, S., King, B., Onodera, C., Siepel, A., et al. (2006). An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* *443*, 167–172.
47. Krause, J., Lalueza-Fox, C., Orlando, L., Enard, W., Green, R.E., Burbano, H.A., Hublin, J.J., Hanni, C., Fortea, J., de la Rasilla, M., et al. (2007). The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Curr. Biol.* *17*, 1908–1912.
48. Bertelli, M., Cecchin, S., Fabbri, A., Lapucci, C., and Gasparini, P. (2006). Exclusion of chromosome region 22q12.1-q12.3 as a second locus for Costello syndrome. *Panminerva Med.* *48*, 145–146.
49. Roberts, A., Allanson, J., Jadico, S.K., Kavamura, M.I., Noonan, J., Opitz, J.M., Young, T., and Neri, G. (2006). The cardiofaciocutaneous syndrome. *J. Med. Genet.* *43*, 833–842.
50. Lukaszewicz, A., Savatier, P., Cortay, V., Giroud, P., Huissoud, C., Berland, M., Kennedy, H., and Dehay, C. (2005). G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron* *47*, 353–364.
51. Woods, C.G., Bond, J., and Enard, W. (2005). Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): A review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am. J. Hum. Genet.* *76*, 717–728.

3. Annexe 2 – Article 3

Improvement of Culture Conditions of Human Embryoid Bodies using a Controlled Perfused and Dialyzed Bioreactor System.

Come J, Nissan X, Aubry L, Tournois J, Girard M, Perrier AL, Peschanski M, Cailleret M.
Tissue Eng Part C Methods. 2008 Aug 18.

Improvement of Culture Conditions of Human Embryoid Bodies Using a Controlled Perfused and Dialyzed Bioreactor System

Julien Come, M.S.,* Xavier Nissan, M.S.,* Laetitia Aubry, M.S., Johana Tournois, B.S., Mathilde Girard, Ph.D., Anselme L. Perrier, Ph.D., Marc Peschanski, M.D., Ph.D., and Michel Cailleret, M.S.

In parallel to the active search for therapeutic and industrial applications of human embryonic stem cells (hESCs), designing automated means of producing those cells is a timely goal. Slow-turning lateral vessels (STLVs) with low shear stress have shown promise for expanding the cells at the embryoid body stage. We have improved this technology by developing two complementary systems, allowing continuous optimization of the culture conditions. First, perfused STLV bioreactors were set up, to provide continuous delivery of culture medium to the cells growing in the rotating chamber. This allowed the external control of the culture medium, and consequently optimized oxygenation, pH, nutrient supply, and waste elimination. Second, a dialysis chamber was adapted. This led to a further enhanced controlled environment and a decrease in the quantity of adjunct products (e.g., growth factors) necessary to the cells inside the bioreactor chamber. hESC aggregation and initial differentiation—taking neural induction as an example—were compared between the perfused and dialyzed STLV system and static cultures. Perfused and dialyzed STLV bioreactors promoted formation of embryoid bodies that were differentiated more rapidly and were homogeneously synchronized in a statistically significant manner.

Introduction

BECAUSE OF THEIR two fundamental attributes of unlimited expansion and pluripotency, human embryonic stem cells (hESCs) have gained considerable interest for use in cell replacement therapy, as well as in drug discovery (see ¹⁻³).

Fulfilling these promises requires, however, making full usage of both capacities of hESCs for unlimited expansion and pluripotency. For that purpose, these two abilities have to be translated into technological platforms for cell production and controlled differentiation. Conventional stirrer vessels have the disadvantage of generating shear forces, and although manageable, these forces still damage the cells. Low-shear-stress bioreactors exist, and pioneer demonstration has been given of mass production of embryoid bodies derived from human embryoid bodies (hEBs).⁴ This success relied on specific techniques used to ensure dynamic, yet mild, suspension conditions to control the aggregation processes of differentiating hESCs.

Building upon these recent developments, the present study was undertaken to promote optimizations required for therapeutic or industrial implementation of hESC progeny production, focusing on the precise control and reproduc-

ibility of cell culture conditions. Fine tuning and maintenance of cell culture conditions is a requisite for traceability of industrial processes and safety of clinical-grade cell therapy products.^{5,6} Our first goal was therefore to make the closed chambers of the bioreactors fully accessible to external analysis and to addition of exogenous product, in order to provide a workable platform for implementation of any requested control and medium adaptation, without any disruption of dynamic cell suspension. In addition, our study addressed the complementary issue of the renewal of large quantities of culture medium over time. Cell production in bioreactors requires a large volume of culture medium and, in parallel, increases considerably the amount of adjunct product, some of which—particularly cytokines—are expensive.^{7,8} Accordingly, our second goal in this study was the development of a system that would allow costs to be reduced by limiting the amount of adjunct product to the desired concentration in the strictly limited, necessary volume of medium.

We propose here technological developments that have been tested on a rotating slow-turning lateral vessel (STLV) and evaluated on the neural differentiation path but may be adapted to any type of low-shear-stress bioreactor or initial steps of hESC differentiation.

INSERM/UEVE U 861, I-STEM, AFM, Evry, France.

*These two authors contributed equally to this study.

Methods

hESC culture

The hESC lines VUB01 derived at the Vrije Universiteit Brussels,⁹ SA01 distributed by Cellartis (Sweden), H9 (WA09, WiCell Research Institute), and HUES-9 octamer (OCT)-4GFP, in which green fluorescent protein (GFP) is under the control of the full-length POU5F1 (OCT-4) promoter, kindly given by Chad Cowan (Harvard Stem Cell Institute), were used during this study. Cells were maintained on a feeder layer of mitomycin C-inactivated murine Sim's Thioguanine Ouabaine-resistant fibroblasts in knock-out (KO)-Dulbeccos' modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 20% KO serum replacement, 1 mM L-glutamine, 0.1% penicillin/streptomycin, 1% non-essential amino acids, and 4 ng/mL fibroblast growth factor-2 (FGF2) (all from Invitrogen, Cergy, France). Culture medium was changed by half daily, supplemented with 8 ng/mL FGF2. For passaging, cells were harvested using collagenase type IV (1 mg/mL, 5 min) and gently scraped with a plastic pipette. To separate isolated cells from feeder cells and clumps a passive sedimentation was performed and hESCs were then filtered through a 70 μ m cell strainer (Beckton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France) was performed to calibrate the aggregate's size. hESCs were re-suspended and seeded at a 1:5 ratio in a 300-cm² flask.

After 7 days, approximately 50 million undifferentiated hESCs per flask were harvested using 5 mL of collagenase type IV and dispase I (at 1 and 0.3 mg/mL, respectively) at 37°C, 5% carbon dioxide (CO₂) for 20 min. After elimination of remaining feeder cells using 100- μ m filtration, hESC colonies were broken into small clumps and filtered again onto a 70- μ m cell strainer before size control under the microscope.

hESCs were seeded in the bioreactor chamber at approximately 0.5 million cells per mL in hESC medium without FGF2. The bioreactor was set to rotate at 12 rpm, and the speed was increased daily by 1 rpm to a plateau at 20 rpm. The perfusion flow was set to renew all medium in the chamber within 24 h (10 rpm). Control hEBs formed under static culture conditions (SCC) were seeded at the same concentration to obtain the same rate of aggregation; medium was replaced by half daily.

STLV bioreactors: set-up and function

The perfused STLV system (Fig. 1A) included an autoclaved 55-mL-wide chamber, variable speed motor drives with tachometers, a culture tank, a peristaltic pump, and a silicone membrane oxygenator (all from Synthecon, Cellon SA, Bereldange, Luxembourg). All components were connected using flexible silicone tubing. The medium outlet used was covered using a dialysis membrane with a 100-kDa-molecular weight cut-off at the inner cylinder of the perfused STLV to keep cells out.

