

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

«Etude du potentiel de croissance axonale des neurones à sérotonine
innervant le striatum chez le rat»

présentée par:

Philippe Pierret

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Laurent Descarries, président-rapporteur

Dr Guy Doucet, directeur de recherche

Dr Richard Robitaille, membre du jury

Dr Paul Bédard, examinateur externe

Thèse acceptée le 16.04.1998

le:.....

Sommaire

Le but de ce travail était d'étudier la capacité de croissance axonale de neurones centraux adultes. Ceux-ci ne survivant pas à la transplantation, nous avons analysé le comportement des neurones de l'hôte après transplantation de tissu nerveux fœtal dans le système nerveux central adulte ou en développement. C'est dans cette optique que la capacité de croissance axonale des neurones à sérotonine (5-HT) innervant le striatum a été étudiée chez le rat adulte, juvénile ou nouveau-né, après transplantation intrastriatale hétérotypique de tissu mésencéphalique ventral ou homotypique de tissu striatal prélevé chez des fœtus de 14-15 jours.

Il avait été précédemment démontré que les neurones 5-HT d'un hôte adulte peuvent innerver des transplants intrastriataux de tissu cortical ou striatal, mais pas des transplants de mésencéphale ventral. Les axones 5-HT adultes semblent ainsi avoir une affinité différentielle pour le tissu nerveux fœtal, selon sa provenance anatomique. Néanmoins, nous avons constaté que des greffes mésencéphaliques intrastriatales peuvent être innervées par les neurones 5-HT de l'hôte, si celui-ci est âgé de moins de 14 jours au moment de l'implantation. De plus, le même tissu greffé chez l'adulte contient une forte innervation 5-HT lorsque des neurones 5-HT sont présents au sein des greffons par suite d'une co-transplantation de neurones 5-HT fœtaux du raphé mésencéphalique. Les axones 5-HT néonataux ou fœtaux sont donc dotés d'une certaine affinité pour le tissu mésencéphalique ventral fœtal, mais il semble que cette affinité diminue rapidement avec leur maturation.

Pour déterminer l'importance de l'origine anatomique du tissu transplanté et de l'âge de l'hôte pour la croissance des axones 5-HT dans les greffes, nous avons examiné des greffes de tissu mésencéphalique ou striatal fœtal implantées dans le striatum de rats normaux âgés de 5 jours, 15 jours ou adultes. Nous avons eu recours à l'immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre la 5-HT et à l'autoradiographie quantitative après capture de 5-HT tritiée afin de visualiser les axones 5-HT de l'hôte innervant la greffe. Ce travail nous a permis de démontrer que les axones 5-HT qui innervent le striatum ont une affinité qui varie selon l'origine anatomique, mésencéphalique ou striatale, du tissu greffé et que la capacité de ces axones d'innerver les greffes diminue avec l'âge du receveur. De plus, nos observations suggèrent que cette diminution est plus rapide avec le tissu mésencéphalique qu'avec le tissu striatal. A l'intérieur même des greffes de striatum, la quantification autoradiographique, couplée à

l'immunohistochimie en post-enrobage de la DARPP-32 (Dopamine and Adenosine 3', 5'- monophosphate-Regulated PhosphoProtein- 32 000 PM), comme marqueur des neurones du striatum, a permis de mettre en évidence une préférence des fibres 5-HT pour les zones véritablement striatales de ces greffes et ce, à tous les âges étudiés.

Dans une autre étude, nous avons testé l'hypothèse voulant que les astrocytes de la greffe puissent être impliqués dans l'attraction des fibres 5-HT. Nous avons mis au point une technique de co-transplantation d'astrocytes en culture et de tissu nerveux central fœtal, afin d'étudier l'effet des astrocytes striataux, mésencéphaliques ou corticaux sur le degré d'innervation des transplants mésencéphaliques ou striataux par les neurones 5-HT de l'hôte adulte. La densité d'innervation 5-HT a été évaluée par immunohistochimie de la 5-HT et par autoradiographie quantitative après capture de 5-HT tritiée, dans des greffes et des co-greffes implantées dans le striatum de rats adultes. Les résultats, encore préliminaires, indiquent que les astrocytes du cortex et du striatum, mais non ceux provenant du mésencéphale, favorisent l'innervation 5-HT des transplants mésencéphaliques. Les astrocytes du mésencéphale n'ont pas, non plus, montré d'effet inhibiteur sur l'innervation 5-HT relativement dense des greffes striatales.

