

2M11.2593.8

Université de Montréal

Réaction astrocytaire à l'implantation de tissu  
nerveux foetal dans le néostriatum du rat nouveau-né ou adulte

par

Nancy Quenneville

Département de pathologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences neurologiques

Janvier 1998

©Nancy Quenneville, 1998



8-EP26 11185

W  
4  
U58  
1998  
V.022

Université de Montréal

Réaction astérocytaire à l'implantation de tissu  
nerveux focal dans le néocortex du rat nouveau-né ou adulte

par

Nancy Guenneville

Département de pathologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences (M.Sc.)

en sciences neurologiques

Janvier 1998

Nancy Guenneville 1998



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

«Réaction astrocytaire à l'implantation de tissu nerveux foetal  
dans le néostriatum du rat nouveau-né ou adulte»

présenté par

Nancy Quenneville

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Richard Robitaille, président-rapporteur

Guy Doucet, directeur de recherche

Nicole Leclerc, membre du jury

Mémoire accepté le: 26.01.1998

## SOMMAIRE

Des études antérieures dans notre laboratoire ont montré que l'intégration anatomique des greffes intrastriales de tissu mésencéphalique ventral foetal est plus importante chez les receveurs nouveau-nés que chez les receveurs adultes. En vue de mieux comprendre le rôle des astrocytes dans ce phénomène, nous avons examiné la réaction astrocytaire par immunocytochimie pour les protéines des filaments intermédiaires GFAP et vimentine, 1, 5, 10, 30 et 60 jours après l'implantation intrastriale de tissu mésencéphalique ventral foetal dans le néostriatum du rat nouveau-né (P1), juvénile (P15) ou adulte. Puisque les greffes intrastriales de tissu homotypique (striatal) s'intègrent mieux que les greffes intrastriales de tissu hétérotypique (mésencéphalique), nous avons aussi examiné la réaction astrocytaire 10 et 30 jours après l'implantation de tissu striatal foetal. Entre 1 et 10 jours post-implantation (JPI), l'immunoréactivité pour la GFAP est plus forte et plus étendue chez le nouveau-né que chez l'adulte. Chez le receveur adulte, une cicatrice astrocytaire GFAP-positif apparaît à partir du 10<sup>e</sup> JPI et persiste au moins jusqu'au 60<sup>e</sup> JPI. Cette cicatrice astrocytaire est absente chez le greffé nouveau-né. Dans les tissus de l'hôte, l'immunoréactivité pour la vimentine est uniquement observée au 5<sup>e</sup> JPI chez l'adulte, au pourtour de la greffe, tandis qu'elle est très abondante dans la glie radiaire du SNC immature jusqu'au 10<sup>e</sup> JPI. À l'intérieur de la greffe, l'immunoréactivité pour la vimentine est plus importante chez l'adulte que chez le nouveau-né, à tout les temps observés. À des temps avancés après l'implantation, les cellules exprimant la vimentine dans la greffe

adoptent une distribution semblable à celle des astrocytes exprimant la GFAP. Toutefois, la morphologie de ces deux populations de cellules est différente. Chez les rats juvéniles, la greffe est d'abord semblable à celle des adultes (au 10<sup>e</sup> JPI), avec un début d'élaboration d'une cicatrice gliale, mais au 30<sup>e</sup> JPI elle ressemble plutôt à celle des nouveau-nés, avec la perte de la cicatrice gliale initialement formée. Les greffes intrastriatales homotypiques n'induisent pas la formation d'une cicatrice gliale aussi dense et compacte que les greffes intrastriatales hétérotypiques. Ces différences de réactivité astrocytaire entre les groupes examinés pourraient jouer un rôle dans les différences d'intégration anatomique des greffes.

**Mots clés:** Astroglie, Cicatrice gliale, Transplantation neuronale, GFAP, Vimentine, Immunohistochimie, Nouveau-né, Adulte, Rat.

## TABLE DES MATIÈRES

<i>Sommaire</i> .....	ii
<i>Table des matières</i> .....	iv
<i>Liste des figures</i> .....	vi
<i>Liste des sigles et abréviations</i> .....	vii
<i>Remerciements</i> .....	ix
<i>Contribution des différents auteurs à l'article</i> .....	x
Chapitre 1: Introduction générale.....	1
1.1. Facteurs potentiellement responsables de la diminution de plasticité dans le système nerveux central adulte.....	3
1.2. Astrocytes et développement.....	5
1.3. Réaction du système nerveux central aux lésions: l'astroglie.....	6
1.3.1. Caractéristiques de l'astroglie.....	7
1.3.2. Décours temporel de la réaction astrocytaire dans le système nerveux central adulte.....	8
1.3.3. Décours temporel de la réaction astrocytaire dans le système nerveux central immature.....	9
1.3.4. Rôle des filaments intermédiaires astrocytaires.....	9
1.3.5. Mécanismes d'activation de l'astroglie.....	10
1.4. Conséquences de l'astroglie sur la régénération.....	11
1.5. Objectif de cette étude.....	13
Chapitre 2: "Astrocytic reaction to the implantation of fetal ventral mesencephalic tissue into the neostriatum of newborn or adult rat".....	14
"Abstract".....	16
"Introduction".....	18
"Materials and Methods".....	20
"Results".....	23
"Discussion".....	29

"Acknowledgments".....	37
"References".....	37
"Figure legends".....	46
Chapitre 3: Discussion générale.....	55
3.1. Réaction astrocytaire initiale dans le cerveau receveur.....	57
3.1.1. Expression de GFAP dans le cerveau receveur: différences entre nouveau-nés, juvéniles et adultes.....	57
3.1.2. Différences entre animaux lésés et greffés.....	59
3.1.3. Expression de vimentine dans le cerveau de l'hôte....	60
3.2. Réaction astrocytaire à l'intérieur de la greffe.....	61
3.2.1. Origine des cellules exprimant la GFAP dans la greffe.....	61
3.2.2. Expression de vimentine dans la greffe.....	61
3.3. Établissement d'une cicatrice gliale.....	63
3.3.1. Différence entre les nouveau-nés et les adultes.....	63
3.3.2. Cicatrice astrocytaire chez les rats lésés.....	64
3.3.3. Greffes homotypiques vs greffes hétérotypiques.....	64
3.3.4. Origine des astrocytes dans la greffe et la cicatrice astrocytaire.....	65
Conclusion.....	65
Bibliographie générale .....	68

## LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1:** Astrocyte réactif à la GFAP.....48
- FIGURE 2:** Cerveaux témoins.....49
- FIGURE 3:** Expression de GFAP dans le striatum du rat nouveau-né ou adulte suite à l'implantation d'une greffe de tissu mésencéphalique foetal.....50
- FIGURE 4:** Faible grossissement d'un hémisphère cérébral, cinq jours après la transplantation de tissu mésencéphalique ventral foetal chez le nouveau-né et chez l'adulte.....48
- FIGURE 5:** Expression de GFAP et de vimentine dans le striatum du rat juvénile 10 et 60 jours après l'implantation de tissu mésencéphalique ventral foetal.....51
- FIGURE 6:** Expression de vimentine dans le striatum du rat nouveau-né ou adulte suite à l'implantation de tissu mésencéphalique foetal.....52
- FIGURE 7:** Expression de GFAP et de vimentine dans le striatum du rat adulte suite à l'implantation de tissu mésencéphalique ou striatal foetal.....53
- FIGURE 8:** Expression de GFAP et de vimentine dans le striatum du rat nouveau-né ou adulte lésé.....54



**LISTE DES SIGLES DES ABRÉVIATIONS**

ABC:	Complexe avidine-biotine-peroxydase (Avidin-biotin complex)
CS-PG:	Protéoglycane chondroïtine sulfate
DA:	Dopamine ou dopaminergique
DAB:	3'3' Diaminobenzidine
DARPP-32:	Phosphoprotéine de 32 KDa régulée par la dopamine et l'adénosine (Dopamine- and adenosine-regulated phosphoprotein-32)
GFAP:	Protéine gliale fibrillaire acide (Glial fibrillary acidic protein)
HS-PG:	Protéoglycane héparane sulfate
IFN:	Interféron
IL:	Interleukine
JPI:	Jour post-implantation
PBS:	Saline tamponnée au phosphate sodique (Phosphate-buffered saline)
P1;P15:	Premier; 15ième jour post-natal
PID:	Jour post-implantation (Post-implantation day)
PLD:	Jour post-lésion (Post-lesion day)
SNC:	Système nerveux central
SVZ:	Zone sous-ventriculaire
TGF:	Facteur de croissance transformant (Transforming growth factor)
TH:	Tyrosine hydroxylase
TNF:	Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor)
5-HT:	Sérotonine ou sérotoninergique (5-hydroxytryptamine)

à mes parents,  
qui m'ont toujours encouragée dans tous mes  
projets, et dont l'amour et le soutien m'ont permis  
de progresser tout au long de mes études

à Gary,  
pour son soutien moral constant à travers joies et difficultés

## REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord exprimer ma sincère reconnaissance envers le docteur Guy Doucet, directeur de ce mémoire, pour tous les précieux conseils qu'il n'a cessé de dispenser tout au long de ce travail, pour sa grande disponibilité, ainsi que pour l'excellent encadrement qu'il a su m'apporter.

J'aimerais tout particulièrement remercier Madame Annie Vallée et Monsieur Philippe Pierret pour leur aide sans réserve, leurs encouragements et, surtout, pour leur précieuse amitié.

Je veux également remercier tout le personnel du département pour sa gentillesse et pour les services dont j'ai bénéficié au cours de ce travail, ainsi que mes collègues de travail pour l'ambiance de travail stimulante qu'ils ont apportée.

Je remercie finalement le Groupe de recherche sur le système nerveux central (Subvention de centre FCAR) pour son support financier.

**Contribution des différents auteurs à l'article présenté dans ce mémoire:**

Nancy Quenneville est la principale responsable du projet. Elle a effectué la majeure partie de l'expérimentation (greffes et sacrifices des rats, immunocytochimie) et elle a fait l'analyse des résultats ainsi que la rédaction de l'article.

Dr Guy Doucet a supervisé le projet et a participé à l'expérimentation ainsi qu'à la rédaction de l'article.

Phillipe Pierret a agi en tant qu'assistant lors des séances de greffes des rats ainsi que lors de leur sacrifice. Il a également contribué à l'analyse des résultats et à la correction de l'article.

**CHAPITRE 1**  
**INTRODUCTION GÉNÉRALE**

La transplantation de tissu nerveux dans le système nerveux central (SNC) des mammifères est devenue un champs d'étude très actif durant les deux dernières décennies, non seulement parce qu'elle peut déboucher sur des applications cliniques, mais aussi parce qu'elle permet l'étude des mécanismes de la régénération neuronale. Les greffes de tissu mésencéphalique ventral embryonnaire ont été particulièrement étudiées car elles pourraient constituer un traitement pour la maladie de Parkinson<sup>17</sup>. Malgré une recherche active dans ce domaine, les mécanismes régissant l'intégration anatomique et physiologique des greffes demeurent encore mals connus<sup>17,25,60b</sup>.

L'intégration d'une greffe dans le cerveau receveur dépend particulièrement de la capacité des neurones greffés et des neurones du receveur d'établir des connexions réciproques appropriées et fonctionnelles. Il est bien connu que les axones du SNC immature ont un potentiel de croissance et de régénération plus important que les axones du SNC adulte. En effet, les axones du SNC immature ont la capacité de croître sur des distances considérables, mais cette capacité diminue progressivement avec l'âge<sup>29,70,93,111,135</sup>. Les résultats de notre laboratoire, entre autres, ont montré que l'intégration des greffes mésencéphaliques dans le néostriatum est plus grande chez des rats greffés au stade néonatal que chez des rats adultes. Les neurones dopaminergiques (DA) greffés infiltrent et innervent une plus grande étendue du cerveau receveur. De surcroît, les neurones à sérotonine (5-HT) de l'hôte n'innervent que les greffons implantés chez des hôtes âgés de moins de 14 jours<sup>99</sup>. L'ensemble de ces observations suggère la présence d'éléments favorisant la croissance axonale dans le SNC immature et/ou l'existence d'éléments inhibiteurs dans le SNC adulte.

Les données actuelles pointent vers les astrocytes et les oligodendrocytes du SNC adulte comme éléments déterminants à cet effet. Ces cellules subissent des changements durant leur maturation, et deviennent peu favorable à supporter la croissance axonale<sup>69,92,100,125,128,133,146</sup>. Nous avons ici cherché à comparer la réactivité astrocytaire après la transplantation neuronale chez le rat nouveau-né, juvénile et adulte pour voir si cette réactivité pouvait être corrélée avec le degré d'intégration des greffes.

### **1.1. FACTEURS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA DIMINUTION DE PLASTICITÉ DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ADULTE.**

La perte de plasticité des neurones adultes pourrait contribuer à diminuer la régénération dans le SNC des mammifères adultes. Par exemple, la croissance neuritique des cellules ganglionnaires de la rétine sur un substrat de laminine diminue avec la maturation des neurones<sup>34</sup>, ceci étant dû à une diminution des récepteurs de la laminine<sup>33</sup>. Toutefois, l'échec de régénération dans le SNC des mammifères adultes n'est pas entièrement dû à une propriété intrinsèque des neurones matures. En effet, des études ont montré que les axones de neurones adultes lésés sont capables de régénérer sur des distances considérables lorsqu'ils sont placés dans des conditions adéquates, comme par exemple en présence d'implants de nerf périphérique<sup>2</sup>, ou encore de tissu embryonnaire du SNC<sup>18,23</sup>. Ces études suggèrent donc que des facteurs présents dans l'environnement des neurones sont responsables de la capacité limitée de régénération dans le SNC adulte.

Plusieurs études ont montré que les oligodendrocytes adultes sont capables d'inhiber la croissance axonale *in vitro* <sup>100,125</sup>. En effet, les prolongements neuronaux semblent éviter les oligodendrocytes adultes *in vitro* <sup>125</sup> et les cônes de croissance s'affaissent lorsqu'ils entrent en contact avec ces oligodendrocytes<sup>10</sup>. Ce phénomène serait dû à des glycoprotéines exprimées dans la myéline des oligodendrocytes adultes: NI-35, NI-250<sup>30</sup> et la MAG (myelin associated glycoprotein)<sup>92,100</sup>. La régénération des axones adultes lésés augmente *in vivo* lorsque l'activité inhibitrice des oligodendrocytes est bloquée, soit en éliminant les oligodendrocytes par irradiation de leur précurseurs durant leur phase de prolifération<sup>119</sup>, ou par l'application de l'anticorps monoclonal IN-1, dirigé contre des glycoprotéines inhibitrices de la myéline<sup>124</sup>. Cependant, la majorité des axones qui régénèrent contournent le site de lésion mais semblent incapables de le traverser. Ceci suggère que l'effet inhibiteur des oligodendrocytes n'explique pas à lui seul l'absence de régénération dans le SNC lésé et qu'il existe d'autres facteurs capables d'inhiber la croissance axonale sur un site de lésion.

Les astrocytes immatures ont un effet permissif sur la croissance axonale<sup>131</sup>, mais cette propriété diminue avec leur maturation<sup>69,128,133,146</sup>. En effet, la croissance des prolongements neuronaux est plus importante lorsque des neurones embryonnaires sont cultivés sur des astrocytes immatures plutôt que sur des astrocytes adultes<sup>44,69,78,91,131,132</sup>. De plus, la transplantation d'astrocytes immatures, mais non d'astrocytes adultes, peut favoriser la régénération d'axones lésés<sup>128,146</sup>.

Chacun des facteurs énumérés ci-haut pourrait contribuer à réduire la plasticité anatomique dans le SNC adulte. Dans le cadre de la



présente étude, nous avons choisi d'investiguer le rôle d'un de ces facteurs, soit celui des astrocytes réactifs, dans l'inhibition de la croissance axonale. Avant de décrire la gliose et les changements qui se produisent avec la maturation des astrocytes, il est nécessaire de comprendre la gliogénèse et le développement des astrocytes.

## 1.2 ASTROCYTES ET DÉVELOPPEMENT

Durant le développement, les astrocytes proviennent à la fois des précurseurs de la zone germinale sous-ventriculaire (SVZ) et de la glie radiaire. De la fin de la période de gestation jusqu'au début de la vie postnatale, des astrocytes sont générés à partir des précurseurs de la SVZ. Ces précurseurs (O2A?) migrent ensuite hors de la SVZ jusqu'à leur destination finale, où ils se différencient en astrocytes et oligodendrocytes<sup>56</sup>. Les astrocytes se différencient également à partir de la glie radiaire, qui est établie à partir de la SVZ en même temps que la neurogénèse et la migration neuronale<sup>95,141</sup>. La glie radiaire est formée de longs prolongements qui traversent la paroi du tube neural, entre les ventricules et la pie-mère. Ces prolongements servent à guider la migration des neurones et des cellules gliales de la SVZ, où ils sont formés, jusqu'à leur site de résidence final<sup>110</sup>. Lorsque la migration des neurones est terminée, la glie radiaire se transforme en astrocytes et ne persiste qu'à certains endroits dans le SNC, notamment au niveau de l'hippocampe, du cortex cérébelleux et de la ligne médiane du tronc cérébral<sup>108,141</sup>. Cette transformation se fait de manière graduelle et des formes intermédiaires entre les deux types de cellule peuvent être observées<sup>122</sup>. Chez le rat, cette transformation de la glie radiaire en astrocytes débute à la fin de la période embryonnaire et se termine entre

les deuxième et troisième semaines post-natales<sup>95,108</sup>.

Dans le SNC adulte, des astrocytes sont continuellement générés à partir de progéniteurs, mais le nombre total d'astrocytes n'augmente pas puisque la production est contrebalancée par la perte<sup>89</sup>. La nature de ces progéniteurs n'est pas connue, mais les cellules immatures de type O-2A<sup>103</sup> et la glie NG-2-positive<sup>79</sup> ont été proposées comme candidates. Suite à une lésion du SNC, certains astrocytes réactifs prolifèrent et peuvent générer de nouveaux astrocytes, mais ceci est limité à une faible proportion de la population des astrocytes réactifs<sup>75</sup>.