Culture conditions were controlled online by connection of the medium used at the outlet of the STLV to a Bioprofile 400 (Nova Biomedical, les Ulis, France), allowing non-invasive follow-up of the culture parameters. Online analysis was performed for pH, partial pressure of oxygen (O₂), partial pressure of CO₂, osmolarity, concentration of glutamine, glutamate, glucose, lactate, sodium, potassium, and ammonium. The analyzer was programmed to initiate calibration cycles at regular intervals every 6 h.

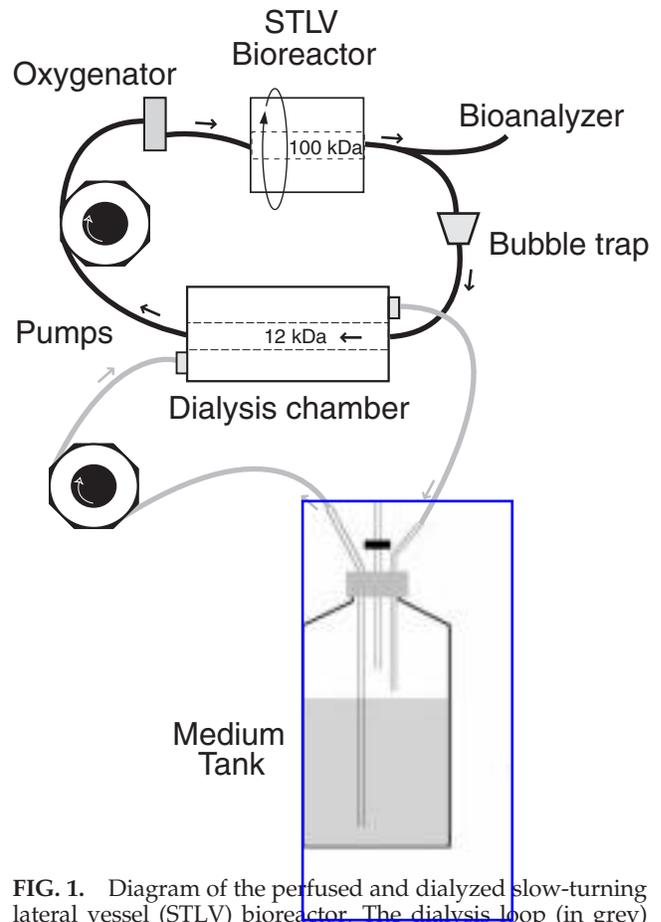


FIG. 1. Diagram of the perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) bioreactor. The dialysis loop (in grey) comprises the medium tank, a pump, and the outer part of the dialysis chamber equipped with a semi-permeable membrane. The culture loop (in black) comprises the STLV bioreactor, a pump, an oxygenator, a bubble trap, a bioanalyzer, and the inner part of the dialysis chamber. Only the STLV chamber rotates.

For EB sampling, the rotating vessels were stopped and placed on a clean bench to allow the cell aggregates to settle and were taken away by pipetting. hEBs were individually and randomly retrieved from the chamber of the STLV bioreactor or control SCC after 2, 4, and 8 days. Mixed samples were also retrieved on the same days. For retrieval from the STLV chamber, 500 μ L of medium was retrieved and the hEBs filtered out using a 70- μ m-pore nylon cell strainer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). The strainer was rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to deliver the EBs to a Petri dish. Resulting aggregates were individually collected under a stereomicroscope and each placed in 100 μ L of RNeasy Lysis buffer (RLT) (Qiagen, Courtaboeuf, France). Mixed samples were formed using the remaining non-individually collected filtered aggregates; they were centrifuged (900 rpm, 1 min) and collected in 1 mL RLT.

Neural differentiation protocols

Differentiation of the H9 cell line along the neural lineage was performed in two different manners. First, hEBs produced in STLV conditions were plated after 6 days of aggregation onto poly-ornithine/laminin-coated (POL) culture

TABLE 1. VARIATIONS OVER TIME IN THE CULTURE MEDIUM IN THE CULTURE LOOP OF THE SYSTEM DESCRIBED IN FIGURE 1

	Batch 1		Batch 2		Batch 3	
	Means	SD	Means	SD	Means	SD
pH	7.27	0.025	7.24	0.054	7.25	0.052
pCO ₂ mmhg	33.7	1.6	34.5	2.3	34	2.4
pO ₂ mmhg	129.7	10.4	130.5	12.1	128.9	14.7
mOsm/kg	334	34	345	18.6	350	17.5

Four physicochemical parameters were measured twice a day between day 0 and day 10. Variations of the physical parameters are presented as means \pm standard deviations.

dishes in DMEM/F12 with N2 supplement. Second, neural progenitors were obtained from undifferentiated hESCs by co-culture with MS5 stromal cells, as described previously.¹⁰ In both protocols, morphologically identified neural rosettes were isolated mechanically for analysis ($n = 4$).

Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from hESCs (undifferentiated) and hEBs (differentiated) using RNeasy extraction kits (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Quality and concentration of RNA were checked using the Nanodrop technology. Reverse transcription was performed using the Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen).

For all samples, including isolated hEBs, real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) was performed using a Chromo4 real-time system (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the cycle threshold value calculated using Opticon Monitor software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR product specificities and exclude non-specific amplification. PCR primers are listed in Supplemental Table 1 (available online at www.liebertonline.com). Samples were normalized against β Tubulin. Experiments were normalized with reference to undifferentiated