L'étude de ces co-greffes nous a en outre permis de mettre en évidence une augmentation significative de la taille des neurones à dopamine (DA) au sein des transplants mésencéphaliques contenant des astrocytes striataux. Cet effet trophique était accompagné d'un important développement axonal DA intra-greffe, contrastant avec une ré-innervation DA beaucoup plus faible du striatum de l'hôte préalablement privé de son innervation DA intrinsèque. Ces observations suggèrent que les astrocytes striataux ont aussi un effet de rétention sur les axones DA de la greffe.

D'autre part, la transplantation intracérébrale provoque une gliose et, dans la plupart des cas, la formation d'une cicatrice gliale. Celle-ci, formée principalement d'astrocytes réactifs, est susceptible d'influer sur la croissance des axones à travers l'interface hôte/greffe. Cette réaction astrocytaire a fait l'objet de la troisième partie de notre étude. Nous avons comparé la gliose et la cicatrice gliale induites par la transplantation intrastriatale de tissu mésencéphalique ou striatal chez des rats adultes, juvéniles ou nouveau-nés. Chez ces derniers, la réaction gliale, intense à court terme, a diminué graduellement sans former de cicatrice gliale, alors

que chez un receveur adulte la gliose était initialement plus faible mais s'est transformée en cicatrice gliale après dix jours. Toutefois, chez l'adulte, la cicatrice gliale variait en densité selon la nature du tissu greffé, étant moins importante après l'implantation homotypique de tissu striatal qu'après celle, hétérotypique, de tissu mésencéphalique.

L'ensemble de ces travaux met en évidence plusieurs facteurs susceptibles d'influencer la pousse des fibres 5-HT dans la greffe: l'âge de l'hôte, l'origine neuroanatomique du tissu transplanté et la formation d'une cicatrice gliale. Les résultats obtenus après co-implantation d'astrocytes suggèrent que des molécules responsables de l'affinité des axones 5-HT pour une région donnée du système nerveux central sont exprimées par les astrocytes. De ce fait, il devrait être possible d'examiner, de promouvoir ou de bloquer l'expression de ce type de molécules dans des astrocytes en culture, avant l'implantation dans le système nerveux central, ceci dans le but de préciser leur rôle dans le guidage, la croissance et la synaptogénèse de ces neurones centraux adultes.

Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations	xii
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1: INTRODUCTION.....	1
1: Plasticité anatomique du SNC.....	2
1.1: Problématique générale.....	2
2: Modèles expérimentaux de transplantation dans le néostriatum du rat.....	5
3: Le système 5-HT innervant les ganglions de la base.....	7
3.1: Données anatomo-fonctionnelles.....	7
3.1.1: Fonctions.....	7
3.1.2: Organisation anatomique.....	8
3.1.3: Développement et synaptologie de l'innervation 5-HT dans le striatum et dans la substance noire.....	9
4: Plasticité anatomique des neurones 5-HT.....	12
4.1: Données obtenues après lésions	12
4.2: Données obtenues après transplantation neurale.....	14
4.2.1: Innervation 5-HT du tissu hôte par la greffe.....	14
4.2.2: Innervation 5-HT des greffes par les neurones de l'hôte.....	15
5: Influence des astrocytes sur la plasticité anatomique neuronale.....	17
5.1: Rôles promoteurs et inhibiteurs des astrocytes sur la croissance axonale	17
5.2: Relations entre l'état de maturité des astrocytes et leur effet sur la croissance axonale.....	18
5.3: Impact des astrocytes greffés sur la récupération fonctionnelle.....	19

5.4: Influence des astrocytes réactifs et de la cicatrice gliale sur la croissance axonale.....	19
6: Objectifs du présent travail.....	22
Chapitres 2-5: RÉSULTATS.....	23
Chapitre 2: Innervation de greffes intrastriatales par les fibres 5-HT de l'hôte selon l'âge de celui-ci et l'origine anatomique du tissu greffé....	24
Chapitre 3: Rôle des astrocytes co-greffés dans le guidage des axones 5-HT	91
Chapitre 4: Rôle des astrocytes co-greffés sur la survie et le développement des neurones à dopamine.....	117
Chapitre 5: Réaction des astrocytes de l'hôte et de la greffe après transplantation de tissu nerveux fœtal.....	164
Chapitre 6: DISCUSSION GÉNÉRALE	207
6.1: Aspects méthodologiques.....	208
6.1.1: Immunohistochimie.....	208
6.1.2: Capture de monoamines tritiées et autoradiographie quantitative.....	210
6.1.3: Conditions de culture.....	211
6.1.4: Greffes et co-greffes	213
6.2: Influence du tissu transplanté sur la croissance axonale des neurones 5-HT et sur les neurones DA.....	214
6.2.1: Relations entre l'origine du tissu transplanté et le degré d'innervation 5-HT des greffons	214
6.2.2: Effet des astrocytes co-greffés avec le tissu mésencéphalique sur les péricarya DA et leurs prolongements	223
6.3: Influence de l'âge de l'hôte sur l'innervation 5-HT de greffes intrastriatales.....	228
Chapitre 7: CONCLUSION GÉNÉRALE	232
Chapitre 8: BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....	236
Annexe 1: Contribution des différents auteurs aux articles présentés dans la thèse.....	255
Annexe 2: Schéma montrant le prélèvement de la partie 2/3 rostrale du mésencéphale ventral chez le fœtus de 14 jours du rat.....	257