La glie radiaire peut être visualisée par immunocytochimie de la vimentine<sup>108,141</sup>. Durant le processus de maturation de la glie radiaire en astrocytes adultes, l'expression de la vimentine diminue alors que celle de la GFAP augmente<sup>108,141</sup>. Ces modifications se font graduellement, de sorte que l'expression des deux protéines se chevauche à un stade intermédiaire entre la glie radiaire et l'astrocyte adulte.

### **1.3. RÉACTION DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL AUX LÉSIONS: L'ASTROGLIOSE**

#### **1.3.1. Caractéristiques de l'astrogliose**

Les astrocytes jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie dans le SNC. Cette fonction est essentielle pour les neurones, qui requièrent un environnement stable pour leur survie et leur fonction. Lorsque l'intégrité du SNC est compromise, les astrocytes réagissent en s'hypertrophiant et en proliférant. Ces astrocytes sont dits "réactifs" et cette réaction est appelée "astrogliose". Dans certains cas, les astrocytes réactifs finissent par former une masse compacte au site de lésion: la cicatrice gliale<sup>15,16,88,112</sup>. L'astrogliose peut être induite par des

lésions mécaniques<sup>15,88,136</sup>, chimiques<sup>62,87</sup>, ischémiques<sup>71,123</sup>, ou encore par des maladies neurodégénératives<sup>42</sup>.

Les astrocytes réactifs diffèrent des astrocytes quiescents sous plusieurs aspects. Ils ont un corps cellulaire augmenté de volume, des prolongements plus nombreux et plus épais, une quantité supérieure de filaments intermédiaires<sup>42</sup> et sont caractérisés par plusieurs changements ultrastructuraux: augmentation du nombre d'organites, de particules de glycogène ainsi que de la taille du noyau, du golgi, et du réticulum endoplasmique<sup>138</sup>.

Les astrocytes réactifs expriment aussi plusieurs molécules qui les rendent facilement identifiables au microscope. Il y a d'abord une surexpression de la GFAP ("glial fibrillary acidic protein"), protéine des filaments intermédiaires exprimée spécifiquement par les astrocytes (dans le SNC)<sup>42,66,123</sup>. Certains astrocytes expriment aussi la vimentine<sup>66,106,108,121,136</sup>, protéine des filaments intermédiaires normalement exprimée dans les astrocytes immatures, la glie radiaire<sup>106,108,121</sup> ainsi que plusieurs autres cellules (les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules neuroépithéliales, la microglie réactive<sup>35</sup>). Les astrocytes réactifs peuvent aussi exprimer des molécules de la matrice extra-cellulaire qui ont des propriétés inhibitrices de la croissance axonale, comme la ténascine<sup>24,43,76</sup> et certaines protéoglycanes<sup>21,28</sup>, ou d'autres qui la favorisent, du moins *in vitro*, comme la laminine<sup>21,81</sup>.

### 1.3.2. Décours temporel de la réaction astrocytaire dans le système nerveux central adulte

La réaction gliale dans le SNC lésé du rat adulte est détectable trois heures après une lésion<sup>60a</sup>. À ce moment, quelques astrocytes réactifs apparaissent dans les régions adjacentes à la lésion. Par la suite, le nombre d'astrocytes réactifs autour de la lésion et dans l'hémisphère ipsilatéral augmente pour atteindre un maximum au quatrième jour après la lésion. Le nombre d'astrocytes réactifs dans l'hémisphère ipsilatéral diminue ensuite progressivement jusqu'à deux mois après la lésion. Après ce temps les astrocytes réactifs persistent uniquement à l'interface entre le site de lésion et le tissu sain, où ils forment une cicatrice gliale<sup>40,60a,66,88,137</sup>.

La durée et l'intensité de la réaction gliale varient selon l'âge du sujet, l'importance de la lésion<sup>106</sup> et la région du SNC qui est lésée<sup>59,88</sup>. Il existe une hétérogénéité régionale dans la morphologie et l'expression de molécules par les astrocytes réactifs. En effet, selon une étude récente, les astrocytes réactifs du cortex, corps calleux et hippocampe expriment la vimentine et ont de longs prolongements entrelacés, tandis que ceux du thalamus n'expriment pas la vimentine ont des prolongements courts et épais<sup>59</sup>. Certains auteurs ont aussi démontré qu'il existe une faible réaction astrocytaire dans l'hémisphère controlatéral à la lésion<sup>98</sup>, mais cette opinion est controversée<sup>60a,88</sup>. Une faible réaction astrocytaire a aussi été observée dans les zones de projection d'une région lésée<sup>62</sup>.

Les astrocytes exprimant la vimentine dans le SNC adulte sont trouvés uniquement dans les régions adjacentes à une lésion<sup>27,66,105,108</sup>. Cette expression de vimentine apparaît 24 heures après la lésion. Le nombre d'astrocytes exprimant cette protéine augmente ensuite

progressivement pour atteindre un maximum au 4<sup>e</sup> jour après la lésion, puis diminue graduellement jusqu'au 15<sup>e</sup> jour après la lésion<sup>65,120</sup>. Certains de ces astrocytes expriment à la fois la vimentine et la GFAP<sup>66</sup>.

### **1.3.3. Décours temporel de la réaction astrocytaire dans le système nerveux central immature**

L'ampleur de l'astroglie induite par une lésion dans le SNC immature demeure controversée. Selon certains auteurs, la réaction gliale dans le SNC immature est faible et transitoire en réponse à une lésion mécanique du cerveau<sup>15,96</sup>, de la moelle épinière<sup>12,13,46</sup> ou d'une racine dorsale<sup>51,101</sup>. Cependant, d'autres auteurs ont décrit une prolifération astrocytaire intense dans le cerveau immature du rat<sup>64,67</sup> et de l'humain<sup>114</sup> par suite de lésions mécaniques. Une étude récente a aussi démontré une réaction astrocytaire intense en réponse à l'implantation d'un morceau de membrane de nitrocellulose dans le cortex de souris néonatales<sup>7</sup>. D'autre part, aucune différence morphologique<sup>105</sup> ou ultrastructurale<sup>139</sup> n'a été trouvée entre la gliose des nouveau-nés et celle des adultes produites par dégénérescence Wallerienne du nerf optique ou du tractus corticospinal. Cependant, on a rapporté que la formation d'une cicatrice gliale est plus précoce dans le SNC immature<sup>139</sup>.

### **1.3.4. Rôle des filaments intermédiaires astrocytaires**

Le rôle exact des filaments intermédiaires des astrocytes n'est pas connu, mais on pense qu'ils servent à procurer un support structural pour maintenir la forme des cellules et stabiliser leurs prolongements<sup>55a,77</sup>. En effet, la formation de prolongements astrocytaires est supprimée suite à l'inhibition de la synthèse de GFAP par

la transfection du RNAm antisens dans une lignée cellulaire d'astrocytome<sup>77</sup>. Certains auteurs ont aussi proposé que la GFAP joue un rôle dans l'inhibition de la croissance axonale par les astrocytes, puisqu'il y a une corrélation temporelle entre l'apparition de la GFAP et la diminution de la permissivité à la croissance axonale durant le développement<sup>77,111</sup>. Des études ont donc été entreprises pour évaluer la conséquence d'une inhibition de la synthèse de GFAP sur l'astroglie et la croissance axonale suite à une lésion. Ainsi, l'inhibition de la synthèse du GFAP par la technique du RNAm antisens réduit l'hypertrophie des astrocytes réactifs dans un modèle d'astroglie *in vitro*<sup>77,148</sup>, et rend ceux-ci moins inhibiteurs à la croissance axonale<sup>77</sup>.

Il a aussi été proposé que la vimentine puisse stabiliser les filaments de GFAP dans les cellules qui expriment à la fois la GFAP et la vimentine<sup>47</sup>. En effet, une étude suggère que cette molécule soit nécessaire pour assembler la GFAP, puisque l'absence du gène codant pour la vimentine chez des souris transgéniques entraîne la perte de l'expression de GFAP par les astrocytes qui expriment normalement à la fois la GFAP et la vimentine (par exemple la glie de Bergman, une sous-population d'astrocyte du corps calleux et les astrocytes réactifs en proximité d'une lésion)<sup>47</sup>. L'expression de GFAP demeure cependant inchangée dans les astrocytes qui n'expriment normalement que la GFAP comme protéine de filament intermédiaire.

### 1.3.5. Mécanismes d'activation de l'astroglie

L'observation d'un gradient d'astrocytes réactifs à partir du site de lésion jusqu'à des régions éloignées du site de lésion suggère la présence d'un facteur diffusible produit au site de lésion. Une lésion dans

le SNC produit une activation de la microglie et, lorsque la barrière hémato-encéphalique est brisée, un recrutement de cellules en provenance du sang, soient des macrophages et des lymphocytes<sup>52</sup>. Ces cellules produisent des cytokines en réponse à une lésion. En effet, l'expression d'interleukine-1 (IL-1), interleukine-6 (IL-6), facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et de facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) est augmenté dans le SNC adulte lésé<sup>113</sup>. Plusieurs indices suggèrent que ces cytokines sont impliquées dans la modulation de l'astroglie. En effet, l'injection d'IL-1<sup>54</sup> ou d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>147</sup> dans le SNC adulte augmente la réaction astrocytaire. De surcroît, toutes ces cytokines mentionnées ont la capacité de potentialiser fortement l'astroglie induite par une lésion du SNC immature<sup>8</sup>. D'autre part, IL-10, un inhibiteur de la synthèse des cytokines, réduit l'astroglie dans le cortex lésé de la souris adulte<sup>9</sup>. Des études récentes ont aussi montré une corrélation significative entre l'intensité de l'astroglie, l'expression de cytokines (IL-1 et TNF- $\alpha$ ) et le nombre de cellules microgliales réactives par suite d'une lésion dans le SNC immature<sup>7,116</sup>.

#### 1.4 CONSÉQUENCES DE L'ASTROGLIOSE SUR LA RÉGÉNÉRATION

Le rôle des astrocytes réactifs dans le SNC demeure toujours controversé. Dans plusieurs processus pathologiques, la réaction gliale entraîne la formation d'une masse compacte d'astrocytes réactifs au site de lésion. Cette cicatrice gliale est classiquement considérée comme étant néfaste à la régénération axonale<sup>83,88,111</sup>. Cependant, des études récentes suggèrent que l'astroglie peut aussi favoriser la guérison du SNC lésé. Les astrocytes sont capables de produire une variété de molécules neurotrophiques au site de lésion<sup>5,73,143</sup> et ils peuvent, dans certains cas,

être permissifs à la croissance axonale tant *in vitro* qu'*in vivo*<sup>72,82,102,129</sup>. Les astrocytes peuvent aussi influencer la croissance des axones en sécrétant des molécules de la matrice extra-cellulaire promotrices de la croissance axonale, par exemple la laminine<sup>81</sup>. Ils sont également capables de participer à la réaction immunitaire<sup>54</sup> et de phagocyter les débris par suite d'un traumatisme du SNC<sup>31</sup>.

L'hypothèse que la cicatrice gliale soit responsable de la capacité limitée de régénération dans le SNC mature est supportée par des expériences montrant que les cultures de cicatrices gliales<sup>117</sup> ou d'astrocytes réactifs<sup>78</sup>, ainsi que des membranes de cicatrices gliales isolées<sup>20</sup> sont non-permissives à la croissance axonale. De plus, dans un modèle d'astrogliose induite *in vitro*, il a été montré que la croissance axonale est bloquée au site de lésion, alors que lorsque l'astrogliose est inhibée, en empêchant la formation des gliofilaments GFAP, la croissance axonale est augmentée<sup>77</sup>. Des études *in vivo* supportent ces observations en montrant que les axones ne traversent pas une cicatrice gliale au site d'une lésion dans le SNC adulte<sup>36,80,83,111</sup>.

Cette inhibition de la régénération et de la croissance des axones serait due soit à la formation d'une barrière physique qui empêche la croissance axonale<sup>111</sup> ou à l'expression de molécules inhibitrices<sup>4,21,45a,78,90,91</sup>. Les candidats majeurs actuels sont des molécules de la matrice extra-cellulaire comme la ténascine et les protéoglycanes chondroïtine ou héparane sulfate (CS-PG et HS-PG)<sup>48,76,90,91,134</sup>.

Les propriétés inhibitrices des astrocytes réactifs augmentent avec leur maturation. En effet, la croissance axonale *in vitro* sur des explants de cicatrice gliale prélevés dans le SNC adulte est plus faible que



sur des cicatrices gliales prélevées chez les nouveau-nés<sup>91</sup>. La cicatrice gliale de l'adulte est caractérisée par la présence des molécules inhibitrices de la croissance axonale (ténascine et CS-PG), tandis que celle induite dans le SNC immature contient surtout des molécules promotrices de la croissance axonale (laminine, fibronectine et collagène)<sup>90,91,134</sup>. De plus, la digestion partielle des CS-PG augmente la croissance axonale sur des explants du SNC adulte, alors que la même procédure est sans effet avec des explants du SNC immature<sup>91</sup>.

## 1.5 OBJECTIF DE CETTE ÉTUDE

Suite à la transplantation de tissu fœtal dans le SNC adulte, il se produit une réaction gliale, puis une cicatrice se forme à l'interface hôte-greffe<sup>1,19,48,115,150</sup>. Cependant, la réaction à la transplantation dans le SNC immature n'a pas été documentée. Une différence entre la réaction gliale du SNC nouveau-né et celle du SNC adulte pourrait être responsable de la plus grande intégration des greffes dans le SNC nouveau-né. En vue d'évaluer cette possibilité, nous avons comparé la réaction astrocytaire à l'implantation de tissu mésencéphalique fœtal dans le striatum de rats nouveau-nés ou adultes.

Chez le rat adulte, il a été montré que les greffes intrastriales de tissu striatal fœtal s'intègrent mieux dans le cerveau receveur que celles de tissu mésencéphalique fœtal<sup>61,85,107,144</sup>. Nous avons donc aussi comparé la réaction gliale produite par la transplantation intrastriale soit de tissu mésencéphalique fœtal soit de tissu striatal fœtal chez des rats adultes.

## CHAPITRE 2

### "ASTROCYTIC REACTION TO THE IMPLANTATION OF FETAL VENTRAL MESENCEPHALIC TISSUE INTO THE NEOSTRIATUM OF NEWBORN OR ADULT RAT"

(Article soumis pour publication à *Experimental Neurology*)

**ASTROCYTIC REACTION TO THE IMPLANTATION OF FETAL  
VENTRAL MESENCEPHALIC TISSUE INTO THE NEOSTRIATUM OF  
NEWBORN OR ADULT RAT**

by

**N. QUENNEVILLE, P. PIERRET AND G. DOUCET**

Centre de recherche en sciences neurologiques and Département de  
pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, case postale 6128,  
succursale Centre-ville, Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

**Key words:** Astrogliosis, Glial Scar, Neural transplantation, Glial Fibrillary  
Acidic Protein (GFAP), Vimentin, Immunohistochemistry, Neonatal,  
Adult

**Running head:** Astrocytic reaction in newborn and adult rat

**Send proofs to:** Dr. Guy Doucet, Université de Montréal, Département de pathologie et biologie cellulaire, Case postale 6128, Succursale Centre-ville, Montréal (Québec) Canada H3C 3J7; Phone: (514) 343-6255; Fax: (514) 343-5755; E-mail: doucetg@ere.umontreal.ca

### **ABSTRACT**

To gain a better understanding of the mechanisms responsible for the much denser serotonin (5-HT) innervation of ventral mesencephalic grafts into the striatum of neonatal as opposed to adult recipients, we have examined the astroglial reaction 1,5, 10, 30 and 60 days following transplantation (post-implantation days or PID1 to PID60) into newborn (postnatal day 1 or P1), juvenile (P15) and adult rats. The gliosis was assessed using immunohistochemistry against glial fibrillary acidic protein (GFAP) and against vimentin, proteins constituting the intermediate filaments of mature and immature astrocytes, respectively. The GFAP immunostaining showed a stronger initial gliosis (between PID1 and PID10) in the neonatal recipients of mesencephalic grafts, but it subsided thereafter. On the other hand, a glial scar formed at PID10 at the graft periphery, but only in adult recipients, where it remained until PID60. Immunostained astrocytes were visualized only in the host brain tissue until PID10. Then, astrocytic processes and, later, perikarya gradually appeared inside the graft. The immunoreactivity for vimentin showed a totally different pattern, particularly in the graft where immunoreactive cells were already detected on PID1. There was also a striking difference in the number of such cells between grafts implanted

in neonatal and adult hosts, the latter being much more densely populated by vimentin-positive cells. These cells gradually elongated processes and eventually adopted a distribution within the graft that closely matched that of GFAP-immunoreactive astrocytes, although their morphology remained different. The grafts in juvenile recipients looked similar to grafts in adults at PID10, since they contained large numbers of vimentin-positive cells and displayed a glial scar, but they resembled grafts in neonates at PID30, since both the GFAP and vimentin immunoreactivities had considerably subsided. Since homotypic grafts of striatal tissue are densely innervated by 5-HT axons after implantation in the adult striatum, we have also examined the astroglial reaction to homotypic striatal grafts after PID10 and PID30. In such grafts, the accumulation of GFAP-positive astrocytes at the graft border was less compact and the density of vimentin immunostained cells was much lower than in mesencephalic grafts. The formation of an astrocytic scar was therefore inversely correlated with the 5-HT innervation of the grafts by the host. However, since the ingrowth of 5-HT axons could potentially occur during the first week after implantation, before the formation of a glial scar, other factors showing a better temporal correlation with this ingrowth are probably involved in the inhibition of graft innervation. In this context, the role of the vimentin-positive cells remains to be examined.