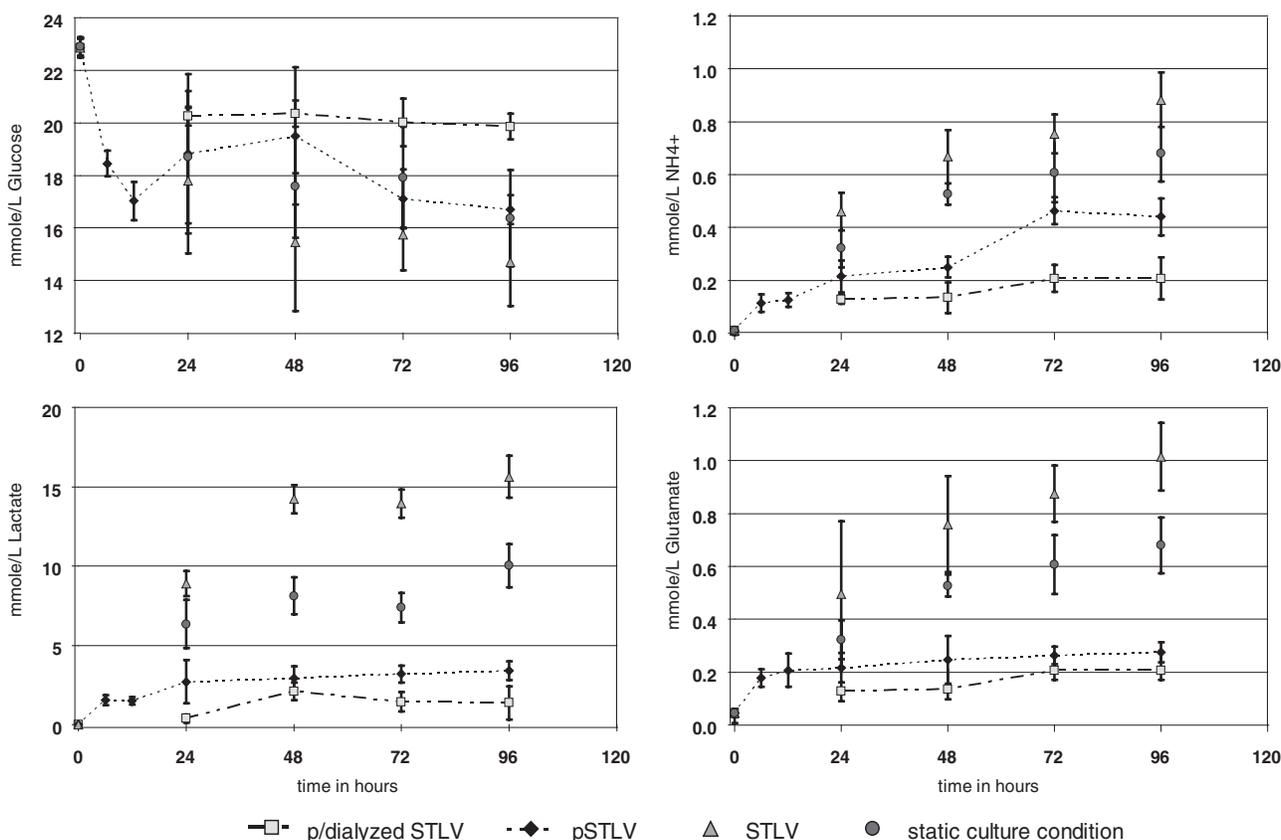


FIG. 2. Concentrations of glucose, ammonium (NH_4^+), lactate, and glutamate in the culture medium between day 0 and day 4 of differentiation. Analyses were performed on perfused and dialyzed slow-turning lateral vessels (STLVs) (\blacksquare), perfused STLVs (\blacklozenge), STLVs (\blacktriangle), and under static culture conditions (\bullet). The data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3, 3, 6$, and 6 , respectively). Dotted lines indicate analyses performed by the bioanalyzer on samples directly retrieved on-line. For other results, samples were retrieved manually and analysis performed secondarily using the bioanalyzer.

hESCs or to human fetal brain (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Fluorescence-activated cell sorting analysis

Hues-9 POU5F1/GFP EBs obtained in SCC or perfused and dialyzed STLV were enzymatically dissociated with TrypleSelect (Invitrogen) for 15 min at 37°C, washed, and resuspended in 1 mL fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (2% FBS in PBS). Cells were probed for 30 min at 4°C with monoclonal r-phycoerythrin-mouse anti-human CD 56 (N-CAM) Clone B159 or r-phycoerythrin-isotype control (R&D systems, Lille, France). Stained cells were then analyzed in duplicate on a FACScalibur flowcytometer using CellQuest software (BD Biosciences, France).

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature before blocking and permeabilizing with 2% PBS, 0,1% bovine serum albumin, and Triton X-100. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer, including rabbit polyclonal antibodies raised against PAX6 (Covance, Eurogenetec, Angers, France), mouse monoclonal antibodies raised against OCT-4 (Chemicon, St. Quentin en Yvelines, France), N-CAM clone Eric1 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), and class III-tubulin (Tuj1, Covance). Cells were then stained with the appropriate fluorophore-conjugated secondary antibody and 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Analyse-it General Statistics (Analyse-it Software, Ltd, Leeds, UK). Values are presented as means \pm standard deviations.

A Fisher test was performed to compare variance in samples. The statistical significance level of a difference between data sets was determined using the Student *t*-test when the Fisher test was positive; Welch *t*-test was applied (indicated in the text by Welch's approximation) when it was not.

Results

The optimized perfused and dialyzed STLV consists of two loops of medium perfusion. The first cell-perfusion loop feeds the bioreactor. Protein complementation of the medium is performed at this level. The perfusate goes through

the STLV chamber equipped with a 100-kDa-molecular-weight-cut-off (MWCO) semi-permeable membrane. The second loop consists of a dialysis chamber (200 mL) with an inner cylinder covered by a dialysis membrane with a 12-kDa MWCO connected to a large medium tank. The function of the dialysis chamber is to dilute the dialysate with fresh medium. It enhances waste elimination and nutrient supply by exchange between the two compartments of the dialysis chamber through the 12 kDa MWCO semi-permeable membrane. Two pumps control the cross-flow of the two perfusion loops independently to provide full medium renewal within 24 h. Because of on-line analysis, a bubble trap has been added on the first loop to avoid pump failure while retrieving medium for analysis (Fig. 1).

Effectiveness of the dialysis chamber on the maintenance of culture conditions

To validate the effectiveness of this system, we first measured physicochemical parameters over 10 days of EB culture (Table 1), namely pH, osmolarity, and partial pressure of CO₂ and O₂. All these parameters are indirect indicators of homeostasis, glucide, and respiratory and ionic metabolism and together reveal the mass transfer capacity of the system. The results obtained indicated a robust stability for all parameters over time in the culture chamber.

Figure 2 summarizes the results of successive analyses in the culture medium of concentrations of glucose, glutamate, ammonium (NH₄), and lactate.

Results obtained under SCCs and non-perfused STLV were similar, showing on the second day a progressive decrease in glucose concentration and a rapid parallel increase in cell waste, with lactate reaching close to 7.5 and 14 mmol/L for SCC and STLV, respectively, and NH₄ doubling up to 0.6 mmol/L. Daily change of half of the medium after the second day of culture under SCCs stabilized those parameters at the levels of the second day.

In sharp contrast, addition of continuous perfusion to the STLV better stabilized concentrations over time at levels compatible with cell culture.¹¹ Glucose concentration followed the same evolution as under SCCs and non-perfused STLV. By contrast, most parameters indicative of cell waste increased in the medium only over the first 24 h. Glutamate and lactate then remained stable for up to 4 days, at 0.2 and 4 mmol/L, respectively. NH₄ doubled again within 48 h to reach a plateau at 0.4 mmol/L. Addition of a dialysis cham-

TABLE 2. CELL VIABILITY OF EMBRYOID BODIES (EBs) PRODUCED IN THE DIFFERENT CULTURE CONDITIONS (H9 LINE)

	DAY 0		DAY 7		DAY 14	
	Means %	SD %	Means %	SD %	Means %	SD %
p/dialyzed STLV			88,1	10,6	71,4	12,6
STLV			88,0	8,5	57,9	14,3
pSTLV	98,8	0,2	92,6	14,7	68,4	15,6
SCC			77,0	8,6	55,9	7,7

Cell viability assays were performed using the live/dead viability cell kit from Invitrogen on day 7 and day 14 for each condition (static culture condition (SCC), slow-turning lateral vessel (STLV), perfused STLV, and perfused and dialyzed STLV) and following the manufacturer's protocol. Analyses were performed in triplicate. For the SCC and non-perfused STLV condition, the medium was changed by half every other day.