 Liste des tableaux

Chapitre 2:**"Host serotonin axons..."**

Table 1: Density of 5-HT innervation according to age of recipients, prior 6-OHDA lesion and presence or absence of 5-HT neuronal cell bodies inside the graft 46

Table 2: Dimension of grafts and number of grafted dopamine cell bodies according to the age of recipients and condition of host neostriatum at the time of transplantation 47

"Serotonin axons of the neostriatum..."

Table 1: Density of 5-HT innervation in ventral mesencephalic and striatal grafts, 5 months after implantation into the striatum of P5, P15 or adult rats, as quantified on autoradiographs following *in vitro* uptake of [³H]5-HT..... 81

Chapitre 4:**"Trophic and tropic effects of..."**

Table 1: Multilevel analysis of the size of dopaminergic neuronal perikarya in single grafts and in co-grafts containing in addition cortical, mesencephalic or striatal astrocytes from primary cultures.....149

Liste des figures

Chapitre 2:

"Host serotonin axons..."

Fig 1: Grafts in adult recipients without 6-OHDA lesions.....	48
Fig 2: Grafts in adult recipients treated with 5,7-dihydroxytryptamine to destroy the host 5-HT neurons	49
Fig 3: Grafts from transplantation into immature recipients.....	50
Fig 4: Postnatal development of 5-HT innervations in substantia nigra and striatum.....	51

"Serotonin axons of the neostriatum..."

Fig 1: Grafts of ventral mesencephalic and striatal tissue implanted in P5 recipients and processed for TH, 5-HT or DARPP-32 immunohistochemistry	85
Fig 2: Grafts of ventral mesencephalic and striatal tissue implanted in P15 recipients and processed for TH, 5-HT or DARPP-32 immunohistochemistry	86
Fig 3: Grafts of ventral mesencephalic and striatal tissue implanted in adult recipients and processed for TH, 5-HT or DARPP-32 immunohistochemistry	87
Fig 4: Grafts of ventral mesencephalic and striatal tissue implanted in P5 recipients and processed for [³ H]5-HT uptake/autoradiography and post-embedding immunohistochemistry for TH or DARPP-32.....	88
Fig 5: Grafts of ventral mesencephalic and striatal tissue implanted in P15 recipients and processed for [³ H]5-HT uptake/autoradiography and post-embedding immunohistochemistry for TH DARPP-32.....	89
Fig 6: Grafts of ventral mesencephalic and striatal tissue implanted in adult recipients, processed for [³ H]5-HT uptake/autoradiography and post-embedding immunohistochemistry for TH DARPP-32.....	90

Chapitre 3:**"Effet promoteur de la co-transplantation..."**

- Fig 1:** Greffe de tissu mésencéphalique ventral foetal et co-greffes du même tissu enrichies en astrocytes mis en culture à partir du mésencéphale, du striatum et du cortex cérébral néonataux.....115
- Fig 2:** Autoradiographie après capture de [³H]5-HT de coupes semi-fines d'une greffe simple de tissu mésencéphalique ventral foetal, et de co-greffes mésencéphaliques comprenant soit des astrocytes du striatum ou des astrocytes du cortex cérébral.....116