## INTRODUCTION

Previous studies have shown that the anatomical integration of intrastriatal ventral mesencephalic grafts is more substantial following implantation into newborn than into adult recipients. Indeed, the transplanted neurons infiltrate the host striatal tissue more extensively after implantation into the neonatal rat brain, while host serotonin axons innervate only the neonatally-implanted grafts (1, 20, 53).

It is well known that, in contrast with the adult brain, axons in the immature CNS are capable of growing for considerable distances past a lesion site (e.g. (14-16)). Several studies have suggested that the glial scar formed in the adult mammalian CNS following a lesion impedes axon growth (10, 67) and may play an important role in the absence of regeneration in the mature CNS. Previous work has also indicated that such glial scarring is absent or, at least, less important in immature brain (7, 10, 24, 27, 52), and may contribute to the better recovery from lesions in the immature CNS.

Almost any type of injury to the CNS induces an astrogliosis, i.e. a proliferation and hypertrophy of astrocytes (e.g. (3, 38, 40, 47, 78)). In addition to enlarged cell bodies and proximal processes, reactive astrocytes upregulate the expression of the intermediate filament protein Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Indeed, this feature is generally used as a means to detect reactive astrocytes, using GFAP immunostaining. Some reactive astrocytes also re-express vimentin (42, 68, 76), an intermediate filament protein normally found in immature astrocytes (61).

In the mature CNS, it has been reported that GFAP-positive reactive astrocytes are detectable as early as 3 hours after a stab wound (35). They then increase in number around the lesion site and, to a variable extent,

within the ipsilateral hemisphere. The intensity of astrogliosis reaches a maximum on the fourth day post-lesion (post-lesion day 4 or PLD4) and then gradually subsides over 2 months. However, reactive astrocytes persist as a tight mass on the site of lesion, forming a glial scar (23, 35, 51). Vimentin re-expression in astrocytes of the adult brain is detected 24 hours after a lesion, with a maximum also on PLD4 and a decline over the next 10 days (42, 68). It occurs exclusively in the vicinity of the lesion (18, 42, 57, 61).

In the immature CNS, most authors have reported weak astrogliosis in response to mechanical injury to the brain (10, 52), spinal cord (7, 8, 24) or dorsal roots (54), but some authors have also reported intense proliferation of astrocytes in the perinatal rat brain (40, 43) and in the immature human brain (64) in response to mechanical injury. Furthermore, a recent study revealed extensive astroglial reaction in response to implantation of a piece of nitrocellulose membrane in the neonatal cortex (5).

Following transplantation into the adult CNS, it has been reported that a glial scar forms at the graft-host interface that may, in some cases, persist more than 2 months (1, 13, 84). Meanwhile, little is known about the glial reaction induced by transplantation into the immature CNS. Differences in glial scar formation may be responsible for the different degrees of integration of the fetal neural tissue transplanted into neonatal versus mature hosts.

As a first step in evaluating this possibility, we have compared the astroglial reaction produced by transplantation of fetal ventral mesencephalic tissue into the neostriatum of neonatal, juvenile and adult rats. In addition, since grafts of fetal striatal tissue implanted into the

neostriatum of adult rats become better integrated into the host brain circuitry than intrastriatal grafts of fetal ventral mesencephalic tissue (37, 46, 49, 60, 80), we have examined the astrogliosis induced by the transplantation of fetal striatal tissue into the neostriatum of adult rats.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental animals**

In the present experiments, 91 female Sprague-Dawley rats were implanted with fetal ventral mesencephalic tissue on postnatal day one (P1; n=41), P15 (n=19), or as adults (200-250 g; n=31). Eight additional adult female rats were implanted with fetal striatal tissue. In addition, 13 P1 rats and 10 adults received saline injections at the same brain coordinates, to serve as sham controls. Lastly, 5 immature, untreated control rats were used. The experimental protocol was approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (Protocol #96035).

### **Transplantation procedures**

Cell aggregate suspensions of ventral mesencephalon or of the lateral eminence of the striatal primordium were prepared from E14-E15 rat fetuses (Crown-rump length 11-14 mm) and implanted into the right neostriatum, according to previously published procedures (12, 53). With P1 rats, implantation was done under methoxyflurane anesthesia (Metofane, Janssen Pharmaceutica, North York, ON, Canada) and artificial hibernation (cooling on ice, in a mould of the rat pup body fixed to the stereotaxic apparatus), while P15 and adult rats were anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada) diluted to 8 mg/ml, 60 mg/kg.

Aliquots of 1.5  $\mu$ l from a 50  $\mu$ l cell suspension prepared from 9 to 12 fetuses were injected using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe with a 26 gauge



needle. The injections were performed under stereotaxic control, 1 mm anterior to bregma, at the following coordinates for laterality and depth: for P1 rats: 2 mm to the right and 2.6 mm below dura; for P15 rats: 2.5 mm to the right and 3.5 mm below dura and for adult rats: 3 mm to the right and 5 mm below dura. The tooth bar was set at 0 in P15 and adult rats. The animals were kept in the animal facility room with food and water *ad libitum*. P1 and P15 recipients were returned to their mother until used, or placed in separate cages after weaning (at P21).

### **Immunocytochemistry**

Rats implanted with fetal ventral mesencephalic tissue, as well as shams injected with saline, were examined on post-implantation day 1 (PID1), PID5, 10, 20, 30, or 60, while the rats implanted with striatal tissue were examined on PID10 or 30. Untreated control rats were examined at P5, P10 and P20. The rats were perfused through the heart under deep sodium pentobarbital anesthesia (Somnotol, 80 mg/kg), with 15-25 ml of 0.01 M sodium phosphate-buffered (PBS) saline at pH 7.4, followed by 200-500 ml of a fixative solution containing 4% paraformaldehyde and 0.05% glutaraldehyde, buffered at pH 7.4 with 0.1 M sodium phosphate. A thick coronal slice (~4 mm-thick) of the brain was further fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde buffered at pH 7.4. Four series of 50 µm-thick sections were obtained on a vibratome, in 0.05 M Tris buffer (pH 7.4).

Three of the 4 series of sections were immunostained, free floating, with one of the following antibodies against either tyrosine hydroxylase (TH, rabbit polyclonal from Pel-Freez, 1:200; to visualize dopamine neurons in ventral mesencephalic grafts) or DARPP-32 (mouse monoclonal, generous gift from Dr. E.L Gustafson, Rockefeller University, 1:20 000; to visualize striatal neurons in striatal grafts), and against GFAP (Dakopatts, 1:2000) or

vimentin (V9, Boehringer Mannheim, 1:100). The remaining series was kept at -20°C in antifreeze solution (30 ml ethanol, 30 ml glycerol, 40 ml tris buffer) for eventual use.

GFAP and TH immunoreactivities were revealed with goat anti-rabbit IgGs (ICN, 1:100) and rabbit peroxidase-anti-peroxidase (Dakopatts, 1:1000), while vimentin and DARPP-32 immunoreactivities were revealed with biotinylated horse anti-mouse IgGs (Vector, 1:200) and an avidin-biotin-peroxidase-complex (Vector, ABC Vectastain Kit). Incubations were performed in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) and 2% normal goat serum (20% for pre-incubation) (NGS; ICN). During incubation with the first and second antibodies, penetration of the reagents was promoted by adding 0.5% Triton X-100 to the incubation medium. The chromogen used was 3-3'-diaminobenzidine (DAB) intensified with nickel and cobalt in the presence of peroxide (2, 36).

### **Analysis**

The analysis consisted in comparing the astroglial reaction induced by transplantation in the host brain and within the graft, in each group of experimental rats (P1, P15 and adult recipients perfused on PID1, 5, 10, 30 or 60). The cells expressing GFAP were considered as astrocytes since this intermediate filament protein is found exclusively in this cell type, in the CNS. Reactive astrocytes were distinguished from their quiescent counterparts by their enlarged perikarya and proximal processes, and by their increased immunoreactivity for GFAP (Fig. 1). The astroglial reaction was assessed on the basis of the distribution of reactive astrocytes and of the intensity of GFAP and vimentin immunostaining within and around the graft.

## RESULTS

### **Immunoreactivity in the control, untreated brains.**

**GFAP.** In the normal neonatal rat (Fig. 2A), GFAP immunoreactivity was found in the radial glial processes extending from the lateral ventricle and coursing laterally through the striatum, dorsally across the cerebral cortex, and along the corpus callosum. Stellate astrocytes were also visualized in the striatum.

In the adult brain (Fig. 2C), quiescent, GFAP-positive, stellate astrocytes were present in all brain areas examined, being more intensely immunoreactive and coarser in the corpus callosum.

**Vimentin.** In the P1 rat (Fig. 2B), vimentin immunoreactivity was found in the ventricular lining, in the corpus callosum and in the numerous radial glial fibres radiating from the ventricles, across the striatum and cerebral cortex. These vimentin-positive radial glial fibres were already absent from the brain at P15.

In the adult rat brain, vimentin immunoreactivity (Fig. 2D) was present exclusively in the corpus callosum and ventricular lining.

Nevertheless, a positive staining of small, round particles was also observed throughout the neonate as well as adult striatum with this anti-vimentin antibody. This labelling was present even following fixation of the brain with different fixatives (3.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde or 4% paraformaldehyde with 0.1% glutaraldehyde). This peculiar staining was present in most neurons of the neostriatum and of the ventral striatum (nucleus accumbens and olfactory tubercles) and was not observed in any other brain area. Its distribution was strikingly similar to that of DARPP-32-immunopositive neurons (58), and patches of more intense staining were present, mainly in the neonates,

reminiscing the striosomes (32) (e.g. Fig. 2D). It was associated with the nucleus of these neurons, as visualized in electron microscopy using the immunogold procedure of Chan et al (19) (results not shown). Although other cytoskeletal proteins have previously been found in the nucleus of cells (77), a similar staining has not been reported by others using the same or other antibodies against vimentin (11, 21, 42). It therefore probably represents the labelling of another molecule which would be exclusively associated with the nucleus of striatal neurons.

### **GFAP immunoreactivity after implantation of fetal ventral mesencephalic tissue**

**Post-Implantation Day 1 (PID1).** At PID1, there was an increase in GFAP immunoreaction in both newborn (Fig. 3A) and adult (Fig. 3E) host striatum. The GFAP-positive astrocytes were more numerous in the proximity of the graft and needle tract, and their density decreased with increasing distance from the graft. In the adult-implanted striatum, these astrocytes were more weakly immunoreactive, had smaller perikarya with thinner processes and were less numerous than in the neonatally-implanted striatum. At this time point, the graft was entirely devoid of GFAP-positive astrocytes in both the adult and the neonate recipients.

**PID5.** On PID5, GFAP immunoreactivity reached its maximum in both the neonatally and the adult-implanted host brains (Figs. 3B, 3F). In the neonatally-implanted brain, the astrogliosis had spread throughout the ipsilateral hemisphere, at the coronal level examined (Fig. 4A; *bottom of first plate*). GFAP-positive radial glial processes were prominent. They were interrupted by the transplant, in the neostriatum (Fig. 3B). These GFAP-immunopositive radial glial processes were thicker and more numerous than in the normal control. In the adult-implanted brain,

reactive astrocytes were seen only in the proximity of the transplant (Figs. 3F, 4B). In both cases, immunoreactive perikarya were still absent from the transplant, which was nevertheless invaded by GFAP-positive processes.

**PID10.** The host brain astrogliosis had already decreased in intensity in both neonatal and adult recipients (Fig. 3C and 3G, respectively). Nevertheless, it was still clearly less extensive in the adult host tissue (Fig. 3G), where reactive astrocytes appeared confined to the immediate vicinity of the implant.

On the other hand, the immunoreactivity was more intense within the border of the graft implanted in the adult brain than in the graft implanted in the neonatal brain. Indeed, reactive astrocytes formed a dense meshwork at the periphery of the graft implanted in the adult, constituting a dense glial scar. Immunoreactive astrocytic perikarya were much less numerous in the core of the graft which was still invaded mainly by stained cell processes. In the neonatal striatum, an accumulation of GFAP immunoreactivity was also seen at the graft-host border, but it was much less intense and was present mostly on the ventricle side of the implant, suggesting that it represented an accumulation of radial glial processes interrupted by the graft. Indeed, the immunoreactivity within the host neonatally-implanted striatum was still strong, including that of immunoreactive radial glial fibres.

**PID20, 30, 60.** The distribution and intensity of GFAP immunoreactivity was very similar on PID20, 30 and 60, in both the host and grafted tissues. At these time points, reactive astrocytes were no longer apparent in the neonatally-implanted host tissue (Fig. 3D). In the adult-implanted brain, however, a small number of reactive astrocytes were still visible in the

immediate vicinity of the graft (Fig. 3H).

A dense, continuous glial scar remained present within the border of the graft implanted in the adult striatum, all along the graft-host interface. Within the graft implanted in the neonatal striatum, patches of GFAP-positive astrocytes could be seen near the border with the host tissue, but they did not constitute a continuous scar.

#### **Animals transplanted at P15.**

The results observed in the animals that received transplants at the age of P15, were intermediate between those described above for the neonates and for the adults. Indeed, on PID10 (Fig. 5A), the graft and host tissues resembled those in the adult recipients, with a glial scar at the graft-host border, whereas, on PID20, 30 or 60 (Fig. 5C), the glial scar was replaced by a few patches of weakly immunoreactive astrocytes, thus resembling the graft in neonatally-implanted rats, at comparable time points after transplantation.

#### **Vimentin immunoreactivity after implantation of ventral mesencephalic tissue**

**PID1.** At this time point, there was no increase in vimentin immunoreactivity in the host brain of either the neonatally- or adult-implanted rats (Fig. 6A, 6E), compared to the controls (Fig. 2).

Within the graft implanted into the neonatal striatum, only a few small patches of immunoreactive cells were seen (Fig. 6A), whereas a dense population of immunoreactive cells was already present within the graft implanted in the adult (Fig. 6E).

**PID5.** An increase in vimentin immunoreactivity was found within the host brain tissues of both the neonatally- and adult-implanted animals. In the neonatal recipients (Fig. 6B), there was an increase in number,

staining intensity and thickness of immunostained radial glial fibres as compared to the non-implanted controls (Fig.2B). However, these vimentin-positive cells did not have the stellate morphology of mature astrocytes. In the adult-implanted striatum (Fig. 6F), stellate vimentin-positive astrocytes were seen only in the immediate vicinity of the implant. This was the only time point at which vimentin-positive cells were seen clearly within the adult host striatum.

Within the graft implanted into the neonatal brain, there were relatively few vimentin-immunoreactive cells, whereas within the grafts in the adult-implanted, a dense population of immunoreactive cells was still present.

**PID10.** At this time point, vimentin immunoreactivity was generally reduced in the neonatally-implanted host, although enlarged and strongly immunoreactive radial glial processes were still apparent (Fig. 6C). In the adult host striatum, vimentin immunoreactivity had completely disappeared (Fig.6G).

Within the graft in neonatally-implanted rats, the immunoreactivity was still much weaker than in the grafts in adult-implanted animals. The latter were, however, less intensely stained than at PID5.

**PID20, 30 or 60.** The results at these time points were similar for vimentin also. In the host tissue, the specific immunoreactivity was completely absent in all recipients, implanted as adult as well as newborn.

In the graft implanted in the neonatal brain (Fig. 6D), only a few patches of vimentin-positive cells remained present whereas, in the adult recipient, intensely immunostained cells were present all along the inner border of the graft (Fig. 6H). The vimentin-positive cells seen at this time were characterized by long processes and often appeared bipolar. Their

morphology therefore differed clearly from that of GFAP-positive, stellate astrocytes (Fig. 6H), although their distribution was very similar.

#### **Animals transplanted at P15.**

As seen with GFAP immunostaining, vimentin immunostaining in P15-implanted animals exhibited features that were characteristic of either neonatal or adult recipients, depending on survival time. On PID10 (Fig. 5B) the grafts contained a dense population of vimentin-positive cells and the host brain tissue was devoid of such immunoreactivity, as in adult recipients. Inversely, on PID30 or 60 (Fig. 5D), the grafts contained only few small patches of vimentin-positive cells, as in the neonatally-implanted rats.

#### **Fetal striatal tissue implanted into the neostriatum of adult recipients**

In the animals which received striatal grafts, increased GFAP immunoreactivity in the host striatum was present only in astrocytes bordering the graft (Fig. 7A), as in adult recipients implanted with fetal ventral mesencephalic tissue (Fig. 3H). Within the graft, the distribution of GFAP-positive astrocytes was, however, rather uniform compared to that in ventral mesencephalic grafts. These striatal grafts displayed only a slightly higher density of GFAP-positive astrocytes at their periphery.

Vimentin immunoreactivity was absent from the adult host striatal tissue at PID10 and 30 (Fig. 7B). Immunoreactive cells were found only in small patches within the graft, as in ventral mesencephalic grafts implanted into newborn animals.

#### **Sham lesions**

At each time point examined, vimentin and GFAP immunoreactivities were always less intense and less widespread in the sham-operated animals than in their implanted counterparts. The time course of the



astrogliosis, as revealed by GFAP- and vimentin-immunostainings, followed a similar pattern, however, with a peak on Post-Lesion Day 5 (PLD 5), and a gradual decline afterwards.

The extent and intensity of GFAP immunoreactivity observed before PLD 20 were, here also, more important in the neonate than in the adult. After PLD 20, the GFAP immunoreactivity was very similar in the neonatally- and adult-lesioned striata and present only in the needle tract (Figs. 8A, 8C).

The distribution of vimentin-positive cells was also limited to the immediate vicinity of the needle tract on PLD 5 in animals lesioned as adults, whereas this immunoreactivity was present in the radial glial fibers in the neonatally-lesioned rats. The immunoreactivity then subsided and, from PLD 20, vimentin-positive cells were only present along the needle tract, whatever the age of the animal at the time of lesion (Figs. 8B, 8D).