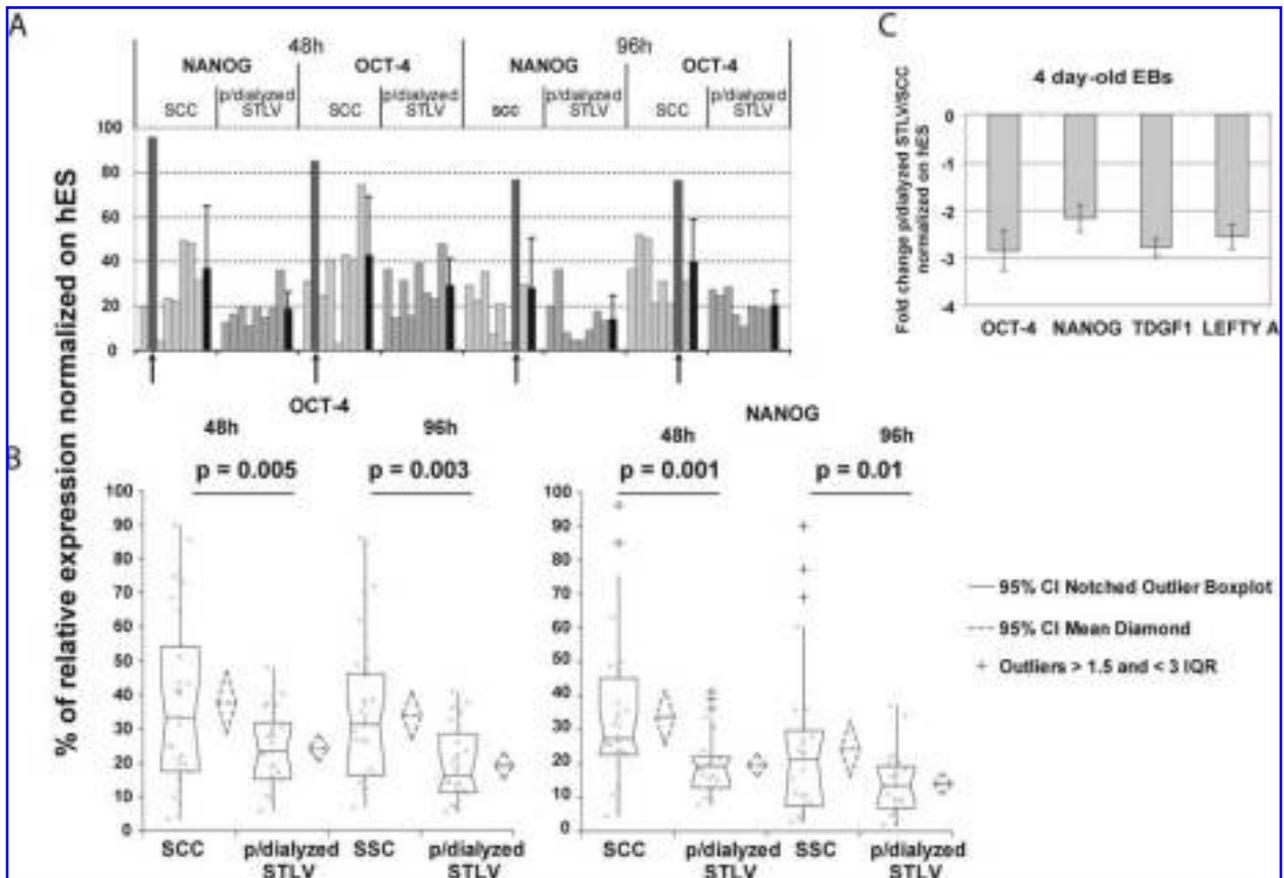


FIG. 3. Quantitative polymerase chain reaction of relative octamer-4 and *NANOG* gene expression in embryoid bodies (EBs) at 48 and 96 h (VUB-01 line). (A) Distribution represented in plot boxes of variance analyses of relative levels of octamer-4 and *NANOG* expression in individualized EBs ($n = 32$ for each condition). P -values were obtained using the t -test after Welch correction. (B) Typical gene expression profiling in individual EBs. Arrows indicate an EB in which gene expression had remained comparable with that in undifferentiated human embryonic stem cells (hESCs). Black columns show the mean values for each series. P -values were obtained using the t -test after Welch correction. (C) Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of EB mixes for stemness markers (*OCT-4*, *NANOG*, teratocarcinoma derived growth factor-1 and *LEFTY A*) at 96 h, expressed in fold change, perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) conditions versus static culture conditions, after normalization on β Tubulin and hESC level. Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). Fold changes are indicated for one-tailed one-way t -test with $p \leq 0.01$.

ber to the perfused STLV systematically improved all culture parameters. Glucose concentration remained at approximately 20 mmol/L up to 4 days (i.e., $\sim 25\%$ than in the non-dialyzed system). In parallel, all indicators of cell waste were half those of the non-dialyzed system. Lactate was in the mmol range at all times, and glutamate and NH_4 were at approximately 0.2 mmol/L. Cell viability was similar at day 14 in perfused and in perfused and dialyzed STLV, better than in non-perfused STLV and under SCCs (Table 2).

Effect of simulated microgravity on hESC differentiation

Two main features of the differentiation of hEBs were analyzed to compare results obtained using SCCs and the perfused and dialyzed STLV, namely the decrease in expression of markers of the undifferentiated stage and the increase in expression of markers of differentiation, specifically focusing on the neural lineage. For the undifferentiated

stage, we chose *NANOG* and *OCT-4*, two transcription factors associated with the undifferentiated hESC stage, and the controls *TDGF1* and *LEFTY A* that also participate specifically to this stage.^{12,13} Analysis of neural differentiation roughly distinguished two stages: an earlier one characterized by expression of *FGF5*, *SIX3*, *SOX1*, and *PAX6*, and later *Nestin*, *CD56/N-CAM*, *MAP2*, and *TUJ-1*.

In addition, we determined the course of expression of E-cadherin, because it has been shown to peak during the phase of aggregation and then to decrease transiently before increasing again during formation of three germ layers.^{14,15} This specific time course of expression was used to mark the effectiveness of induction and the completeness of differentiation.

In the analysis of 32 randomly retrieved individual hEBs, expression of *NANOG* and *OCT-4* statistically significantly decreased more rapidly in perfused and dialyzed STLV than under SCCs at 48 and 96 h (Fig. 3A, B). This enhancement was also significantly more homogeneous in perfused and

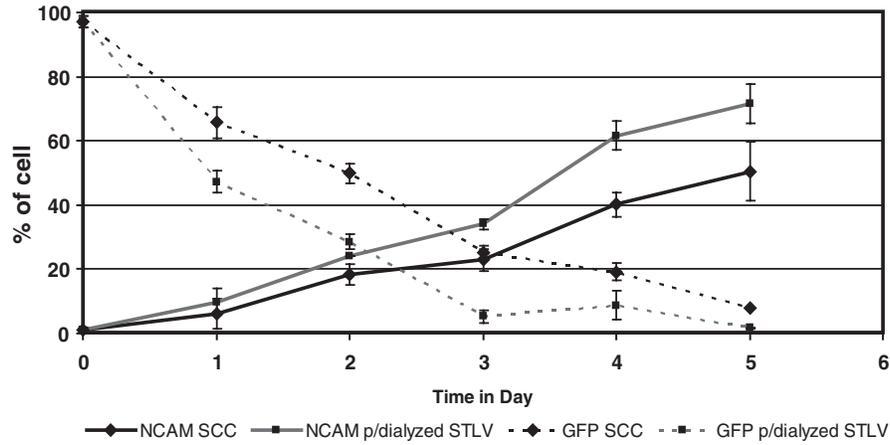


FIG. 4. Progression toward three-germ-layer stage from static culture conditions (◆) and perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (■) cultures in embryoid bodies (octamer (OCT)-4/green fluorescent protein (GFP) Hues-9 line). The determination of induction and progression of differentiation was performed by control of percentage of total population expressing GFP under OCT-4 full-length-promoter expression (dotted lines) and neural cell adhesion molecule (dark lines) monitoring using flow cytometry over the first 5 days. Data are shown as means \pm standard deviations ($n = 3$).