Chapitre 4:**"Trophic and tropic effects of..."**

- Fig 1:** Astrocytes in culture.....155
- Fig 2:** Oligodendrocytes immunostained for NCAM or the α_2/δ subunit of voltage-dependent calcium channels156
- Fig 3:** Immunostaining for NCAM, NCAM-PSA and α_2/δ subunit of voltage-dependent calcium channels visualized by indirect fluorescence in cultured astrocytes.....157
- Fig 4:** Hoescht-positive astrocytes in co-graft158
- Fig 5:** Grafts of ventral mesencephalic tissue immunostained for GFAP159
- Fig 6:** Single ventral mesencephalic graft and co-grafts containing also cultured ventral mesencephalic, cortical or striatal astrocytes following TH-immunostaining, in intact recipient.....160
- Fig 7-9:** Single ventral mesencephalic graft (8) or co-grafts containing cortical (9) or striatal (10) astrocytes, processed for [³H]DA uptake and autoradiography in vitro..... 161-163

Chapitre 5:**"Astrocytic reaction to the..."**

- Fig 1:** Astrocytes immunostained for GFAP, at the border between a graft of ventral mesencephalic tissue and the host neostriatum 5 days after implantation into the brain of an adult rat.....200
- Fig 2:** Untreated controls.....201
- Fig 3:** GFAP immunostaining in the striatum of rats implanted with fetal ventral mesencephalic tissue on postnatal day 1 or at the adult stage one 5, 10 or 60 days after surgery.....202

Fig 4: Low magnification view of the rostral cerebral hemisphere, 5 days after implantation of fetal ventral mesencephalic tissue in neonatal and adult recipients.....	200
Fig 5: GFAP and vimentin immunostaining following implantation of fetal ventral mesencephalic tissue into the striatum of P15 rats on PID10 and PID60	203
Fig 6: Vimentin immunostaining in the striatum of neonatally and adult-implanted rats, on PID1, PID5, PID10 and PID60	204
Fig 7: Grafts of fetal striatal tissue in the striatum of adult rats, at PID30.....	205
Fig 8: Sham-lesioned striatum (needle tract) immunostained at PLD30	206

Liste des sigles et abréviations

ABC.....	"Avidin-biotin complex"
ARNm.....	Acide ribonucléique messenger
BDNF.....	"Brain-Derived Neurotrophic Factor"
bFGF.....	"basic Fibroblast Growth Factor"
CNTF.....	"Ciliary Neurotrophic Factor"
DA.....	Dopamine ou dopaminergique
DAB.....	3-3-Diaminobenzidine
DARPP-32.....	"Dopamine and adenosine 3', 5' monophosphate-regulated phosphoprotein-32"
E14-E15.....	Quatorzième- 15ième jour embryonnaire
FGF-4.....	"Fibroblast Growth Factor-4"
GABA.....	"Gamma-aminobutyric acid"
GFAP.....	"Glial Fibrillary Acidic Protein"
GDNF.....	"Glial cell line-Derived-Neurotrophic-Factor"
[³ H]DA ou [³ H]5-HT.....	Dopamine ou sérotonine tritiées
IL-1, IL-6.....	Interleukine-1, interleukine-6
MEM.....	"Minimal essential medium"
NT.....	Neurotrophine
PBS.....	"Phosphate-buffered saline"
PDGF.....	"Platelet Derived Growth Factor"
P14-P21.....	Quatorzième- 21ième jour post-natal
SNC.....	Système nerveux central
TGF- β	"Transforming Growth Factor- β "
TH.....	Tyrosine hydroxylase
TpOH.....	Tryptophane hydroxylase
5, 6 ou 5,7-DHT.....	5,6 ou 5,7-dihydroxytryptamine
5-HT.....	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
6-OHDA.....	6-hydroxydopamine

A ma mère,
à Patrick

**La volonté indomptable, la revanche, la haine immortelle et le
courage qui jamais ne cèdent ni ne se soumettent.**

(d'après John Milton, Paradis perdu -1667)

Remerciements

Je tiens à remercier cordialement:

Le Docteur Guy Doucet, mon directeur de recherche, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude ainsi que ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Le Docteur Sylvie Vandaele pour son aide précieuse dans l'approche *in vitro* de mes travaux. Qu'elle en soit ici chaleureusement remerciée.

Les Docteurs Paul Bédard, Richard Robitaille et Laurent Descarries d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'ils reçoivent tous mes remerciements pour les suggestions et critiques qu'ils auront bien voulu apporter à ce manuscrit.

Annie Vallée pour son aide déterminante pendant ces 4 années. Qu'elle reçoive ici ma chaleureuse amitié.

Sylvia Garcia et Jean-Paul Soucy pour leurs encouragements permanents. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon respect et de ma profonde amitié.

Le Docteur Nicole Leclerc pour ses remarques constructives lors de la réalisation de ce travail. Qu'elle reçoive ici tous mes remerciements.