## DISCUSSION

The present study raises a number of issues relevant to the understanding of the integration of fetal neural grafts in the neonatal brain in comparison to the adult brain. 1) The initial astroglial reaction, as revealed by GFAP immunoreactivity, is more intense and widespread after implantation of ventral mesencephalic tissue into the neostriatum of the neonatal rather than adult rat. 2) A glial scar is formed only after implantation of ventral mesencephalic tissue in the adult. Homotypic grafts of striatal tissue do not induce the formation of a tight, compact glial scar. 3) In both neonatal and adult recipients, the expression of GFAP within the graft occurs after a relatively long delay, and first in cell processes, which suggests that reactive astrocytes originate essentially

from the host. 4) The number of vimentin immunoreactive cells is much smaller in grafts implanted in neonatal rat than in adult rats at all time points examined, and these cells persist at least until two months after transplantation, in both cases. 5) Grafts of ventral mesencephalic tissue implanted into the neostriatum of P15 rats initially have the features of grafts implanted into the adult, but gradually become more comparable to grafts implanted into the neonatal rat, as assessed by GFAP and vimentin immunoreactivities.

#### **Initial glial reaction in host brain**

Our results indicate that the initial astrogliosis (PID1 - 10) induced by transplantation of fetal ventral mesencephalic tissue is much stronger in newborn than in adult rats. Furthermore, we noted an increase in GFAP-immunoreactivity in radial glial fibres. The astroglial reaction to the transplantation of fetal neural tissue in the newborn has not been documented previously, but some authors have examined the astroglial reaction to mechanical lesions in the immature CNS and reported that the early astrocytic reaction to such lesions was mild (7, 10, 24, 28). However, few of these studies have compared directly the gliosis induced in neonatal and adult animals. Technical differences in lesioning or immunodetection of gliosis may explain the divergence between these reports and the present observations, which were consistent between shams and grafted animals.

The difference in early astroglial reaction between neonatal and adult rats may be due to a difference in the signals that induce astrogliosis (71). Several cytokines and trophic factors have been proposed as possible inducers of astrogliosis (25, 29-31, 44, 48, 82), and differences between adult and neonatal brain have been noted in the expression of such molecules (31).

The initial astrogliosis was generally milder in the sham-operated than in the grafted rats, and this was true for both neonatal and adult rats. This graft-induced enhancement of the host astroglial reaction could also involve interactions with the host immune system (70). Indeed, a significant correlation exists between the intensity of astrogliosis and the expression of cytokines following a brain lesion (66). The intensity of astrogliosis was also reported to correlate with the magnitude of MHC class I and II antigen expression, mononuclear infiltration and histological signs of graft rejection in the neonatal rat brain after transplantation of mouse cortex (50). Stronger astrogliosis and cytokine production also occur in response to the implantation of a piece of nitrocellulose membrane in comparison to a stab wound (5, 66).

#### **Formation of a glial scar**

A glial scar was induced by the transplantation of ventral mesencephalic tissue in adults, but not in neonatal rats, and persisted at least until PID60. This observation is consistent with most previous reports of the absence of astroglial scar formation in the neonatal CNS following a lesion (e.g.(10, 27). In the adult CNS, the use of glass capillaries for the implantation of neural tissue, which presumably creates less trauma, seems to yield smaller and less persistent glial scars (1, 55).

The absence of a glial scar in neonates could be due to the immaturity of

the host astrocytes or to their functional role at this developmental stage, since immature CNS astrocytes favour neuronal migration and axonal growth (63, 72).

Neonatal as well as adult sham-operated rats exhibited a persistent GFAP- and vimentin-positive astrocytic scar at the site of the stab wound. This contrasts with neonatal graft recipients and suggests that the transplanted fetal tissue had an inhibitory effect on astroglial scar formation, at least in newborns. In the adult graft recipients, other studies had shown that the glial scar subsides with prolonged survival time (1), which was confirmed in our own experimental conditions, in another study using survival times longer than 2 months (59). Several previous reports had shown that implantation of embryonic tissue reduces the astrocytic scar or promotes its resolution in adult brain (45, 62, 65, 73, 74). Both the neurons (65) and the astrocytes (73, 74) of the fetal grafts may be responsible for this effect.

A glial scar was much less conspicuous with homotypic grafts of striatal tissue: GFAP-positive astrocytes were distributed rather uniformly throughout the graft. A similar observation of reduced astroglial scar has been reported following homotypic grafts in a spinal cord transection (17). These observations suggest that interactions between the graft and host neural tissues may influence glial scar formation.

#### **GFAP expression in the graft**

Within the graft, GFAP-positive perikarya did not appear before PID10, in accordance with previous reports (1, 45, 79). The observation that GFAP immunoreactivity within the graft first appears in processes elongating from the host tissue, at PID5, strongly suggests that host reactive astrocytes gradually invade the transplant. Migration of host astrocytes into

intracerebral transplants has been demonstrated previously (83, 86). Moreover, recent experiments with transplants into  $\beta$ -galactosidase transgenic mice revealed that most of the GFAP-positive reactive astrocytes of the glial scar were positive for the transgene (26), supporting the view that the host is the major source of astrocytes in the glial scar (but see below and (84). Migration of astrocytes from graft to host has also been demonstrated (9, 39), but these astrocytes migrate away, along fibre tracts and blood vessels of the host brain (85).

### **Vimentin expression**

In the adult host brain, vimentin was observed only at PID5, within reactive astrocytes delineating the border of the graft, which is consistent with previous studies following brain lesions (18, 41, 42).

In the neonatal brain, vimentin was expressed extensively within radial glia, as expected (11, 22, 28). This radial glia disappeared between P10 and P20. It has been shown to transform into mature astrocytes (61, 69). Since these cells guide neural migration during development (63), their presence may contribute to the extensive emigration of neurons and glial cells out of the grafts after transplantation in the neonatal CNS (4, 20, 33, 34, 75).

Within the graft, vimentin-positive cells were much more numerous in the adult than in the neonatal recipients, at all times observed. This observation was surprising, since the grafted tissue was the same in both groups of recipients. This difference was already obvious at PID1, and was therefore probably the result of differences in chemical interactions between the graft tissue and the neonatal or adult hosts. It could be due to differences between the mature and immature immune systems (see above), although a greater migration of vimentin-positive cells out of the

graft in newborn rats might also explain this difference. Indeed, migration has been shown to be much more extensive in the newborn than in the adult recipient (4, 33). On the other hand, such migration would need to occur very early after implantation to explain that differences were already established at PID1.

These cells most likely represent donor astrocytes. At early times after the transplantation, they had only a few short processes, while at later times, they became bipolar with very long processes. In contrast to GFAP-immunoreactive astrocytes and to the vimentin-positive cells found within the adult host brain, they did not exhibit the stellate morphology of mature astrocytes, which suggests that they may represent astrocytes maintained in an immature, radial glial stage. A recent study has also shown that while some transplanted astrocytes develop into mature astrocytes, others remain in an immature state at least until six weeks after transplantation (26). That immature astrocytes remain more numerous in the adult recipient may reflect a loss of maturation-inducing influences in the adult brain. Nevertheless, their distribution within the graft eventually became very similar to that of the GFAP-positive astrocytes, which were presumably derived from the host and formed the glial scar. Although their morphology remained different from that of GFAP-positive astrocytes, these cells were thus present in the glial scar, but their contribution to this structure remains to be examined.

### **P15 recipients**

Transplants were made into juvenile (P15) recipients, because they present mixed features of grafts in newborn and adult recipients. Following transplantation in the neostriatum of juvenile rats, for example, the migration of DA neurons is comparable to that observed

after transplantation into the neonatal striatum (20). On the other hand, there is almost no 5-HT innervation of the ventral mesencephalic graft following implantation in juvenile recipients, as with adult recipients (53, 60). The glial scar induced by grafting in juvenile (P15) recipients also shared features of those observed in newborn and adult recipients, depending on the postgrafting survival time: similar at PID10 to those in adult recipients, scars in juveniles disappeared before PID30.

#### **Does the glial scar impede the 5-HT innervation of grafts?**

The present observations show an inverse correlation between the formation of a dense glial scar and the 5-HT innervation of intrastriatal grafts. Indeed, scars were found in ventral mesencephalic grafts following implantation in juvenile as well as adult rats, conditions where grafts are almost not innervated by host 5-HT neurons (53, 60). On the other hand, grafts in newborn rats and homotypic striatal grafts in adults display almost no scarring, and they become relatively well innervated by host 5-HT neurons (46, 60, 81).

However, it has previously been shown, with homotypic transplantation in the excitotoxically lesioned thalamus, that adult host 5-HT axons innervate the graft during the first week after implantation (56). The ingrowth would therefore occur before the formation of a glial scar. Moreover, differences in 5-HT innervation have recently been shown between DARPP-32-positive and DARPP-32-negative compartments of striatal grafts (60). Quantitative analysis showed that the DARPP-32-negative compartment is innervated by host 5-HT neurons at a density comparable to ventral mesencephalic grafts. Since no glial scar is present between DARPP-32 -positive and negative compartments, it seems that the presence of a glial scar is not the best predictive element for the

establishment of a 5-HT innervation in a neural graft.

### **Conclusion**

The present experiments have disclosed several differences in the astrocytic reaction to intracerebral neural transplantation between neonatal and adult recipients. A relatively good inverse correlation was found between the presence of a glial scar and a 5-HT innervation of the graft by host neurons. However, the glial scar forms after the first week post-implantation and therefore only after 5-HT fibers had the opportunity to grow into the graft. Other differences between grafts in newborn and adult recipients must therefore have a determinant effect on the capacity of host 5-HT axons to invade the graft. Another feature of the grafts that was noted, the density of the cell population expressing vimentin, was also inversely correlated with the degree of 5-HT innervation. Moreover, these cells were already present at PID1, before 5-HT axons could potentially grow into the graft. Vimentin is usually present in radial glial cells, which are thought to promote rather than inhibit axon growth. However, the vimentin-expressing cells in the graft may also be in a reactive state (18, 42, 68). They might then express molecules that are known to be inhibitory to axonal growth, as do host-derived scar astrocytes (6).



In any case, the present observations show that major differences exist between grafts implanted in newborn and adult rats. Other differences in cellular and molecular contents of the grafts probably exist, resulting from the different cellular interactions of the graft with immature and adult host nervous and immune systems. Thus, although the same tissue is transplanted at first, the resulting graft may differ markedly, depending on the age of the host. This variation in graft development may influence its integration into the host brain circuitry.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical contribution of Ms. A. Vallée and the expert photographic work of Mr. G. Lambert. N. Q. was supported by studentships from the *Groupe de recherche sur le système nerveux central* (GRSNC; Québec FCAR Grant) and the Canadian Medical Research Council (MRC). P. P. was supported by a studentship from the GRSNC and G. D. by a scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec*. This study was supported by the MRC (Grant MT 10982).

#### REFERENCES

1. Abrous, N., Guy, J., Vigny, A., Calas, A., Le Moal, M., and Herman, J. P. 1988. Development of intracerebral dopaminergic grafts: A combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences. *J. Comp. Neurol.* **273**: 26-41.
2. Adams, J. C. 1981. Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 775.
3. Amaducci, L., Forno, K. I., and Eng, L. F. 1981. Glial fibrillary acidic protein in cryogenic lesions of the rat brain. *Neurosci. Lett.* **21**: 27-32.

4. Andersson, C., Tytell, M., and Brunso-Bechtold, J. 1993. Transplantation of cultured type 1 astrocyte cell suspensions into young, adult and aged rat cortex: cell migration and survival. *Int. J. Develop. Neurosci.* **11**: 555-568.
5. Balasingam, V., Dickson, K., Brade, A., and Yong, V. W. 1996. Astrocyte reactivity in neonatal mice: apparent dependence on the presence of reactive microglia/macrophages. *Glia* **18**: 11-26.
6. Barker, R. A., Dunnett, S. B., Faissner, A., and Fawcett, J. W. 1996. The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Exp. Neurol.* **141**: 79-93.
7. Barrett, C. P., Donati, E. J., and Guth, L. 1984. Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury. *Exp. Neurol.* **84**: 374-385.
8. Bernstein, D. R., and al, e. 1981. Neuritic growth maintained near the lesion site long after spinal cord transection in the newborn rat. *Neurosci. Lett.* **26**: 55-61.
9. Bernstein, J. J., and Goldberg, W. J. 1989. Rapid migration of grafted cortical astrocytes from suspension grafts placed in host thoracic spinal cord. *Brain Res.* **491**: 205-11.
10. Berry, M., Maxwell, W. L., Logan, A., Mathewson, A., McConnell, R., Ashhurst, D. E., and Thomas, G. H. 1983. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochirurgica* **32**: 31-53.
11. Bignami, A., Raju, T., and Dahl, D. 1982. Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. *In vivo* and *in vitro* immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.* **91**: 286-95.
12. Björklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R. H., Dunnett, S. B., and Gage, F. H. 1983. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation. *Acta Physiol Scand Suppl* **522**: 1-7.
13. Blunt, S. B., Jenner, P., and Marsden, C. D. 1992. Motor function, graft survival and gliosis in rats with 6-OHDA lesions and foetal ventral mesencephalic grafts chronically treated with L-DOPA and carbidopa. *Exp. Brain Res.* **88**: 326-340.

14. Bregman, B. S., and al, e. 1983. Infant lesion effect: III. Anatomical correlates of sparing and recovery of function after spinal cord damage in newborn and adult cats. *Dev. Brain Res.* **285**: 137-154.
15. Bregman, B. S., and Bernstein-Goral, H. 1991. Both regenerating and late-developing pathways contribute to transplant-induced anatomical plasticity after spinal cord lesions at birth. *Exp. Neurol.* **112**: 49-63.
16. Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., McAtee, M., and O'Neil, A. 1989. Extension of the critical period for developmental plasticity of the corticospinal pathway. *J. Comp. Neurol.* **282**: 355-370.
17. Bregman, B. S., and Reier, P. J. 1986. Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death. *J. Comp. Neurol.* **244**: 86-95.
18. Calvo, J. L., Carbonell, A. L., and Boya, J. 1991. Co-expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* **566**: 333-336.
19. Chan, J., Aoki, C., and Pickel, V. M. 1990. Optimization of differential immunogold-silver and peroxidase labeling with maintenance of ultrastructure in brain sections before plastic embedding. *J. Neurosci. Meth.* **33**: 113-127.
20. Chkirate, M., Vallée, A., and Doucet, G. 1993. Host striatal projections into fetal ventral mesencephalic tissue grafted to the striatum of immature or adult rat. *Exp. Brain Res.* **94**: 357-362.
21. Cochard, P., and Paulin, D. 1984. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J. Neurosci.* **4**: 2080-94.
22. Dahl, D., Rueger, D. C., Bignami, A., Weber, K., and Osborn, M. 1981. Vimentin, the 57 000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur. J. Cell Biol.* **24**: 191-6.
23. Dusart, I., Marty, S., and Peschanski, M. 1991. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS. 2. Astrocytes. *Neuroscience* **45**: 541-549.
24. Firkins, S. S., Bates, C. A., and Stelzner, D. J. 1993. Corticospinal tract plasticity and astroglial reactivity after cervical spinal injury in the postnatal rat. *Exp. Neurol.* **120**: 1-15.

25. Frautschy, S. A., Walicke, P. A., and Baird, A. 1991. Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury. *Brain Res.* **553**: 291-9.
26. Gates, M. A., Laywell, E. D., Fillmore, H., and Steindler, D. A. 1996. Astrocytes and extracellular matrix following intracerebral transplantation of embryonic ventral mesencephalon or lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* **74**: 579-97.
27. Gearhart, J., Oster-Granite, M. L., and Guth, L. 1979. Histological changes after transection of the spinal cord of fetal and neonatal mice. *Exp. Neurol.* **66**: 1-15.
28. Ghooray, G. T., and Martin, G. F. 1993. Development of radial glia and astrocytes in the spinal cord of the north american opossum (*Didelphis-Virginiana*) - an immunohistochemical study using Anti-Vimentin and Anti-Glial fibrillary acidic protein. *Glia* **9**: 1-9.
29. Giulian, D., and Lachman, L. B. 1985. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* **228**: 497-9.
30. Giulian, D., Li, J., Li, X., George, J., and Rutecki, P. A. 1994. The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev. Neurosci.* **16**: 128-36.
31. Giulian, D., Young, D. G., Woodward, J., Brown, D. C., and Lachman, L. B. 1988. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J. Neurosci.* **8**: 709-14.
32. Graybiel, A. M., Hirsch, E. C., and Agid, Y. A. 1987. Differences in tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity characterize the mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix at maturity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 303-307.
33. Hatton, J. D., Nguyen, M. H., and U, H. S. 1993. Differential migration of astrocytes grafted into the developing rat brain. *Glia* **9**: 113-119.
34. Herman, J. P., Abrous, D. N., and Lemoal, M. 1991. Anatomical and behavioral comparison of unilateral dopamine-rich grafts implanted into the striatum of neonatal and adult rats. *Neuroscience* **40**: 465-475.
35. Hozumi, I., Chiu, F. C., and Norton, W. T. 1990. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res.* **524**: 64-71.