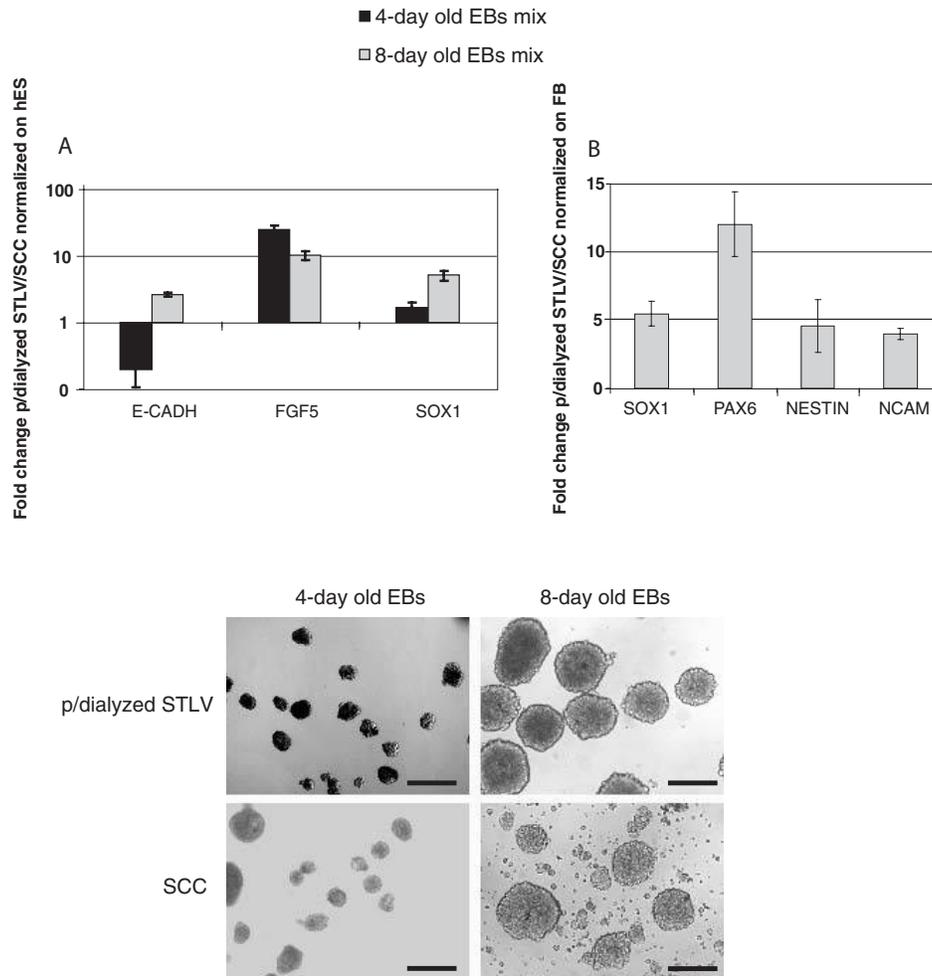


FIG. 5. Characterization of embryoid bodies (EBs) differentiated in perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) conditions versus static culture conditions (SCCs) after 4 days (black bars) and 8 days (grey bars) (VUB01 line). Upper panel: (A) Gene expression of *E CADHERIN* and of the neuroectoderm markers *FGF5* and *SOX1* normalized on human embryonic stem cell level. Means \pm standard deviations ($n = 3$). (B) Gene expression of neural progenitor markers: *SOX1*, *PAX6*, *NESTIN*, and *N-CAM* normalized on human fetal brain. Means \pm standard deviations ($n = 3$). Lower panel: photomicrographs showing EBs obtained at 4 days (left) and 8 days (right) under STLV conditions (upper row) and SCCs (lower row). Scale bar is 200 μ m.

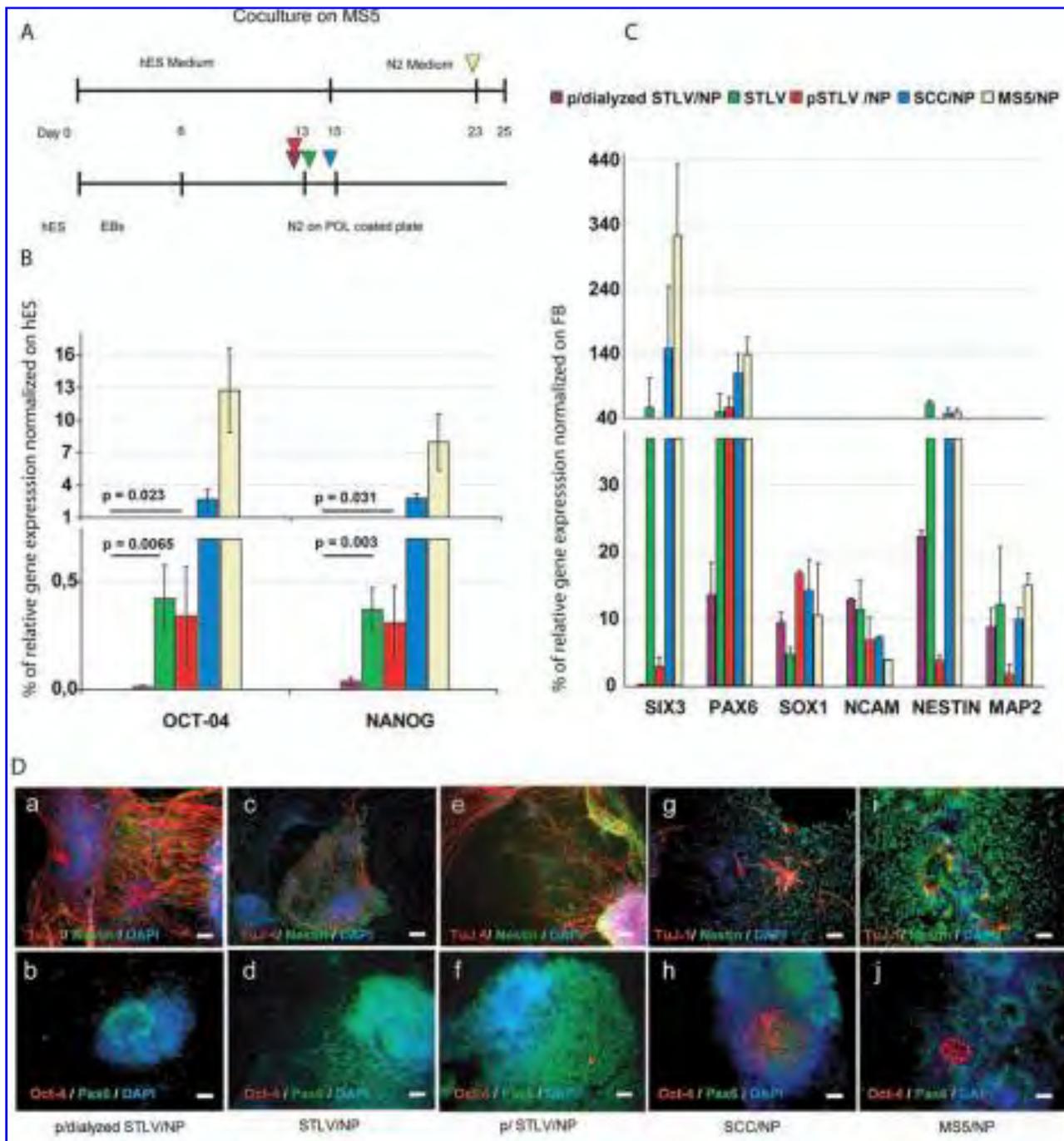


FIG. 6. Comparison of neural progenitors (NPs) generated under perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV), perfused STLV, non-perfused STLV, static control conditions (SCCs) and after co-culture with MS5 stromal cells (H9 line). (A) Schematic diagram illustrating the sequential step of neural differentiation protocols: ▼ signals rosettes-like cells appearance. Quantitative polymerase chain reaction analysis of octamer (*OCT*-4) and *NANOG* (B) and neural markers (C), respectively, normalized on undifferentiated human embryonic stem cells and human fetal brain ($p < 0.05$ for all conditions using the t -test after Welch correction). (D) Immunostaining of neural progenitors obtained after a culture step in perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) (a, b), non-perfused STLV (c, d), perfused STLV (e, f), and static control conditions (SCCs) (g, h) and using MS5 induction (i, j). In a, c, e, g, and i, TUJ-1 and NESTIN immunoreactivity (in red and green, respectively); in b, d, f, h and j, OCT-4 and PAX-6 (in red and green, respectively). Scale bar = 50 μ m.

dialyzed STLV, and no undifferentiated stage patterning resulting in defective aggregation contrary to SCCs was seen (black arrows in Fig. 3B). These observations were confirmed with another cell line, SA-01 (Supplemental Fig. 1).