Mes collègues de travail ainsi que le personnel du Département de pathologie pour avoir contribué à rendre ces 4 années agréables.

Le Groupe de recherche sur le système nerveux central (Centre FCAR) ainsi que la Faculté des études supérieures pour leur soutien financier.

Je n'oublie pas mes amis de Marseille et notamment les Docteurs Olivier Bosler, Jean-Claude Orsini et Ghislaine Vuillon qui m'ont toujours amicalement soutenu. Sans leur aide, leur sens des valeurs humaines et leur amitié indéfectible, ce travail n'aurait pas été ce qu'il est aujourd'hui. Les mots sont ici insuffisants pour exprimer ma reconnaissance.

Chapitre 1: INTRODUCTION

1: Plasticité anatomique du SNC

1.1: *Problématique générale*

La transplantation intracérébrale représente depuis le début du vingtième siècle un outil de choix pour l'étude du développement et de la plasticité du système nerveux central (SNC) [24]. Ces champs d'étude, et notamment les phénomènes de plasticité anatomique, ont cependant longtemps été mésestimés du fait d'une conception dogmatique dérivée des écrits de Santiago Ramon y Cajal qui proposait une organisation cérébrale figée du SNC chez l'adulte (voir [24]). C'est suite à l'émergence de nouvelles techniques neuroanatomiques que l'hypothèse d'un réseau cérébral rigide a été délaissée pour faire place à une notion dynamique et intégrative du fonctionnement du SNC [33]. Les recherches dans ce domaine ont ainsi permis de mettre en évidence des capacités de remaniement du SNC et, notamment, de nombreux exemples de sa plasticité anatomique. Celle-ci comprend trois processus qui ont lieu au cours du développement: la croissance axonale sur de longues distances, le bourgeonnement local et la synaptogénèse.

La régénération axonale spontanée est très limitée dans le SNC adulte et n'a jusqu'à présent été démontrée que dans certains systèmes neuronaux particuliers [173], notamment les systèmes monoaminergiques [31]. Par exemple, les neurones sérotoninergiques (5-hydroxytryptamine; 5-HT) gardent, même à l'âge adulte, une forte capacité de régénérer leur axone [31]. Néanmoins, de manière générale, la plupart des axones centraux ne repoussent pas spontanément sur de longues distances après une lésion dans la substance blanche ou la substance grise du SNC adulte. La capacité intrinsèque des neurones centraux adultes à repousser n'est cependant pas en cause car la transplantation de segments de nerfs périphériques au site d'une section de la moelle épinière permet, chez le rat adulte, une croissance axonale dans le "pont" formé par la greffe [70].

Les neurones dopaminergiques (DA) embryonnaires transplantés dans la substance noire du rat adulte sont aussi incapables de croître jusqu'à leur cible striatale [34]. Là encore, la capacité intrinsèque de croissance des neurones fœtaux n'est pas en cause car les axones de neurones DA fœtaux, transplantés dans la région des colliculi et reliés au striatum par un "pont" formé d'un segment de nerf sciatique, sont capables d'y croître [3] et de pénétrer de plusieurs millimètres dans le striatum de l'hôte adulte

préalablement soumis à une dénervation DA par la 6-hydroxydopamine* [121]. En outre, des greffes homotypiques de tissu mésencéphalique fœtal ont la capacité, via un "pont" constitué de cellules de Schwannome transfectées et exprimant le facteur de croissance fibroblastique de type 4 (FGF-4), d'innervier le striatum et de corriger les déficits comportementaux dûs aux lésions induites par la 6-OHDA chez des rats adultes [43, 44]. Enfin, la transplantation intranigrale de tissu mésencéphalique fœtal par la technique de "microgreffe" [227] chez le rat adulte traité par la 6-OHDA permet une croissance sur de longues distances des axones des neurones DA inclus dans le transplant homotypique jusqu'au striatum de l'hôte [215]. Une telle croissance axonale sur de longues distances de neurones fœtaux ou même adultes "microtransplantés" dans le SNC adulte a d'ailleurs été récemment démontré dans d'autres systèmes neuronaux [72-74]. La reconstruction de la voie nigrostriatale est toutefois encore plus grande après greffe homotypique dans la substance noire nouveau né [226].