36. Hsu, S.-M., and Soban, E. 1982. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 1079-1082.
37. Isacson, O., Brundin, P., Kelly, P. A. T., Gage, F. H., and Björklund, A. 1984. Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* **311**: 456-460.
38. Isacson, O., Fischer, W., Wictorin, K., Dawbarn, D., and Björklund, A. 1987. Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience* **20**: 1043-56.
39. Jacque, C. M., Suard, I. M., Collins, V. P., and Raoul, M. M. 1986. Interspecies identification of astrocytes after intracerebral transplantation. *Dev. Neurosci.* **8**: 142-9.
40. Janeczko, K. 1988. The proliferative response of astrocytes to injury in neonatal rat brain. A combined immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res.* **456**: 280-285.
41. Janeczko, K. 1991. Lesion-induced proliferation of vimentin-positive astrocytes in the mouse cerebral hemisphere. *Folia Histochem. Cytobiol.* **29**: 55-7.
42. Janeczko, K. 1993. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere - a combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int. J. Develop. Neurosci.* **11**: 139-147.
43. Janeczko, K. 1994. Age-dependent changes in the proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the rat brain. *Int. J. Develop. Neurosci.* **12**: 431-40.
44. Kahn, M. A., Ellison, J. A., Speight, G. J., and de Vellis, J. 1995. CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res.* **685**: 55-67.
45. Kruger, S., Sievers, J., Hansen, C., Sadler, M., and Berry, M. 1986. Three morphologically distinct types of interface develop between adult host and fetal brain transplants: implications for scar formation in the adult central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **249**: 103-16.
46. Labandeira-Garcia, J. L., Wictorin, K., Cunningham, E. T., and Björklund, A. 1991. Development of intrastriatal striatal grafts and their afferent innervation from the host. *Neuroscience* **42**: 407-426.

47. Latov, N., Nilaver, G., Zimmerman, E. A., Johnson, W. G., Silverman, A. J., Defendini, R., and Cote, L. 1979. Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. *Dev. Biol.* **72**: 381-4.
48. Logan, A., Frautschy, S. A., Gonzalez, A. M., Sporn, M. B., and Baird, A. 1992. Enhanced expression of transforming growth factor beta 1 in the rat brain after a localized cerebral injury. *Brain Res.* **587**: 216-25.
49. Lu, S. Y., Shipley, M. T., Norman, A. B., and Sanberg, P. R. 1991. Striatal, ventral mesencephalic and cortical transplants into the intact rat striatum - A neuroanatomical study. *Exp. Neurol.* **113**: 109-130.
50. Marion, D. W., Pollack, I. F., and Lund, R. D. 1990. Patterns of immune rejection of mouse neocortex transplanted into neonatal rat brain, and effects of host immunosuppression. *Brain Res.* **519**: 133-143.
51. Mathewson, A. J., and Berry, M. 1985. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res.* **327**: 61-9.
52. Moore, I. E., Buontempo, J. M., and Weller, R. O. 1987. Response of fetal and neonatal rat brain to injury. *Neuropathol. Applied Neurobiol.* **13**: 219-228.
53. Mounir, A., Chkirate, M., Vallée, A., Pierret, P., Geffard, M., and Doucet, G. 1994. Host serotonin axons innervate intrastriatal ventral mesencephalic grafts after implantation in newborn rat. *Eur. J. Neurosci.* **6**: 1307-1315.
54. Murray, M., Wang, S. D., Goldberger, M. E., and Levitt, P. 1990. Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions. *Exp. Neurol.* **110**: 248-57.
55. Nikkah, G., Olsson, M., Eberhard, J., Bentlage, C., Cunningham, M. G., and Björklund, A. 1994. A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat parkinson model: A detailed account of the methodology. *Neuroscience* **63**: 57-72.
56. Nothias, F., Onteniente, B., Geffard, M., and Peschanski, M. 1988. Rapid growth of host afferents into fetal thalamic transplants. *Brain Res.* **463**: 341-345.

57. Oblinger, M. M., and Singh, L. D. 1993. Reactive astrocytes in neonate brain upregulate intermediate filament gene expression in response to axonal injury. *Int. J. Develop. Neurosci.* **11**: 149-156.
58. Ouimet, C. C., Miller, P. E., Hemmings, H. C. J., Walaas, S. I., and Greengard, P. 1984. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J. Neurosci.* **4**: 111-124.
59. Pierret, P., Quenneville, N., Vandaele, S., Abbaszadeh, R., Lanctôt, C., Crine, P., and Doucet, G. 1997. Trophic and tropic effects of striatal astrocytes on co-grafted mesencephalic dopamine neurons and axons. *J. Neurosci. Res.* : In press.
60. Pierret, P., Vallée, A., Bosler, O., Dorais, M., Moukhles, H., Abbaszadeh, R., Lepage, Y., and Doucet, G. 1997. Serotonin axons of the neostriatum show a higher affinity for striatal than for ventral mesencephalic transplants: A quantitative study in adult and immature recipient. *Submitted*.
61. Pixley, S. K., and de Vellis, J. 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* **317**: 201-9.
62. Predy, R., and Malhotra, S. K. 1989. Reactive astrocytes in lesioned rat spinal cord: effect of neural transplants. *Brain Res. Bull.* **22**: 81-7.
63. Rakic, P. 1990. Principles of neural cell migration. *Experientia* **46**: 882-91.
64. Roessmann, U., and Gambetti, P. 1986. Pathological reaction of astrocytes in perinatal brain injury. Immunohistochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl)* **70**: 302-307.
65. Rostaing-Rigattieri, S., Flores-Guevara, R., Peschanski, M., and Cadusseau, J. 1997. Glial and endothelial cell response to a fetal transplant of purified neurons. *Neuroscience* **79**: 723-34.
66. Rostworowski, M., Balasingam, V., Chabot, S., Owens, T., and Yong, V. W. 1997. Astroglialosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J. Neurosci.* **17**: 3664-74.

67. Rudge, J. S., and Silver, J. 1990. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J. Neurosci.* **10**: 3594-3603.
68. Schiffer, D., Giordana, M. T., Migheli, A., Giaccone, G., Pezzotta, S., and Mauro, A. 1986. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* **374**: 110-8.
69. Schmechel, D. E., and Rakic, P. 1979. A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol. (Berl)* **156**: 115-52.
70. Schwarz, S. C., Kupsch, A. R., Banati, R., and Oertel, W. H. 1996. Cellular immune reactions in brain transplantation: effects of graft pooling and immunosuppression in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Glia* **17**: 103-20.
71. Scripter, J. L., Ko, J., Kow, K., Arimura, A., and Ide, C. F. 1997. Regulation by interleukin-1b of formation of a line of delimiting astrocytes following prenatal trauma to the brain of the mouse. *Exp. Neurol.* **145**: 329-341.
72. Silver, J., and Ogawa, M. Y. 1983. Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* **220**: 1067-1069.
73. Smith, G. M., and Miller, R. H. 1991. Immature type-1 astrocytes suppress glial scar formation, are motile and interact with blood vessels. *Brain Res.* **543**: 111-122.
74. Smith, G. M., and Silver, J. 1988. Transplantation of immature and mature astrocytes and their effect on scar formation in the lesioned central nervous system. *Progr. Brain Res.* **78**: 353-361.
75. Snyder-Keller, A. M., Carder, R. K., and Lund, R. D. 1989. Development of dopamine innervation and turning behavior in dopamine-depleted infant rats receiving unilateral nigral transplants. *Neuroscience* **30**: 779-794.
76. Takamiya, Y., Kohsaka, S., Toya, S., Otani, M., and Tsukada, Y. 1988. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res.* **466**: 201-10.
77. Thurston, V. C., Pestell, R. G., and Binder, L. I. 1996. Tau localization in nucleoli and NORS of neuronal and non-neuronal cells: regulation by anti-sense mRNA. *Molec. Biol. Cell* **7 (Suppl.)**: 569a.



78. Topp, K. S., Faddis, B. T., and Vijayan, V. K. 1989. Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brains of young and aged rats. *Glia* **2**: 201-11.
79. Tuba, A., Kallai, L., and Kalman, M. 1997. A rapid replacement of vimentin-containing radial glia by glial fibrillary acidic protein-containing astrocytes in transplanted telencephalon. *J. Neural Transplant. Plasticity* **6**: 21-9.
80. Victorin, K. 1992. Anatomy and Connectivity of Intrastratial Striatal Transplants. *Prog. Neurobiol.* **38**: 611-639.
81. Victorin, K., Isacson, O., Fischer, W., Nothias, F., Peschanski, M., and Björklund, A. 1988. Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid-lesioned striatum - 1. Subcortical afferents. *Neuroscience* **27**: 547-562.
82. Winter, C. G., Saotome, Y., Levison, S. W., and Hirsh, D. 1995. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5865-9.
83. Zhou, C.-F., Lawrence, J. M., Morris, R. J., and Raisman, G. 1986. Migration of host astrocytes into superior cervical sympathetic ganglia autografted into the septal nuclei of choroid fissure of adult rats. *Neuroscience* **17**: 815-827.
84. Zhou, F. C., Buchwald, N., Hull, C., and Towle, A. 1989. Neuronal and glial elements of fetal neostriatal grafts in the adult neostriatum. *Neuroscience* **30**: 19-31.
85. Zhou, H. F., Lee, L. H.-C., and Lund, R. D. 1990. Timing and patterns of astrocyte migration from xenogeneic transplants of the cortex and corpus callosum. *J. Comp. Neurol.* **292**: 320-330.
86. Zhou, H. F., and Lund, R. D. 1992. Neonatal host astrocyte migration into xenogeneic cerebral cortical grafts. *Dev. Brain Res.* **65**: 127-131.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Astrocytes immunostained for GFAP, at the outer border of a graft of ventral mesencephalic tissue (left) into the neostriatum (right), 5 d after implantation (PID5) into the brain of an adult rat. The thick arrow indicates a reactive astrocyte. The thinner arrow indicates a quiescent astrocyte. Scale bar: 75  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2:** Untreated controls. **A)** GFAP immunoreactivity in the neonatal rat neostriatum. Corpus callosum on top and lateral ventricle in upper left corner. Weak GFAP immunostaining is present in radial glial fibres (arrow). **B)** Vimentin immunoreactivity in the neonatal rat brain. Arrow : radial glial fibers. **C)** GFAP immunoreactivity in the adult rat brain. Corpus callosum on top. **D)** Vimentin immunoreactivity in the adult brain. Many neuronal cell nuclei are also stained throughout, and exclusively in, the striatum of the neonatal (B) as well as adult rat with this antibody. The distribution pattern of this staining matches closely that of DARPP-32 immunostaining, which is strongly concentrated in neurons of the striatum. Arrow points to a patch of such immunoreactive nuclei, reminiscent of the striosomes described by Graybiel et al. (see Results). Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3:** GFAP immunostaining in the striatum of rats implanted with fetal ventral mesencephalic tissue at P1 (A-D) or at the adult stage (E-H), and perfused on postimplantation day 1 (PID1) (A,E), PID5 (B,F), PID10 (C,G) or PID60 (D,H). Arrows in A, B, D, E delineate the graft. Open arrows in B and C point to radial glia and, in D, to a patch of GFAP-positive astrocytes in the graft. Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4** (*Bottom of first plate*): Low magnification view of the rostral cerebral hemisphere, on PID5 in neonatal (A) and adult (B) recipients. The arrows in A indicate the graft. Ventricle on the right. Scale bar: 500  $\mu\text{m}$ .

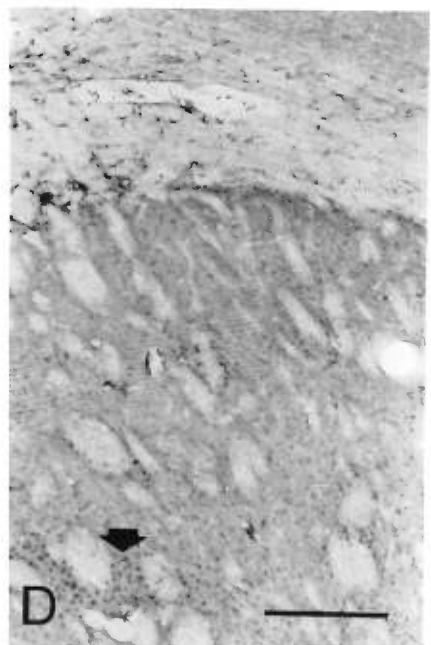
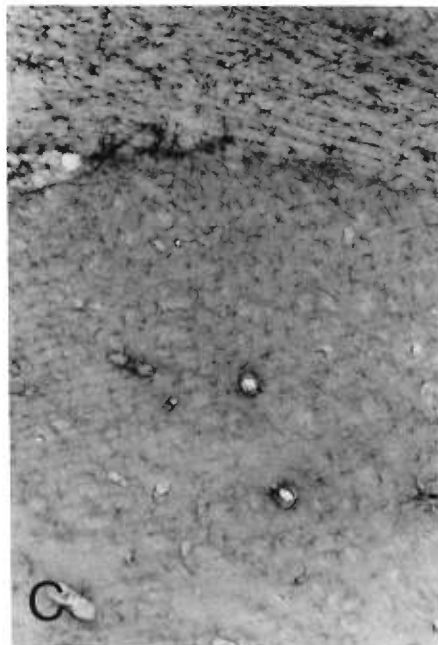
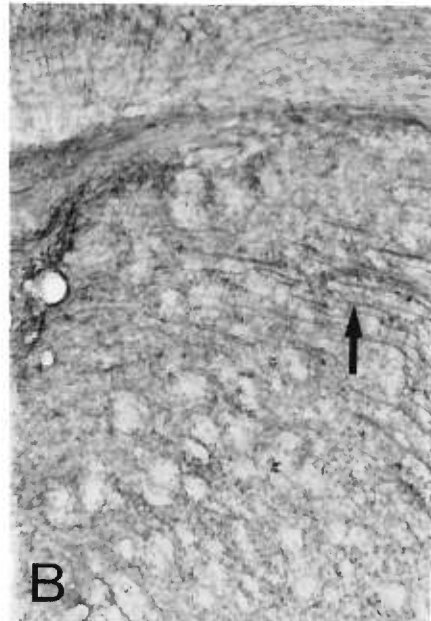
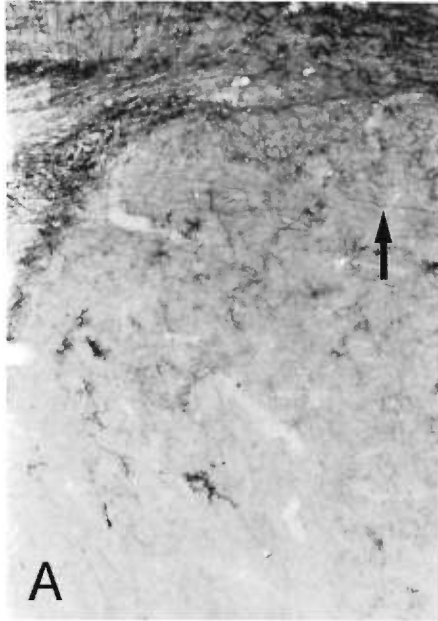
**Figure 5:** GFAP (A, C) and vimentin (B, D) immunostaining following implantation of fetal ventral mesencephalic tissue into the striatum of juvenile (P15) rats on PID10 (A, B) and PID60 (C, D). Arrows in C, D delineate the graft. Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ .

**Figure 6:** Vimentin immunostaining in the striatum of neonatally (A-D) and adult-implanted rats (E-H), on PID1 (A,E), PID5 (B,F), PID10 (C,G) and PID60 (D,H). Open arrow in B,D designate radial glia; the graft is outlined by arrows in A-D. Open arrow in D points to vimentin-positive astrocytes in the graft. Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ .

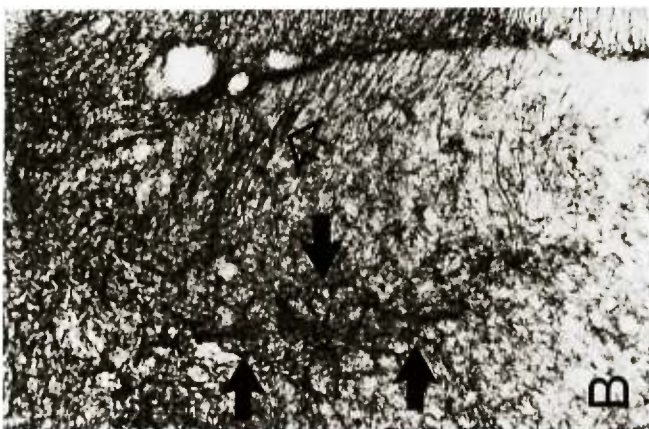
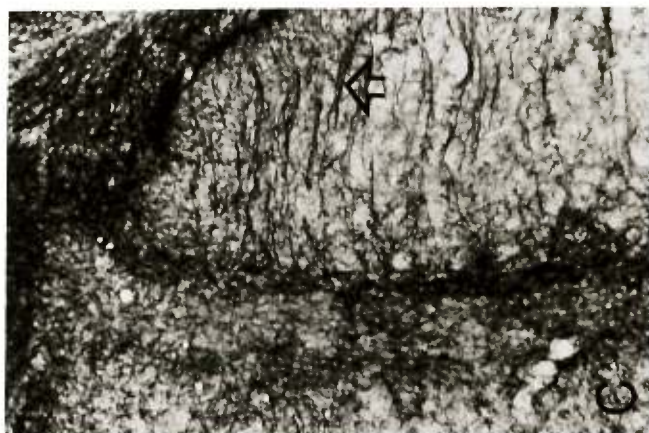
**Figure 7:** Grafts of fetal striatal tissue in the striatum of adult rats, at PID30. A) GFAP-immunostaining (compare with ventral mesencephalic graft, Fig. 3H). There is only a slight increase in density of astrocytes at the host-graft interface (host tissue is on the right). B) Vimentin immunostaining (compare with Fig. 6H). The arrows indicate the graft border. Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ .

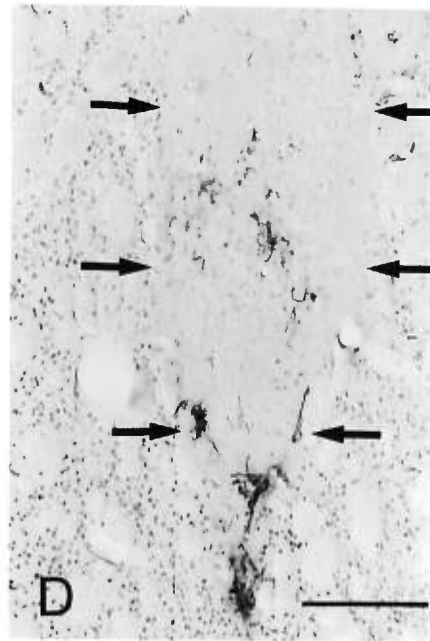
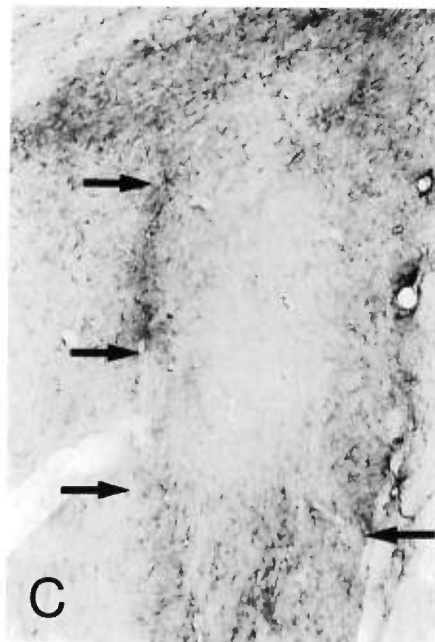
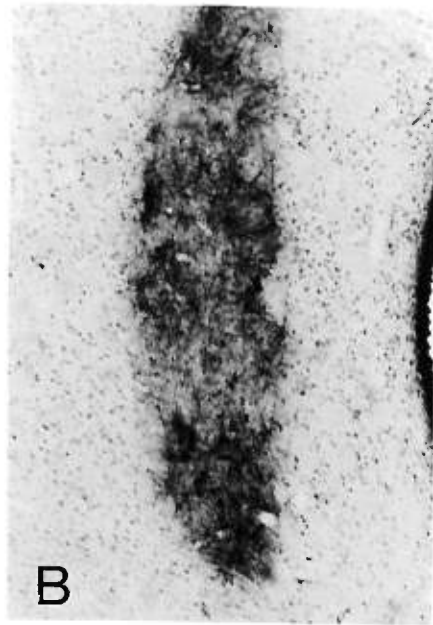
**Figure 8:** Sham-lesioned striatum (needle tract) immunostained at PLD30. A and B) GFAP and vimentin staining, respectively, in neonatally-lesioned striatum. C and D) GFAP and vimentin staining, respectively, in adult-lesioned striatum.



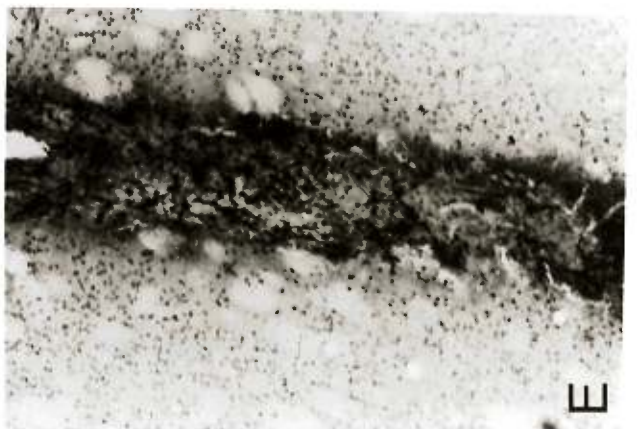
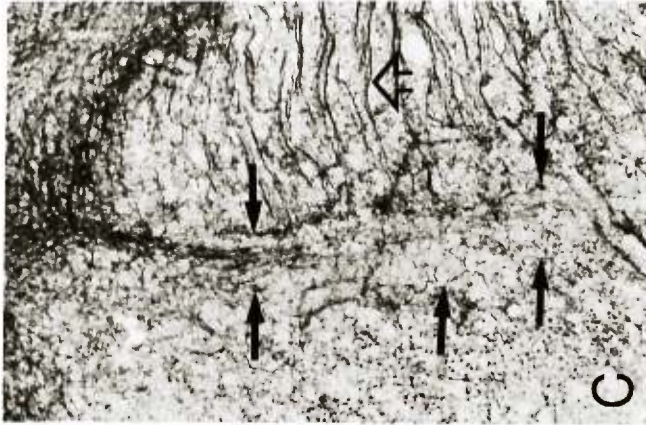




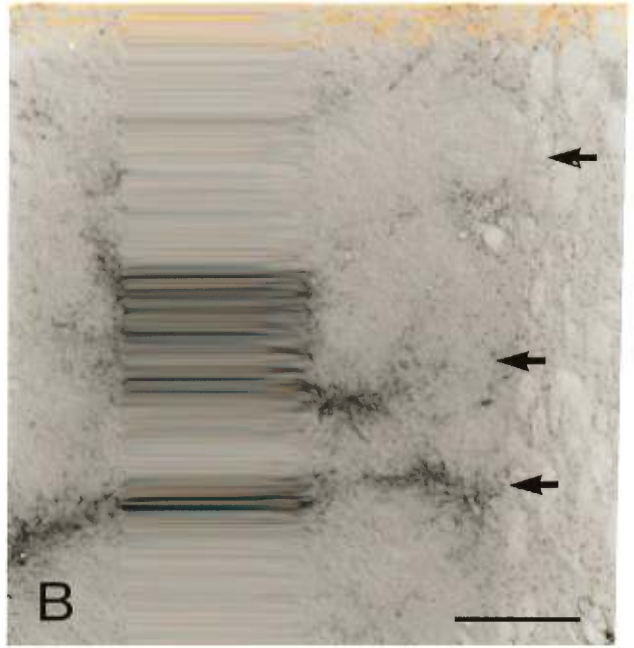


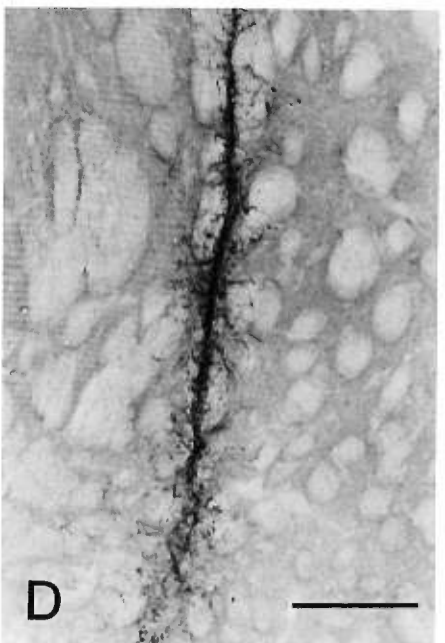












---

**CHAPITRE 3**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE**

Des études antérieures dans notre laboratoire ont montré que l'intégration des greffes de tissu mésencéphalique ventral foetal est plus importante dans le striatum du rat nouveau-né que dans celui du rat adulte<sup>32,99</sup>. D'autre part, les greffes intrastriatales de tissu striatal foetal (homotypique) s'intègrent mieux que celles de tissu mésencéphalique ventral foetal (hétérotypique)<sup>61,85,107,144</sup>. L'objectif de cette étude était de vérifier si la différence d'intégration de ces greffes pouvait être due à la réaction astrocytaire. À cet effet, nous avons comparé la réaction astrocytaire induite par les greffes ayant une faible capacité d'intégration avec celles qui sont mieux intégrées dans la circuiterie neuronale de l'hôte.

La réaction astrocytaire à l'implantation de tissu foetal peut être séparée en trois phases: 1) Une phase initiale, durant laquelle les astrocytes de l'hôte réagissent à la lésion. L'astrogliose GFAP- et vimentine-positive durant cette phase est plus intense et plus étendue chez le greffé nouveau-né que chez le greffé adulte. De plus, l'astrogliose initiale produite dans le striatum juvénile (P15) en réponse à l'implantation de tissu mésencéphalique foetal est semblable à celle du striatum adulte. 2) La seconde phase est celle de la réaction astrocytaire GFAP-positive à l'intérieur des greffes. 3) La troisième phase est l'établissement d'une cicatrice gliale au pourtour de la greffe. Une telle cicatrice gliale est absente chez les rats nouveau-nés ou juvéniles et elle est incomplète chez les rats matures greffés de tissu homotypique. Toutefois, elle est prononcée et persistante chez l'adulte greffé de tissu mésencéphalique ventral.

### **3.1 Réaction astrocytaire initiale dans le cerveau receveur**

La procédure de transplantation produit nécessairement une lésion par l'insertion de l'aiguille d'injection. Celle-ci provoque une rupture de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'une destruction du parenchyme avec hémorragie locale. Il s'en suit une infiltration du parenchyme par des cellules inflammatoires qui produisent des cytokines déclenchant l'astrogliose (voir Introduction). D'autre part, le tissu greffé peut lui-même contribuer à l'astrogliose en introduisant dans le SNC de l'hôte des antigènes étrangers exprimés par les cellules greffées.

#### **3.1.1 Expression de GFAP dans le cerveau receveur: différences entre nouveau-nés, juvéniles et adultes**

Nous avons montré que l'astrogliose induite par l'implantation de tissu mésencéphalique ventral est plus intense et plus étendue dans le cerveau immature que dans le cerveau mature. Ceci contraste avec la plupart des études précédentes sur la réaction astrocytaire dans le SNC immature lésé, qui l'ont décrite comme étant faible<sup>12,13,15,22,46,50</sup>. Aucune étude n'a examiné l'astrogliose en réponse à l'implantation de tissu foetal dans le SNC immature. L'astrogliose intense chez les greffés nouveau-nés décrite dans cette étude pourrait donc être due à une influence du tissu greffé. Comme mentionné plus haut, ce tissu peut contribuer à la réaction astrocytaire en exposant le SNC de l'hôte à des antigènes étrangers. Toutefois, ce phénomène ne peut être entièrement attribuable à l'influence de la greffe puisque nous avons aussi observé une astrogliose initiale plus intense chez le nouveau-né que chez l'adulte après une simple lésion mécanique (trace d'aiguille).

La différence de réaction astrocytaire entre les nouveau-nés et les adultes pourrait être due à une différence au niveau des signaux qui déclenchent l'astrogliose. Plusieurs cytokines et facteurs trophiques ont été proposés comme inducteurs de la réaction gliale. En effet, l'expression d'IL-1<sup>127</sup> et TGF- $\beta$ <sup>184</sup> augmente aux sites de lésion et l'injection intracérébrale de bFGF<sup>41</sup>, CNTF<sup>68,145</sup>, IL-1<sup>53</sup> ou IFN- $\gamma$ <sup>147</sup> déclenche une réaction astrocytaire. Une différence d'expression de ces molécules dans les SNC adulte et nouveau-né pourrait être responsable de la différence observée au niveau de leur réaction astrocytaire. Ainsi, on a rapporté que l'expression de bFGF dans le SNC du rat nouveau-né normal est supérieure à celle du SNC adulte<sup>26</sup>. D'autre part, l'expression d'IL-1 suite à une lésion est plus grande dans le SNC immature, puisque cette cytokine est exprimée dans les cellules gliales réactives tant dans le parenchyme adjacent qu'au site de lésion<sup>127</sup> tandis que, dans le SNC adulte, elle n'est exprimée qu'au site de lésion, dans la microglie et les astrocytes réactifs<sup>53</sup>.

Cette différence de réactivité gliale initiale entre les greffés nouveau-nés et adultes pourrait être responsable de la plus grande intégration des greffes chez les nouveau-nés. Il a été montré que la croissance hors de la greffe des prolongements de neurones DA greffés<sup>11</sup>, de même que l'innervation des greffes de thalamus<sup>104</sup> s'effectue surtout durant la première semaine après la transplantation. Or, c'est durant cette première semaine post-transplantation que l'intensité de l'astrogliose dans les tissus de l'hôte est maximale. Puisqu'il existe une corrélation temporelle entre le moment de croissance axonale maximale et celui de l'intensité maximale de l'astrogliose, il est possible que cette réaction astrocytaire initiale, plus importante chez le nouveau-né, soit bénéfique à la croissance axonale. En effet, les astrocytes peuvent sécréter des facteurs

neurotrophiques qui pourraient favoriser la survie des neurones<sup>6,73,143</sup>. Ils peuvent aussi sécréter des molécules de la matrice extra-cellulaire, dont certaines sont promotrices de la croissance axonale (par exemple la laminine)<sup>81</sup>. Enfin, ils peuvent phagocyter les débris produits par la chirurgie de transplantation<sup>31</sup>. D'ailleurs, la réaction astrocytaire initiale mitigée dans le cerveau des juvéniles greffés supporte cette hypothèse, puisque les greffes mésencéphaliques y sont très peu innervées par les axones 5-HT de l'hôte<sup>99</sup>.

### 3.1.2. Différences entre animaux lésés et greffés

Notre étude a montré que la réaction gliale initiale est plus faible dans le SNC lésé que dans le SNC greffé. Une constatation semblable a été faite par Balasingham *et coll.*<sup>7</sup>, qui ont montré qu'une lésion corticale produite par l'insertion d'un morceau de membrane de nitrocellulose produit une astrogliose minime, sauf lorsque le morceau de nitrocellulose est laissé en place dans le cerveau: une astrogliose considérable est alors induite. Les auteurs ont attribué ce phénomène au fait que l'implant de nitrocellulose représente plus de débris qu'une simple lésion, ce qui requiert un recrutement supérieur de phagocytes pour éliminer ces débris. Ces phagocytes produisent alors plus de cytokines<sup>116</sup>, amplifiant ainsi l'astrogliose.

Une autre hypothèse pouvant expliquer nos résultats est que la transplantation de tissu induit une réaction immunitaire par l'introduction d'antigènes étrangers dans le SNC de l'hôte, ce qui produit une réaction astrocytaire plus importante que par une simple lésion. Le SNC des mammifères est généralement considéré comme étant privilégié du point de vue immunitaire. Néanmoins, il a été montré qu'une

réaction immunitaire se produit envers les greffes intracérébrales<sup>94,126</sup>. En effet, il y a une augmentation de l'expression d'antigènes MHC de classes I et II, ainsi que du nombre de cellules microgliales, lymphocytes et macrophages à l'intérieur des greffes<sup>126</sup>. De plus, il a été montré que la réaction immunitaire à l'implantation de tissu cortical de souris dans le cerveau du rat néonatal est proportionnelle à l'intensité de la réaction astrocytaire<sup>86</sup>. Il est donc plausible que la greffe induise une plus forte réaction immunitaire qu'une simple lésion et que celle-ci provoque alors une astrogliose plus intense.

### 3.1.3. Expression de vimentine dans le cerveau de l'hôte

Dans les tissus de l'hôte greffé à l'âge adulte, l'expression de vimentine n'est observée qu'au cinquième jour après la transplantation, et uniquement dans les astrocytes à proximité de la greffe. Des études utilisant des techniques de double marquage GFAP et vimentine chez des animaux lésés ont montré que la majorité des cellules exprimant la vimentine autour de sites lésionnels expriment aussi la GFAP<sup>66,121</sup>. La distribution de ces cellules GFAP- et vimentine-positives concorde entièrement avec celle des cellules vimentine-positives de notre étude. Ceci suggère qu'au moins la majorité des cellules vimentine-positives dans le cerveau de l'hôte greffé sont des astrocytes.

L'expression de vimentine est très abondante dans la glie radiaire du SNC immature. De plus, les prolongements de la glie radiaire réagissent à la transplantation en augmentant leur immunoréactivité pour la vimentine: ils apparaissent alors plus nombreux et plus gros. Puisque ces cellules servent à guider les neurones durant le développement<sup>110</sup>, elles pourraient jouer un rôle semblable envers les



neurones greffés, et favoriser leur migration hors des greffes chez les nouveau-nés. Ceci expliquerait l'infiltration plus grande des neurones DA lorsqu'ils sont implantés dans le striatum nouveau-né<sup>32,58</sup>.

## **3.2 Réaction astrocytaire à l'intérieur de la greffe**

### **3.2.1. Origine des cellules exprimant la GFAP dans la greffe**

Tant chez le greffé nouveau-né que chez l'adulte, l'expression de GFAP dans la greffe apparaît seulement au cinquième jour après la transplantation, au moment où des prolongements astrocytaires de l'hôte commencent à pénétrer la greffe. Dix jours après la transplantation, la greffe est envahie par des astrocytes GFAP-immunopositifs. Ces observations sont en accord les résultats d'études antérieures<sup>1,74,140</sup>. Ces astrocytes exprimant la GFAP et retrouvés dans la greffe pourraient provenir soit de l'hôte ou de la greffe. En effet, le moment d'apparition de ces astrocytes dans la greffe correspond au temps où les astrocytes immatures greffés commence à exprimer la GFAP selon leur développement normal<sup>49</sup>. D'autre part, la migration d'astrocytes de l'hôte vers la greffe a déjà été démontrée<sup>149,151</sup>. Il est donc vraisemblable que les astrocytes GFAP-immunopositifs retrouvés dans la greffe, 10 jours après la transplantation, proviennent à la fois de l'hôte et de la greffe.

### **3.2.2. Expression de la vimentine dans la greffe**

L'identité des cellules qui expriment la vimentine dans la greffe n'est pas certaine, mais elles représentent probablement des astrocytes immatures greffés<sup>11,35,108,118</sup> qui pourraient même être réactifs<sup>27,66,121</sup>. Des études récentes ont montrés que la microglie réactive, qui exprime la vimentine<sup>55b</sup>, n'apparaît dans la greffe qu'après plusieurs jours après la transplantation<sup>11,115</sup>. Vingt-quatre heures après la transplantation, ces

cellules ont des prolongements courts et peu nombreux. A des temps plus avancés, elle n'acquièrent pas la morphologie étoilée des astrocytes matures qui expriment la GFAP, mais demeurent plutôt bipolaires avec de longs prolongements. Ces cellules ressemblent ainsi à la glie radiaire et semblent être maintenue dans un état immature. Une étude récente montre aussi la persistance de glie radiaire et d'astrocytes immatures, sur la base d'autres marqueurs immunocytochimiques, dans des greffes intrastriales de tissu mésencéphalique ou striatal fœtal, jusqu'à au moins six semaines après la transplantation<sup>48</sup>. La persistance de ces cellules pourrait indiquer l'absence d'un signal induisant la maturation des astrocytes.