Comparison of mixes of 4-day-old hEBs showed that all markers of the undifferentiated stage were at least half those in perfused and dialyzed STLV than under SCCs (one-way Student *t*-test perfused and dialyzed STLV/ SCCs with $p < 0.01$, $n = 3$) (Fig. 3C). Those results were confirmed using FACS analysis on cells expressing GFP under the control of the promoter of *OCT-4*, which showed a 24-h delay in the differentiation kinetics at the earliest time-points for the perfused and dialyzed STLV conditions compared with SCCs (Fig. 4).

Analysis of differentiation markers in mixed samples of EBs at 4 and 8 days confirmed the overall acceleration of the differentiation (Fig. 5). At 4 days, E-cadherin expression in STL-derived hEBs was one-fifth that under static conditions. At 8 days, the reverse was observed, with E-cadherin expressed three times more in the former than in the latter, indicating a faster progression toward gastrulation. Early neural differentiation markers (*FGF5* and *SOX-1*) showed a similar acceleration in the STLV conditions compared with SCCs (Fig. 5A). At that 8-day time point, expression of genes associated with later stages of neural differentiation was also 5 to 10 time more in the perfused and dialyzed STLV than under SCCs (Fig. 5B).

Neural differentiation of EBs produced in simulated microgravity

To analyze the effect of a rotary bioreactor on the specific neural differentiation, we compared this differentiation for hEBs derived from an H9 hESC line in the perfused and dialyzed STLV, perfused STLV, and non-perfused STLV; under SCCs; and using co-culture with stromal cells.

As shown in Figure 6A, the mean time delay to “neural rosette” formation grown was significantly shorter under all three STLV conditions than under SCCs (1 to 2 days), and all were more than 1 week shorter than after induction of stromal cells. Under STLV conditions, they were collected after only 13 to 14 days (6 days in the bioreactor and 7–8 days after plating hEBs), whereas early neural rosettes were observed only after 23 days using co-culture with MS5 feeder cells, in agreement with previous data.¹⁰

Undifferentiated leftover cells in neural rosettes were analyzed using real-time PCR of *OCT-4* and *NANOG*. The expression of these markers of the undifferentiated stage was dramatically lower STLV and perfused STLV until undetectable in the perfused and dialyzed STLV-derived rosettes, whereas both remained expressed in co-culture- and SCC-derived rosettes, at lower but significant levels to the undifferentiated stage (Fig. 6B). All others markers of differentiation increased as expected under all three conditions. Once normalized on gene expression recorded in the brain of a 21- to 41-week-old human fetus, results were not significantly different for *SOX-1*, *N-CAM*, *Nestin*, and *MAP 2* (Fig. 6C). *SIX3*, a precocious and transient marker gene of neural specification, appeared down-regulated only in perfused and perfused and/dialyzed STLV conditions. The typical marker of early (rosette-associated) neural precursors, *PAX6*, was less expressed in in perfused and dialyzed STLV than under all other conditions, a result confirmed using immunocytochemical staining of cells in culture (Fig. 6D). In contrast, the cells expressing the marker of more-advanced neuronal progenitors *TUJ-1* were more numerous in perfused and dialyzed STLV culture than under any other condition.

Discussion

The main result of this study is the demonstration that optimizing low-shear-stress STLV bioreactors through control of a continuously perfused culture medium allows for long-term production of hEBs that differentiate more rapidly and more homogeneously than under classic culture conditions. Addition of a regenerating dialysis loop permitted the further optimization of the medium. It also restricted the need for renewal of the medium.

Non-perfused STLV bioreactors have been shown to be a useful tool for bulk production of EBs derived from hESCs.⁴ We have built upon those data in the search for technical improvements that would allow optimization of the culture medium content through adaptation to the continuously changing needs of the cells in the bioreactor chamber. Using a perfusion system allowed us to address this issue in three different and complementary ways. First, it allowed for continuously diluting cell waste while maintaining concentrations of nutrients, because the culture medium in the chamber was in permanent equilibrium with an external source. Second, it allowed the medium in the chamber to be

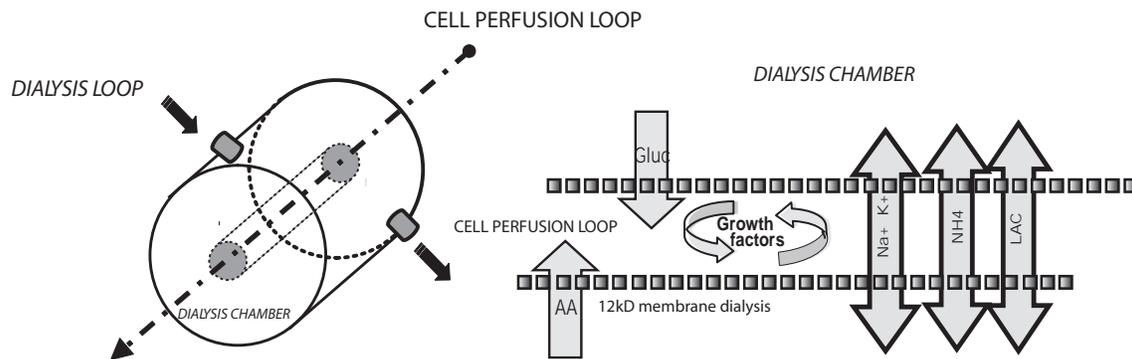


FIG. 7. Left: schematic representation of the two flows of medium in the dialysis chamber, from the slow-turning lateral vessel (STLV) chamber (perfusion loop), and of fresh medium (dialysis loop). Right: predicted gradient-driven flows of key molecules of the culture medium across the semi-permeable membrane (12-kDa cut-off).

changed whenever needed without altering the growth process. In bioreactors, interrupting stirring—and microgravity in STLV—leads to agglomeration of EBs and formation of aggregates that are too large for optimal growth and differentiation and thus disturb the evolution of the early stages of the gastrulation.^{16,17} Continuous diffusion of the medium reduces the variations of free-stem concentration, because it results in a nearly constant value at the surface of the aggregates that rotate in the bioreactor.¹⁸ Third, a perfusion system creates a derivation of the culture medium that can then be analyzed directly, allowing for precise control of the microenvironment in which the cells are growing. It is of most importance that adequate oxygen and nutrient mass transfer are essential parameters to maintain growth and differentiation of aggregated cells in suspension,¹⁹ and they are continuously evolving over time in bioreactors. Accordingly, cell viability was better under perfused STLV conditions, dialyzed or not, than under non-perfused STLV conditions or SCCs. Microgravity culture condition has been successfully used for organic tissue growth and differentiation,^{20,21} with for example, low shear stress adapted with sensitivity of the construct–liquid interface, microenvironment around the structure that include nutrient and O₂ supply, and preservation of paracrine autocrine pathways.²² The third conditions could explain maintenance of growth and differentiation.

Moreover, to avoid disturbing this rotation frequently, which must be continuous, we also added an on-line analysis system of culture. That gives us a real-time following of the medium composition without having to intervene inside the culture chamber, thus allowing us to perform real continuous hEB cultivation while limiting direct human technical intervention on cells during the culture processes.

The use of a perfusion system with the bioreactors allowed us to move a step further in the optimization of the culture medium by adapting a dialysis chamber to the STLV bioreactors comparable with those designed for other applications.²³ The value of this addition was demonstrated on all culture medium parameters studied. Our interpretation of these results is summarized in Figure 7 and points to the differential cut-off of the membranes in the bioreactor and the dialysis chambers as one key characteristic of the system. By restricting the cut-off point in the dialysis chamber to 12 kDa, we provoked a differential dilution of the elements contained in the culture medium. Exchanges with the used medium flowing out of the bioreactor chamber will be at equilibrium for all elements that can cross the membrane, provoking movement in both directions according to gradients of concentrations. Nutrients that have been used are replenished in the culture medium. Cell waste metabolites that have increased in concentration in the bioreactor chamber will cross the membrane and dilute in the dialysis chamber. Because of their size, most proteins will not cross the membrane and will remain in the culture medium, resulting in growth factors being more effective than under static conditions.²⁴

The use of low-shear-stress bioreactors to grow hEBs has been first considered for their ability to address the issue of mass cell production.⁴ We have considered a complementary issue, namely the ability of a system allowing for controlled culture conditions over time to improve the differentiation process of hEBs. Our results support this hypothesis by demonstrating that EBs grown in the perfused and dialyzed STLV

bioreactors underwent differentiation in a more-homogeneous manner and, as an example of the overall ability of the system, reached a characteristic stage of neural differentiation more rapidly than under other conditions tested. Micro-gravity affects expression of numerous genes, cell-to-cell interaction, and paracrine–autocrine cell pathways.¹⁶ The minimal mechanical stress inside the vessel is also favorable for cell aggregation and aggregate culture.²⁵ As demonstrated, the formation of aggregates in simulated microgravity avoided the maintenance of residual undifferentiated cells, which are believed to be implicated in teratoma formation; the ability to eliminate this risk is essential for regenerative medicine.²⁶

Similar to our results, Gerecht-Nir and colleagues noted that consumption of nutrients and increased concentration of cell waste metabolites characterized non-perfused STLV culture conditions. In non-perfused bioreactors, similar to what occurs under SCCs, growing cells are thus treated with culture medium, which loses optimal characteristics soon after each exchange. In perfused bioreactors, the stability of the cell culture conditions at a level much closer to the original concentrations is a likely major mechanism underlying the improved homogeneity of the differentiating EBs. Optimization of culture conditions may also be responsible for the faster speed of differentiation recorded in the present study. Indeed, under static conditions, it is likely that cells undergoing differentiation are placed in optimal conditions only for short periods of time after medium renewal. As a consequence, speed of differentiation may be cycling after each medium exchange from normal to sub-normal in static conditions. The perfused and dialyzed STLV may, in contrast, continuously preserve culture conditions closer to optimal ones, allowing molecular mechanisms of differentiation to operate more normally.

Acknowledgments

This study was supported in part by additional grants from the Agence Nationale de la Recherche (CSCelo), the cluster Medicen Paris Region (IngeCELL) and the European Commission (STEM-HD, FP6). The authors thank Dr Karen Sermon (AZ-VUB, Brussels) for the kind gift of VUB-01, Dr Chad Cowan of HUES-9 for the OCT-4GFP hESC line, and Bernard Prum for statistical analyses.

References

1. Gorba, T., and Allsopp, T.E. Pharmacological potential of embryonic stem cells. *Pharmacol Res* **47**, 269, 2003.
2. McNeish, J. Embryonic stem cells in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 70, 2004.
3. Mitjavila-Garcia, M.T., Simonin, C., and Peschanski, M. Embryonic stem cells: meeting the needs for cell therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 1935, 2005.
4. Gerecht-Nir, S., Cohen, S., and Itskovitz-Eldor, J. Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng* **86**, 493, 2004.
5. Stacey, G., and Hunt, C.J. The UK Stem Cell Bank: a UK government-funded, international resource center for stem cell research. *Regen Med* **1**, 139, 2006.
6. Catalina, P., Cobo, F., Cortes, J.L., Nieto, A.I., Cabrera, C., Montes, R., Concha, A., and Menendez, P. Conventional and

- molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. *Cell Biol Int* **31**, 861, 2007.
7. Itsykson, P., Ilouz, N., Turetsky, T., Goldstein, R.S., Pera, M.F., Fishbein, I., Segal, M., and Reubinoff, B.E. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci* **30**, 24, 2005.
 8. Tian, X., Morris, J.K., Linehan, J.L., and Kaufman, D.S. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol* **32**, 1000, 2004.
 9. Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* **21**, 503, 2006.
 10. Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. Derivation of mid-brain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12543, 2004.
 11. Xu, Y., Sun, J., Mathew, G., Jeevarajan, A.S., and Anderson, M.M. Continuous glucose monitoring and control in a rotating wall perfused bioreactor. *Biotechnol Bioeng* **87**, 473, 2004.
 12. Brandenberger, R., Wei, H., Zhang, S., Lei, S., Murage, J., Fisk, G.J., Li, Y., Xu, C., Fang, R., Guegler, K., Rao, M.S., Mandalam, R., Lebkowski, J., and Stanton, L.W. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol* **22**, 707, 2004.
 13. Besser, D. Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. *J Biol Chem* **279**, 45076, 2004.
 14. Cai, J., Olson, J.M., Rao, M.S., Stanley, M., Taylor, E., and Ni, H.T. Development of antibodies to human embryonic stem cell antigens. *BMC Dev Biol* **5**, 26, 2005.
 15. Dang, S.M., and Zandstra, P.W. Scalable production of embryonic stem cell-derived cells. *Methods Mol Biol* **290**, 353, 2005.
 16. Hammond, T.G., and Hammond, J.M. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F12, 2001.
 17. Dang, S.M., Gerecht-Nir, S., Chen, J., Itskovitz-Eldor, J., and Zandstra, P.W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells* **22**, 275, 2004.
 18. Rivera-Solorio, I., and Kleis, S.J. Model of the mass transport to the surface of animal cells cultured in a rotating bioreactor operated in micro gravity. *Biotechnol Bioeng* **94**, 495, 2006.
 19. Gilbertson, J.A., Sen, A., Behie, L.A., and Kallos, M.S. Scaled-up production of mammalian neural precursor cell aggregates in computer-controlled suspension bioreactors. *Biotechnol Bioeng* **94**, 783, 2006.
 20. Chen, X., Xu, H., Wan, C., McCaigue, M., and Li, G. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**, 2052, 2006.
 21. Wang, X., Wei, G., Yu, W., Zhao, Y., Yu, X., and Ma, X. Scalable producing embryoid bodies by rotary cell culture system and constructing engineered cardiac tissue with ES-derived cardiomyocytes *in vitro*. *Biotechnol Prog* **22**, 811, 2006.
 22. Yuge, L., Kajiume, T., Tahara, H., Kawahara, Y., Umeda, C., Yoshimoto, R., Wu, S.L., Yamaoka, K., Asashima, M., Kataoka, K., and Ide, T. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev* **15**, 921, 2006.
 23. Schumpp, B., and Schlaeger, E.J. Optimization of culture conditions for high cell prodensity liferation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J Cell Sci* **97 (Pt 4)**, 639, 1990.
 24. Liu, Y., Liu, T., Fan, X., Ma, X., and Cui, Z. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. *J Biotechnol* **124**, 592, 2006.
 25. Cameron, D.F., Hushen, J.J., Colina, L., Mallery, J., Willing, A., Sanberg, P.R., and Saporta, S. Formation and structure of transplantable tissue constructs generated in simulated microgravity from Sertoli cells and neuron precursors. *Cell Transplant* **13**, 755, 2004.
 26. Brederlau, A., Correia, A.S., Anisimov, S.V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., Carta, M., Hanse, E., Takahashi, J., Sasai, Y., Funai, K., Brundin, P., Eriksson, P.S., and Li, J.Y. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of *in vitro* differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* **24**, 1433, 2006.