Les greffes mésencéphaliques implantées chez les adultes contiennent plus de cellules vimentine-positives que les greffes implantés chez les animaux nouveau-nés, à tous les temps examinés. Ceci est surprenant puisque le tissu greffé est le même dans les deux cas. Cette différence pourrait être due à une plus grande migration des cellules vimentine-positives hors de la greffe chez les hôtes nouveau-nés. En effet, il a été montré que la migration d'astrocytes hors de la greffe est plus importante chez l'hôte nouveau-né que chez l'hôte adulte<sup>3,57</sup>. Il est également possible que la survie de ces cellules soit moins grande chez les nouveau-nés que chez les adultes. Une moins grande survie des cellules greffées chez les nouveau-nés a été rapportée<sup>32,58</sup> et a été attribuée à l'immaturité de la barrière hémato-encéphalique ou encore à une plus faible libération de facteurs trophiques en réponse à la lésion chez le nouveau-né<sup>58</sup>. La plus faible expression de vimentine dans les greffes implantés chez les nouveau-nés pourraient aussi être due à l'immaturité de leur système immunitaire. Comme pour la GFAP, l'expression de la

vimentine pourrait être régulée par des messagers chimiques de l'hôte, et ceux-ci pourraient être exprimés en moins grande quantité dans le SNC immature.

### 3.3 Établissement d'une cicatrice gliale

#### 3.3.1. Différence entre les nouveau-nés et les adultes

Tout comme dans les études sur le SNC immature lésé<sup>13,46,50,96</sup>, aucune cicatrice astrocytaire n'est produite chez les rats greffés à la naissance. Chez ceux-ci, seul quelques rares amas de cellules immunoréactives à la vimentine et à la GFAP persistent dans la greffe à des temps avancés. Par contre, le greffé à l'âge adulte présente une importante cicatrice astrocytaire à l'interface hôte-greffe, qui peut persister jusqu'à deux mois après la transplantation, tel que décrit par d'autres<sup>1,19,150</sup>.

L'absence de cicatrice astrocytaire chez les nouveau-nés pourrait, elle aussi, être due à l'immaturité de leur système immunitaire. En effet, un signal responsable de l'élaboration d'une cicatrice gliale persistante pourrait être absent du cerveau immature. La différence observée pourrait également être due à l'état fonctionnel de ces cellules à cette étape de leur développement. En effet, les astrocytes immatures possèdent des caractéristiques qui favorisent la croissance axonale et la migration neuronale puisque leur rôle est de guider les neurones vers leur cible<sup>38,110</sup>.

La variabilité dans l'étendue de la cicatrice gliale et la réaction astrocytaire des rats nouveau-nés et adultes ne pourraient pas être causées par une contamination du greffon par des macrophages provenant du tissu greffé puisque la source de cellules greffées est la même: Les

injections ont été faites parallèlement chez les receveurs nouveau-nés et adultes, à partir des mêmes suspensions de cellules neurales.

### 3.3.2 Cicatrice astrocytaire chez les rats lésés

Contrairement aux rats greffés nouveau-nés, une cicatrice astrocytaire persistante s'établit chez les rats lésés à la naissance. Cette observation suggère que le tissu greffé a un effet inhibiteur sur l'élaboration ou le maintien de la cicatrice gliale. D'autres auteurs ont rapporté que l'implantation de tissu fœtal diminue la cicatrice gliale produite par une lésion<sup>22,109,115,130,132</sup>. Ce phénomène pourrait être le résultat de l'influence des astrocytes greffés puisque la transplantation d'astrocytes immatures diminue aussi l'astrogliose produite par une lésion<sup>130</sup>. Les neurones immatures pourraient aussi contribuer à cet effet puisque l'implantation de motoneurones spinaux immatures purifiés en culture réduit aussi l'astrogliose produite par une lésion excitotoxique dans le thalamus du rat adulte<sup>115</sup>. Toutefois, cet effet inhibiteur du tissu greffé ne serait pas assez puissant pour inhiber entièrement la cicatrice astrocytaire chez l'adulte.

### 3.3.3. Greffes homotypiques vs greffes hétérotypiques

Les greffes de tissu homotypique n'induisent pas une accumulation d'astrocytes réactifs aussi dense en bordure de la greffe que les greffes de tissu hétérotypique. En effet, les astrocytes sont distribués de manière plus uniforme dans les greffes homotypiques. Or, Zhou *et coll.*<sup>150</sup> ont rapporté la formation d'une cicatrice gliale en bordure des greffes intrastriales homotypiques. Toutefois, la cicatrice gliale décrite dans cette étude est moins importante que celle que nous avons observée autour des greffes intrastriales hétérotypiques. La densité plus faible d'astrocytes

dans les cicatrices astrocytaires induites par des greffes homotypiques pourrait contribuer à la plus grande intégration anatomique de ces greffes dans le SNC receveur. Toutefois, les résultats de Pierret *et al.*<sup>107</sup>, il ne semble pas que la cicatrice établisse la démarcation entre les zones DARPP-32-positives et DARPP-32-négatives

### 3.3.4 Origine des astrocytes de la greffe et de la cicatrice astrocytaire.

Les astrocytes qui apparaissent dans la greffe à partir de JPI10 pourraient provenir de l'hôte ou des précurseurs d'astrocytes de la greffe et le délai avant l'apparition de l'expression du GFAP dans la greffe pourrait être dû au temps nécessaire pour que les astrocytes de l'hôte migrent jusque dans la greffe ou pour que les astrocytes immatures greffés acquièrent la capacité d'exprimer la GFAP. La présence de prolongements GFAP-immunopositifs dans la greffe au 5e jour après la transplantation supporte l'hypothèse que des astrocytes de l'hôte envahissent graduellement la greffe.

Les astrocytes GFAP-immunopositifs formant la cicatrice gliale semblent principalement provenir de l'hôte. Des auteurs ont rapporté que les astrocytes de la greffe ne contribuent pas à la cicatrice gliale<sup>48</sup> ou n'expriment pas la GFAP<sup>3</sup>. En effet, une étude récente utilisant la transplantation intracérébrale de tissu embryonnaire normal chez des souris transgéniques exprimant la  $\beta$ -galactosidase a montré que la majorité des astrocytes GFAP-positifs de la cicatrice gliale expriment aussi le transgène<sup>48</sup>. Nos propres résultats montrent que les cellules exprimant la vimentine dans la greffe ont la même distribution que les astrocytes GFAP-immunopositifs de la cicatrice gliale. Cette observation suggère que des astrocytes de la greffe participent à la cicatrice gliale. La présence de ces

cellules vimentine-positives pourrait expliquer la différence entre la cicatrice gliale des animaux lésés et celle des animaux greffés.

## CONCLUSIONS

La réaction astrocytaire initiale en réponse à l'implantation de tissu mésencéphalique fœtal est plus importante dans le cerveau receveur nouveau-né que dans le cerveau receveur adulte. Or, la croissance des axones 5-HT de l'hôte, de même que celle des axones DA des neurones transplantés, est aussi plus grande dans le cerveau du receveur nouveau-né<sup>39,99,107</sup>. De plus, elle se produit au moment où la réaction astrocytaire est à son maximum dans le cerveau receveur<sup>11,104</sup>. Cette réaction astrocytaire pourrait alors favoriser la croissance axonale dans le cerveau nouveau-né. D'autre part, une cicatrice astrocytaire immunoréactive pour la GFAP et la vimentine, élaborée en réponse à l'implantation de tissu mésencéphalique ventral fœtal, n'est formée que chez les receveurs adultes. De plus, les greffes intrastriatales homotypiques, qui sont mieux innervés par les axones 5-HT que les greffes hétérotypiques, ne montrent pas de cicatrice gliale aussi nette et ne contiennent que peu de cellules vimentine-positives. Par conséquent, les astrocytes exprimant la GFAP, ainsi que ceux exprimant la vimentine pourraient être responsables de l'inhibition de la croissance axonale. Toutefois, il a été montré que les axones 5-HT commencent à envahir les greffes homotypiques de tissu thalamique durant la première semaine suivant la transplantation, donc avant la formation d'une cicatrice gliale. De plus, la présence d'une cicatrice gliale n'empêche pas le passage d'axones de neurones DA greffés vers le striatum de rats adultes<sup>1</sup>. La cicatrice gliale n'est donc pas suffisante pour bloquer entièrement la croissance axonale. Néanmoins, il est

possible qu'une inhibition de la cicatrice gliale puisse augmenter la croissance des axones. Ces observations suggèrent qu'il se produit un événement défavorisant la croissance axonale avant l'établissement de la cicatrice gliale chez l'adulte. Il pourrait s'agir de l'expression d'une molécule inhibitrice ou encore de l'absence d'un support trophique. D'ailleurs, les molécules inhibitrices de la croissance axonale, ténascine et CS-PG, ont été observées au pourtour et à l'intérieur des greffes de tissu mésencéphalique fœtal durant cette période<sup>11</sup>.

À tous les temps observés, les cellules exprimant la vimentine sont moins nombreuses dans les greffes implantées chez les nouveau-nés que chez les adultes. Ces cellules pourraient être de meilleurs candidats pour l'inhibition de la croissance axonale que les astrocytes exprimant la GFAP, puisqu'elles sont présentes au moment où le potentiel de croissance axonal 5-HT est maximal<sup>11,104</sup>. Ces cellules pourraient s'être développées anormalement et pourraient produire des molécules inhibitrices de la croissance axonale normalement exprimés à un autre stade de leur développement. La suite de l'expérimentation présentée dans ce mémoire devrait ainsi porter sur ces aspects moléculaires si on veut être en mesure de bien clarifier le rôle de ces différentes populations astrocytaires dans l'intégration anatomique des greffes. D'ailleurs, il a récemment été démontré que certains éléments du cytosquelette glial peuvent réguler l'expression de molécules d'adhérence (CAMs OU SAMs)<sup>45b</sup>. Le lien avec l'expression de la vimentine ou de la GFAP dans les astrocytes réactifs serait intéressant à explorer.

## BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

1. Abrous N., Guy J., Vigny A., Calas A., Le Moal M. and Herman J. P. (1988) Development of intracerebral dopaminergic grafts: A combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences. *J. Comp. Neurol.* **273**, 26-41.
2. Aguayo A. J., Bray G. M., Carter D. A., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M. and Rasminsky M. (1990) Regrowth and connectivity of injured central nervous system axons in adult rodents. *Acta Neurobiol. Exp.* **50**, 381-389.
3. Andersson C., Tytell M. and Brunsobechtold J. (1993) Transplantation of cultured type-1 astrocyte cell suspensions into young, adult and aged rat cortex -cell migration and survival. *Int. J. Develop. Neurosci.* **11**, 555-568.
4. Bahr M., Przyrembel C. and Bastmeyer M. (1995) Astrocytes from adult rat optic nerves are nonpermissive for regenerating retinal ganglion cell axons. *Exp. Neurol.* **131**, 211-20.
5. Bakhit C., Armanini M., Bennett G. L., Wong W. L., Hansen S. E. and Taylor R. (1991) Increase in glia-derived nerve growth factor following destruction of hippocampal neurons. *Brain Res.* **560**, 76-83.
6. Bakhit C., Armanini M., Bennett G. L., Wong W. L. T., Hansen S. E. and Taylor R. (1991) Increase in glia-derived nerve growth factor following destruction of hippocampal neurons. *Brain Res.* **560**, 76-83.
7. Balasingam V., Dickson K., Brade A. and Yong V. W. (1996) Astrocyte reactivity in neonatal mice: apparent dependence on the presence of reactive microglia/macrophages. *Glia* **18**, 11-26.
8. Balasingam V., Tejada-Berges T., Wright E., Bouckova R. and Yong V. W. (1994) Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J. Neurosci.* **14**, 846-856.
9. Balasingam V. and Yong V. W. (1996) Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J. Neurosci.* **16**, 2945-2955.



10. Bandtlow C., Zachleder T. and Schwab M. E. (1990) Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J. Neurosci.* **10**, 3837-3848.
11. Barker R. A., Dunnett S. B., Faissner A and Fawcett J. W. (1996) The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Exp. Neurol.* **141**, 79-93.
12. Barrett C. P., Donati E. J. and Guth L. (1984) Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury. *Exp. Neurol.* **84**, 374-385.
13. Bernstein D. R. and al e. (1981) Neuritic growth maintained near the lesion site long after spinal cord transection in the newborn rat. *Neurosci. Lett.* **26**, 55-61.
14. Bernstein J. J. and Goldberg W. J. (1989) Rapid migration of grafted cortical astrocytes from suspension grafts placed in host thoracic spinal cord. *Brain Res.* **491**, 205-211.
15. Berry M., Maxwell W. L., Logan A., Mathewson A., McConnell R., Ashhurst D. E. and Thomas G. H. (1983) Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir.* **32**, 31-53.
16. Bignami A., Raju T. and Dahl D. (1982) Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. *In vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera.* *Dev. Biol.* **91**, 286-95.
17. Björklund A., Lindvall O., Isacson O., Brundin P., Wictorin K., Strecker R. E., Clarke D. J. and Dunnett S. B. (1987) Mechanisms of action of intracerebral neural implants: Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trends Neurosci.* **10**, 509-516.
18. Björklund A. and Stenevi U. (1984) Intracerebral neural implants: Neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**, 279-308.
19. Blunt S. B., Jenner P. and Marsden C. D. (1992) Motor function, graft survival and gliosis in rats with 6-OHDA lesions and foetal ventral mesencephalic grafts chronically treated with L-DOPA and carbidopa. *Exp. Brain Res.* **88**, 326-340.

20. Bovolenta P., Wandosell F. and Nieto-Sampedro M. (1992) CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. In *Progress in Brain Research*; 94:367-379. Elsevier, Amsterdam.
21. Bovolenta P., Wandosell F. and Nieto-Sampedro M. (1993) Characterization of a neurite outgrowth inhibitor expressed after CNS injury. *Eur. J. Neurosci.* 5, 454-465.
22. Bregman B. S., Kunkel-Bagden E., McAtee M. and O'Neil A. (1989) Extension of the critical period for developmental plasticity of the corticospinal pathway. *J. Comp. Neurol.* 282, 355-370.
23. Bregman B. S. and Reier P. J. (1986) Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death. *J. Comp. Neurol.* 244, 86-95.
24. Brodkey J. A., Laywell E. D., O'Brien T. F., Faissner A., Stefansson K., Dorries H. U., Schachner M. and Steindler D. A. (1995) Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J. Neurosurg.* 82, 106-112.
25. Brundin P. and Björklund A. (1987) Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain. In *Progress in brain research: Neural Regeneration* (ed. Seil F. J., Herbert E. and Carlson B. M.), pp. 293-308. Elsevier, Amsterdam.
26. Caday C. G., Klagsbrun M., Fanning P. J., Mirzabegian A. and Finklestein S. P. (1990) Fibroblast growth factor (FGF) levels in the developing rat brain. *Develop. Brain Res.* 52, 241-246.
27. Calvo J. L., Carbonell A. L. and Boya J. (1991) Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* 566, 333-336.
28. Canning D. R., Hoke A., Malemud C. J. and Silver J. (1996) A potent inhibitor of neurite outgrowth that predominates in the extracellular matrix of reactive astrocytes. *Int. J. Develop. Neurosci.* 14, 153-175.
29. Carlstedt T., Dalsgaard C. J. and Molander C. (1987) Regrowth of lesioned dorsal root nerve fibers into the spinal cord of neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 74, 14-8.
30. Caroni P. and Schwab M. E. (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1, 85-96.

31. Cheng H. W., Jiang T., Brown S. A., Pasinetti G. M., Finch C. E., McNeill T. H. (1994). Response of striatal astrocytes to neuronal deafferentation: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Neurosci.* 62(2): 425-439.
32. Chkirate M., Vallée A. and Doucet G. (1993) Host striatal projections into fetal ventral mesencephalic tissue grafted to the striatum of immature or adult rat. *Exp. Brain Res.* 94, 357-362.
33. Cohen J., Burne J. F., McKinlay C. and Winter J. (1987) The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. *Dev. Biol.* 122, 407-418.
34. Cohen J., Burne J. F., Winter J. and Bartlett P. F. (1986) Retinal ganglion cells lose response to laminin with maturation. *Nature* 322, 465-467.
35. Dahl D., Rueger D. C., Bignami A., Weber K. and Osborn M. (1981) Vimentin, the 57 000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur. J. Cell Biol.* 24, 191-196.
36. Davies S. J., Field P. M. and Raisman G. (1996) Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp. Neurol.* 142, 203-216.
37. Davies S. J., Field P. M. and Raisman G. (1994) Long interfascicular axon growth from embryonic neurons transplanted into adult myelinated tracts. *J. Neurosci.* 14, 1596-1612.
38. Denis-Donini S., Glowinski J. and Prochiantz A. (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307, 641-643.
39. Doucet G., Murata Y., Brundin P., Bosler O., Mons N., Geffard M., Ouimet C. C. and Björklund A. (1989) Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.* 106, 1-19.
40. Dusart I., Marty S. and Peschanski M. (1991) Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS. 2. Astrocytes. *Neuroscience* 45, 541-549.
41. Eclancher F., Kehrlı P., Labourdette G. and Sensenbrenner M. (1996) Basic fibroblast growth factor (bFGF) injection activates the glial reaction in the injured adult rat brain. *Brain Res.* 737, 201-214.

42. Eng L. F. and Ghirnikar R. S. (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* **4**, 229-237.
43. Faissner A., Scholze A. and Gotz B. (1994) Tenascin glycoproteins in developing neural tissues: only decoration? *Perspect. Dev. Neurobiol.* **2**, 53-66.
44. Fawcett J. W., Housden E., Smith-Thomas L. and Meyer R. L. (1989) The growth of axons in three-dimensional astrocyte cultures. *Dev. Biol.* **135**, 449-458.
- 45a. Fawcett, J. W. 1994. Astrocytes and axon regeneration in the central nervous system. *J. Neurol.* **241**: S25-S28.
- 45b. Fernandez-Valle C., Gorman D., Gomez A. M., Bunge M. B. (1997). Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with Schwann cell myelination. *J. Neurosci*; **17**(1):241-250.
46. Firkins S. S., Bates C. A. and Stelzner D. J. (1993) Corticospinal tract plasticity and astroglial reactivity after cervical spinal injury in the postnatal rat. *Exp. Neurol.* **120**, 1-15.
47. Galou M., Colucci-Guyon E., Ensergueix D., Ridet J. l., Gimenez Y., Ribotta M., Privat A., Babinet C. and Dupouey P. (1996) Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J. Cell Biol.* **133**, 853-863.
48. Gates M. A., Laywell E. D., Fillmore H. and Steindler D. A. (1996) Astrocytes and extracellular matrix following intracerebral transplantation of embryonic ventral mesencephalon or lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* **74**, 579-97.
49. Gates M. A., Thomas L. B., Howard E. M., Laywell E. D., Sajin B., Faissner A., Gotz B., Silver J. and Steindler D. A. (1995) Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J. Comp. Neurol.* **361**, 249-266.
50. Gearhart J., Oster-Granite M. L. and Guth L. (1979) Histological changes after transection of the spinal cord of fetal and neonatal mice. *Exp. Neurol.* **66**, 1-15.
51. Ghooray G. T. and Martin G. F. (1993) Development of an astrocytic response to lesions of the spinal cord in the north american opossum - an immunohistochemical study using Anti-GFAP. *Glia* **9**:10-17.

52. Giulian D. (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **18**, 155-171.
53. Giulian D. and Lachman L. B. (1985) Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* **228**, 497-499.
54. Giulian D., Woodward J., Young D. G., Krebs J. F. and Lachman L. B. (1988) Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci.* **8**, 2485-2490.
- 55a. Goldman R. D, Khuon S., Chou Y. H., Opal P. and Steinert P. M. (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* **134**, 971-983.
- 55b. Graeber M. B. , Streit W. J., Kreutzberg G. W. (1988). The microglial cytoskeleton: vimentin is localized within activated cells in situ. *J Neurocytol* **17**(4): 573-580.
56. Gressens P., Richelme C., Kadhim H. J., Gadisseux J. F. and Evrard P. (1992) The germinative zone produces the most cortical astrocytes after neuronal migration in the developing mammalian brain. *Biol. Neon.* **61**, 4-24.
57. Hatton J. D., Nguyen M. H. and U H. S. (1993) Differential migration of astrocytes grafted into the developing rat brain. *Glia* **9**, 113-119.
58. Herman J. P., Abrous D. N. and Lemoal M. (1991) Anatomical and behavioral comparison of unilateral dopamine-rich grafts implanted into the striatum of neonatal and adult rats. *Neuroscience* **40**, 465-475.
59. Hill S. J., Barbarese E. and McIntosh T. K. (1996) Regional heterogeneity in the response of astrocytes following traumatic brain injury in the adult rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 1221-1229.
- 60a. Hozumi I., Chiu F. C. and Norton W. T. (1990) Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res.* **524**, 64-71.
- 60b. Isacson O. , Deacon T. (1997) Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *TINS* **20**(10):477-482.
61. Isacson O., Brundin P., Kelly P. A. T., Gage F. H. and Björklund A. (1984) Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* **311**, 456-460.

62. Isacson O., Fischer W., Wictorin K., Dawbarn D. and Björklund A. (1987) Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience* **20**, 1043-1056.
63. Jacque C., Quinonero J., Collins P. V., Villarroya H. and Suard I. (1992) Comparative migration and development of astroglial and oligodendroglial cell populations from a brain xenograft. *J. Neurosci.* **12**, 3098-3106.
64. Janeczko K. (1988) The proliferative response of astrocytes to injury in neonatal rat brain. A combined immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res.* **456**, 280-285.
65. Janeczko K. (1991) Lesion-induced proliferation of vimentin-positive astrocytes in the mouse cerebral hemisphere. *Folia Histochem. Cytobiol.* **29**, 55-57.
66. Janeczko K. (1993) Co-Expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere - a combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 139-147.
67. Janeczko K. (1994) Age-dependent changes in the proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the rat brain. *Int. J. Develop. Neurosci.* **12**, 431-440.
68. Kahn M. A., Ellison J. A., Speight G. J. and Devellis J. (1995) CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res.* **685**, 55-67.
69. Kalderon N. (1988) Differentiating astroglia in nervous tissue histogenesis/regeneration: studies in a model system of regenerating peripheral nerve. *J. Neurosci. Res.* **21**, 501-12.
70. Kalil K., Reh T. (1982) A light and electron microscopic study of regrowing pyramidal tract fibers. *J. Comp. Neurol.* **211**, 265-275.
71. Kindy M. S., Bhat A. N. and Bhat N. R. (1992) Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Brain Res. Molec. Brain Res.* **13**, 199-206.
72. Kliot M., Smith G. M., Siegal J. D. and Silver J. (1990) Astrocyte-polymer implants promote regeneration of dorsal root fibers into the adult mammalian spinal cord. *Exp. Neurol.* **109**, 57-69.

73. Komoly S., Hudson L. D., Webster H. D. and Bondy C. A. (1992) Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 1894-1898.
74. Kruger S., Sievers J., Hansen C., Sadler M. and Berry M. (1986) Three morphologically distinct types of interface develop between adult host and fetal brain transplants: implications for scar formation in the adult central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **249**, 103-116.
75. Latov N., Nilaver G., Zimmerman E. A., Johnson W. G., Silverman A. J., Defendini R. and Côté L. (1979) Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. *Dev. Biol.* **72**, 381-384.
76. Laywell E. D., Dorries U., Bartsch U., Faissner A., Schachner M. and Steindler D. A. (1992) Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2634-2638.
77. Lefrancois T., Fages C., Peschanski M. and Tardy M. (1997) Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J. Neurosci.* **17**, 4121-4128.
78. Leroux P. D. and Reh T. A. (1996) Reactive astroglia support primary dendritic but not axonal outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *Exp. Neurol.* **137**, 49-65.
79. Levine J. M. and Stallcup W. B. (1987) Plasticity of developing cerebellar cells in vitro studied with antibodies against the NG2 antigen. *J. Neurosci.* **7**, 2721-2731.
80. Li Y. and Raisman G. (1995) Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* **134**, 102-111.
81. Liesi P. (1985) Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *EMBO J.* **4**, 2505-2511.
82. Lindsay R. M. (1979) Adult rat brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-insensitive neurones. *Nature* **282**, 80-82.



83. Liuzzi F. J. and Lasek R. J. (1987) Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* **237**, 642-645.
84. Logan A., Frautschy S. A., Gonzalez A. M., Sporn M. B. and Baird A. (1992) Enhanced expression of transforming growth factor beta-1 in the rat brain after a localized cerebral injury. *Brain Res.* **587**, 216-225.
85. Lu, S. Y., Shipley, M. T., Norman, A. B., and Sanberg, P. R. 1991. Striatal, ventral mesencephalic and cortical transplants into the intact rat striatum - A neuroanatomical study. *Exp. Neurol.* **113**: 109-130.
86. Marion D. W., Pollack I. F. and Lund R. D. (1990) Patterns of immune rejection of mouse neocortex transplanted into neonatal rat brain, and effects of host immunosuppression. *Brain Res.* **519**, 133-143.
87. Marty S., Dusart I. and Peschanski M. (1991) Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS .1. Microglia/macrophages. *Neurosci.* **45**, 529-539.
88. Mathewson A. J. and Berry M. (1985) Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res.* **327**, 61-69.
89. McCarthy G. F. and Leblond C. P. (1988) Radioautographic evidence for slow astrocyte turnover and modest oligodendrocyte production in the corpus callosum of adult mice infused with 3H-thymidine. *J. Comp. Neurol.* **271**, 589-603.
90. McKeon R. J., Hoke A. and Silver J. (1995) Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp. Neurol.* **136**, 32-43.
91. McKeon R. J., Schreiber R. C., Rudge J. S. and Silver J. (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* **11**, 3398-3411.
92. McKerracher L. J., David S., Jackson D. L., Kottis V., Dunn R. J. and Braun P. E. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13**, 805-811.
93. McLoon S. C. and Lund R. D. (1983) Development of fetal retina, tectum, and cortex transplanted to the superior colliculus of adult rats. *J. Comp. Neurol.* **217**, 376-389.



94. Merrill J. E. and Jonakait G. M. (1995) Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *FASEB J.* **9**, 611-618.
95. Misson J. P., Austin C. P., Takahashi T., Cepko C. L. and Caviness V. S., Jr. (1991) The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cerebral Cortex* **1**, 221-229.
96. Moore I. E., Buontempo J. M. and Weller R. O. (1987) Response of fetal and neonatal rat brain to injury to injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **13**, 219-228.
98. Moumdjian R. A., Antel J. P. and Yong V. W. (1991) Origin of contralateral reactive gliosis in surgically injured rat cerebral cortex. *Brain Res.* **547**, 223-228.
99. Mounir A., Chkirate M., Vallée A., Pierret P., Geffard M. and Doucet G. (1994) Host serotonin axons innervate intrastriatal ventral mesencephalic grafts after implantation in newborn rat. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1307-1315.
100. Mukhopadhyay G., Doherty P., Walsh F. S., Crocker P. R. and Filbin M. T. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* **13**, 757-767.
101. Murray M., Wang S. D., Goldberger M. E. and Levitt P. (1990) Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions. *Exp. Neurol.* **110**, 248-257.
102. Noble M., Fok-Seang J. and Cohen J. (1984) Glia are a unique substrate for the in vitro growth of central nervous system neurons. *J. Neurosci.* **4**, 1892-1903.
103. Noble M., Wren D. and Wolswijk G. (1992) The O-2A (adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system. *Semin. Cell Biol.* **3**, 413-422.
104. Nothias F., Onteniente B., Geffard M. and Peschanski M. (1988) Rapid growth of host afferents into fetal thalamic transplants. *Brain Res.* **463**, 341-345.
105. Oblinger M. M. and Singh L. D. (1993) Reactive astrocytes in neonate brain upregulate intermediate filament gene expression in response to axonal injury. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 149-156.

106. Petito C. K., Morgello S., Felix J. C. and Lesser M. L. (1990) The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 850-859.
107. Pierret P., Vallée A., Bosler O., Dorais M., Moukhles H., Abbaszadeh R., Lepage Y. and Doucet G. (1997) Serotonin axons of the neostriatum show a higher affinity for striatal than for ventral mesencephalic transplants: A quantitative study in adult and immature recipient. *Soumis*
108. Pixley S. K. and de Vellis J. (1984) Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* **317**, 201-209.
109. Predy R. and Malhotra S. K. (1989) Reactive astrocytes in lesioned rat spinal cord: effect of neural transplants. *Brain Res. Bull.* **22**, 81-87.
110. Rakic P. (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia* **46**, 882-891.
111. Reier P. J., Bregman B. S. and Wujek J. R. (1986) Intraspinal transplantation of embryonic spinal cord tissue in neonatal and adult rats. *J. Comp. Neurol.* **247**, 275-296.
112. Reier P. J. , Houle J. D. (1988) The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv Neurol*; **47**:87-138
113. Rimaniol A. C., Lekieffre D., Serrano A., Masson A., Benavides J. and Zavala F. (1995) Biphasic transforming growth factor-beta production flanking the pro-inflammatory cytokine response in cerebral trauma. *Neuroreport* **7**, 133-136.
114. Roessmann U. and Gambetti P. (1986) Pathological reaction of astrocytes in perinatal brain injury. Immunohistochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **70**, 302-307.
115. Rostaing-Rigattieri S., Flores-Guevara R., Peschanski M. and Cadusseau J. (1997) Glial and endothelial cell response to a fetal transplant of purified neurons. *Neuroscience* **79**, 723-734.

116. Rostworowski M., Balasingam V., Chabot S., Owens T. and Yong V. W. (1997) Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J. Neurosci.* **17**, 3664-3674.
117. Rudge J. S. and Silver J. (1990) Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J. Neurosci.* **10**, 3594-3603.
118. Sanchotello M., Valles S., Montoliu C., Renaupiqueras J. and Guerri C. (1995) Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia* **15**, 157-166.
119. Savio T. and Schwab M. E. (1990) Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4130-4133.
120. Schiffer D., Giordana M. T., Cavalla P., Vigliani M. C. and Attanasio A. (1993) Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat - double stainings and markers of cell proliferation. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 269-280.
121. Schiffer D., Giordana M. T., Migheli A., Giaccone G., Pezzotta S. and Mauro A. (1986) Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* **374**, 110-118.
122. Schmechel D. E. and Rakic P. (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol. (Berl.)* **156**, 115-152.
123. Schmidtkastner R., Wietasch K., Weigel H. and Eysel U. T. (1993) Immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) after deafferentation or ischemic infarction in rat visual system - features of reactive and damaged astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 157-174.
124. Schwab M. E. (1990) Myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Exp. Neurol.* **109**, 2-5.
125. Schwab M. E. and Caroni P. (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* **8**, 2381-2393.

126. Schwarz S. C, Kupsch A. R., Banati R. and Oertel W. H. (1996) Cellular immune reactions in brain transplantation: effects of graft pooling and immunosuppression in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Glia* **17**, 103-120.
127. Scripter J. L., Ko J., Kow K., Arimura A. and Ide C. F. (1997) Regulation by interleukin-1 $\beta$  of formation of a line of delimiting astrocytes following prenatal trauma to the brain of the mouse. *Exp. Neurol.* **145**, 329-341.
128. Sievers J., Bamberger C., Debus O. M. and Lucius R. (1995) Regeneration in the optic nerve of adult rats - influences of cultured astrocytes and optic nerve grafts of different ontogenetic stages. *J. Neurocytol.* **24**, 783-793.
129. Silver J. and Ogawa M. Y. (1983) Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* **220**, 1067-1069.
130. Smith G. M. and Miller R. H. (1991) Immature type-1 astrocytes suppress glial scar formation, are motile and interact with blood vessels. *Brain Res.* **543**, 111-122.
131. Smith G. M., Rutishauser U., Silver J. and Miller R. H. (1990) Maturation of astrocytes in vitro alters the extent and molecular basis of neurite outgrowth. *Dev. Biol.* **138**, 377-390.
132. Smith G. M. and Silver J. (1988) Transplantation of immature and mature astrocytes and their effects on scar formation in the lesioned CNS. In *Progress in brain research: Transplantation into the mammalian CNS* (ed. Gash D. M. and Sladek J. R.), pp. 353-361. Elsevier, Amsterdam.
133. Smith-Thomas L. C., Fokseang J., Stevens J., Du J. S., Muir E., Faissner A., Geller H. M., Rogers J. H. and Fawcett J. W. (1994) An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 1687-1695.
134. Snow D. M., Lemmon V., Carrino D. A., Caplan A. I. and Silver J. (1990) Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* **109**, 111-130.

135. Stensaas L. J., Partlow L. M., Burgess P. R. and Horch K. W. (1987) Inhibition of regeneration: the ultrastructure of reactive astrocytes and abortive axon terminals in the transition zone of the dorsal root. In *Progress in Brain Research: Neural regeneration*, pp.457-468. Elsevier, Amsterdam.
136. Takamiya Y., Kohsaka S., Toya S., Otani M. and Tsukada Y. (1988) Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res.* **466**, 201-210.
137. Topp K. S., Faddis B. T. and Vijayan V. K. (1989) Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brains of young and aged rats. *Glia* **2**, 201-211.
138. Trimmer P. A. (1993) Reactive astrocytes in explant cultures of glial scars derived from lesioned rat optic nerve - an ultrastructural study. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 125-137.
139. Trimmer P. A. and Wunderlich R. E. (1990) Changes in astroglial scar formation in rat optic nerve as a function of development. *J. Comp. Neurol.* **296**, 359-378.
140. Tuba A, Kallai L and Kalman M (1997) A rapid replacement of vimentin-containing radial glia by glial fibrillary acidic protein-containing astrocytes in transplanted telencephalon. *J. neural Transpl. Plasticity* **6**, 21-29.
141. Voigt T. (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **289**, 74-88.
143. Wen R., Song Y., Cheng T., Matthes M. T., Yasumura D., LaVail M. M. and Steinberg R. H. (1995) Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J. Neurosci.* **15**, 7377-7385.
144. Wictorin K. (1992) Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants. *Prog. Neurobiol.* **38**, 611-639.
145. Winter C. G., Saotome Y., Levison S. W. and Hirsh D. (1995) A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 5865-5869.

146. Wunderlich G., Stichel C. C., Schroeder W. O. and Muller H. W. (1994) Transplants of immature astrocytes promote axonal regeneration in the adult rat brain. *Glia* **10**, 49-58.
147. Yong V. W., Mouldjian R., Yong F. P., Ruijs T. C., Freedman M. S., Cashman N. and Antel J. P. (1991) Gamma-interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**, 7016-7020.
148. Yu A. C., Lee Y. L. and Eng L. F. (1993) Astroglial in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. *J. Neurosci. Res.* **34**, 295-303.
149. Zhou C.-F., Lawrence J. M., Morris R. J. and Raisman G. (1986) Migration of host astrocytes into superior cervical sympathetic ganglia autografted into the septal nuclei of choroid fissure of adult rats. *Neuroscience* **17**, 815-827.
150. Zhou F. C., Buchwald N., Hull C. and Towle A. (1989) Neuronal and glial elements of fetal neostriatal grafts in the adult neostriatum. *Neuroscience* **30**, 19-31.
151. Zhou H. F. and Lund R. D. (1992) Neonatal host astrocyte migration into xenogeneic cerebral cortical grafts. *Develop. Brain Res.* **65**, 127-131.