Address reprint requests to:

Michel Cailleret, M.S.
INSERM/UEVE U 861
I-STEM, AFM
5 rue Henri Desbruères
Evry 91030 Cedex
France

E-mail: mcailleret@istem.genethon.fr

Received: January 16, 2008

Accepted: June 9, 2008

4. Annexe 3

Matériel et méthodes.

Culture de cellules souches embryonnaires (hES) :

Les cellules hES (H9, XX, passage 60-80, WiCell Research Institute Madison, USA) sont cultivées sur des cellules nourricières (lignée de fibroblastes murins STO, ATCC). Les STO sont entretenues dans un milieu composé d' α -MEM (+glutamax), de 10% de sérum de veau foetal, 1% d'acides aminés non-essentiels et 1% de pénicilline/streptomycine (tous d'Invitrogen). Les STO sont traitées 12 heures (à 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou 2 à 3 heures (à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) avec de la mitomycine C (Sigma) afin d'inactiver leur mitose, puis sontensemencées à 5.10^4 cellules/ cm^2 sur des boîtes traitées avec de la gélatine 0,1% (Sigma). Le milieu de culture des cellules hES est constitué de DMEM/F12 (+glutamaxI) supplémenté avec 20% de KSR (Knock-out Serum Replacement), 1 mM d'acides aminés non essentiels, 1% de pénicilline/streptomycine, 0,55 mM de β -mercaptoethanol et 5 ng/mL de FGF2 recombinant humain (tous d'Invitrogen). Ce milieu est renouvelé tous les jours. Les cellules hES sont cultivées à 37°C sous 5% de CO_2 . Les cellules hES sont passées manuellement, sans traitement enzymatique, tous les 4 à 5 jours.

Induction neurale des cellules hES en monocouche adhérente:

Les cellules hES, confluentes à 70-80%, sont tout d'abord lavées une fois avec du milieu « N2B27 », composé, en volume, de 48% de DMEM/F-12, 48% de Neurobasal, 1% de complément N2, 2% de complément B27, 1% de pénicilline/streptomycine, et avec 0,55 mM beta-mercaptoethanol (tous d'Invitrogen). Les cellules hES sont ensuite placées dans du milieu « N2B27 » supplémenté avec 10 μM de Y27632 (inhibiteur de ROCK, Calbiochem) et/ou 400ng/ml de Noggin (R et D systems) et/ou 20 μM de SB431542 (Tocris). Les cellules sont ensuite récoltées manuellement, centrifugées puis re-suspendues dans du milieu « N2B27 » en présence ou non de Noggin (400 ng/ml) et de SB431542 (20 μM). Les cellules sont ensuite transférées dans des boîtes non traitées pour la culture et cultivées en suspension pendant 6 heures à 37°C sous 5% de CO_2 . Dans ces conditions, les cellules hES se regroupent sous forme de très petits agrégats et les cellules nourricières résiduelles sont éliminées par adhérence au plastique. Au bout des 6 heures, les -agrégats de cellules sont transférés dans des boîtes de culture traitées poly-ornithine (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma) /laminine (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma) dans le même milieu. Le milieu de culture, complémenté ou non avec Noggin et SB, est ensuite remplacé tous les deux jours pendant 8 à 10 à jours jusqu'à apparition des structures en rosettes de cellules neuroépithéliales.

Transcription inverse et PCR quantitative en temps réelle :

L'extraction des ARN totaux des cellules en culture est réalisée grâce au kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus par la transcription inverse d'un microgramme d'ARN avec l'enzyme Superscript II (Invitrogen) en utilisant des amorces aléatoires selon les instructions du fabricant.

Les réactions de PCR quantitatives en temps réel (Q-PCR) sont réalisées, dans un volume final de 24 μL , à partir du produit de la transcription inverse dilué 200 fois, d'amorces sens et antisens à

150nM et de 12µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les réactifs sont alors placés dans un thermocycleur Chromo 4TM Real-Time system (Applied Biosystems) et subissent 45 cycles d'amplification.

L'efficacité d'amplification de chaque couple d'amorces a été préalablement déterminée par comparaison avec une courbe standard générée avec un gradient de dilution d'ADNc de cerveau fœtal (Clontech). La quantification est réalisée au seuil de détection de la fluorescence (Ct), c'est-à-dire le nombre de cycles nécessaires à ce que la fluorescence de l'échantillon sorte du bruit de fond). Le Ct de chaque gène cible est normalisé, au sein du même échantillon d'ADNc par rapport au Ct du gène de cyclophiline, un gène de ménage. Le niveau d'expression relatif de chaque gène est calculé selon la méthode dite du « $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ».

Les amorces utilisées sont les suivantes : OCT4 (Sens (F): ; Anti-sens(R): , NANOG (F: caaaggcaacaaccactt; R: tctgctggaggctgaggtat), SOX1 (F: atgcaccgctacgacatgg; R: ctcatgtagccctgcgagttg), PAX6 (F: gccagcaacacacctagtca ; R: tgtgagggctgtgtctgttc), Cyclophiline (F: tgtg ccagggtggtgactt; R: tcaaatttctctccgtagatggactt).

Immunocytochimie :

Les cellules sont fixées 10 minutes à température ambiante avec du PFA 4%, puis incubées 30 minutes dans une solution de blocage composée de 2% de BSA et de 0,1% de Triton X-100 dans du PBS. L'incubation de l'anticorps primaire, dilué dans la solution de blocage, est faite sur la nuit à 4°C, sous agitation. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires et le DAPI (1µg/mL) pendant une heure à température ambiante dans le tampon de blocage. Pour l'analyse des cellules les anticorps suivants sont utilisés. Anticorps polyclonaux de lapin : Pax6 (Covance, 1/800), Sox2 (Chemicon, 1/1000), Nanog (R et D,1/1000). Anticorps monoclonaux de souris: Oct4 (Chemicon, 1/400). Les anticorps secondaires (monoclonaux, de chèvre), anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris sont respectivement couplés à l'Alexa 555 et à l'Alexa 488 (Invitrogen, 1/1000).

Cytométrie de flux (FACS) :

Afin d'obtenir une suspension cellulaire, les cellules sont dissociées par incubation avec une solution de trypsine (GIBCO) pendant 5 minutes à 37°C puis la réaction est neutralisée par rajout d'une solution de PBS contenant 2% de SVF. Après centrifugation à 900 rpm pendant 5 minutes, le culot est repris dans du PBS-SVF 2%. Le marquage est effectué en utilisant les anticorps suivant : IgG1κ de souris anti-Oct4 humain couplé à la phycoérythrine (PE) fluorescent en rouge (BD Biosciences Pharmingen™), IgG1κ de souris anti-Sox2 (BD Biosciences Pharmingen™). Pour ces deux anticorps, une étape de perméabilisation est requise. Pour cela les cellules sont incubées dans une solution de PBS contenant 0,2% de saponine, 30 minutes à température ambiante avant le marquage. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps approprié pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière et aux dilutions suivantes : Oct4-PE : 1/10, Sox2-PE : 1/10. Après neutralisation par un large

excès de PBS-SVF 2%, la suspension cellulaire est centrifugée à 900 rpm pendant 5 minutes et repris avec 500µL de PBS-SVF 2%. L'analyse est effectuée à l'aide du cytomètre FACScalibur, Beckton-Dickinson®.