Il semble aussi que la xéno-transplantation (greffe inter-espèces) de neurones fœtaux puisse favoriser la croissance de leur axone dans le SNC de l'hôte adulte. Par exemple, des greffes homotypiques de moelle épinière provenant de fœtus humains ont la capacité d'innervier sur de longues distances la moelle épinière préalablement lésée du rat adulte [317], ce que ne font pas les neurones de la moelle épinière prélevée chez des fœtus de rats [232]. De même, les neurones DA du tissu mésencéphalique fœtal humain sont capables d'innervier leurs cibles striatales lorsqu'ils sont transplantés à des sites distants le long de la voie nigrostriée lésée par la 6-OHDA [319], contrairement aux neurones DA fœtaux de rat [34]. Enfin, les axones provenant de greffes de tissu striatal fœtal humain [318] ou porcin [75] implantées dans le striatum adulte préalablement lésé par l'acide iboténique, sont capables de régénérer sur de longues distances et d'innervier notamment le globus pallidus et la substance noire. Ce type de greffe reçoit aussi une innervation DA de l'hôte et peut compenser partiellement les déficits comportementaux dus à la lésion excitotoxique du striatum [247, 248].

Comparativement à la régénération axonale, le bourgeonnement axonal local ("sprouting") est un phénomène plus répandu qui continue de se

* La 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est un analogue structural de la DA. Captée sélectivement par les neurones DA après administration intracérébrale, elle s'accumule dans ces neurones où elle est oxydée et transformée en produits cytotoxiques, quinones et peroxydes, exerçant une action dégénérative puissante [330].

produire même chez l'animal adulte [31, 63]. Par exemple, lorsque deux systèmes afférents contactent un même neurone, l'interruption de l'un des deux peut provoquer une pousse locale du second qui vient théoriquement occuper les sites synaptiques laissés vacants par le premier. Le bourgeonnement axonal peut être terminal ou collatéral, suivant qu'il se produit au bout d'un axone sectionné ou le long de son axe. Il peut être homotypique, lorsque des axones du même type que ceux sectionnés se collatéralisent pour occuper les sites laissés vacants suite à une lésion partielle, ou hétérotypique lorsqu'il s'agit d'une collatéralisation d'axones d'un type neuronal différent.

La synaptogénèse réfère au processus de la formation des synapses, une fois que les axones ont achevé leur croissance jusqu'à leur territoire d'innervation. Ce phénomène reste dynamique et il y a un constant remodelage des connexions qui mène à la formation et au réarrangement des synapses tout au cours de la vie [249]. Comme la régénération et le bourgeonnement axonal, la synaptogénèse est toutefois plus active chez le nouveau-né que chez l'adulte [198].

Le caractère limité de la pousse axonale dans le SNC adulte a été attribué à l'action de molécules inhibitrices exprimées à la surface des oligodendrocytes adultes [109, 212, 221, 272-274] et de certains types d'astrocytes [210, 211]. Des constituants de la matrice extracellulaire [23, 46], ainsi que des facteurs trophiques [11, 150], peuvent aussi être impliqués. Les techniques de biologie moléculaire ont permis d'appréhender la structure de la plupart de ces molécules et c'est généralement *in vitro* qu'est le plus souvent tenté d'élucider leur rôle dans le développement et la plasticité du SNC. Toutefois, pour étudier la plasticité anatomique de neurones déjà différenciés ou même adultes, il est nécessaire de recourir à des approches *in vivo* car les neurones du SNC perdent rapidement après la naissance leur capacité de survivre *in vitro* [277]. En outre, l'approche *in vivo* permet de prendre en compte la complexité du SNC. A cet égard, la transplantation hétéro- ou homotypique de tissu nerveux dans le SNC offre une alternative intéressante aux approches *in vitro* [32]. En effet, bien qu'il ne soit pas possible de transplanter du tissu nerveux adulte, l'étude de la plasticité des neurones adultes peut être réalisée par l'examen comparatif des projections axonales des neurones d'un hôte immature ou adulte dans des greffes de tissu nerveux fœtal [56, 88].

C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail concernant l'étude de l'influence de l'âge et du microenvironnement neural local sur la plasticité anatomique d'une population de neurones 5-HT localisée dans le raphé mésencéphalique (raphé dorsal et raphé médian) et projetant vers le striatum. Les neurones 5-HT, dont l'organisation anatomo-fonctionnelle est désormais bien connue et pour l'étude desquels nous disposons d'un arsenal méthodologique important, sont en effet reconnus pour leur grande plasticité.

Après avoir présenté nos modèles expérimentaux de greffe de tissu mésencéphalique ou striatal fœtal dans le striatum de rats adultes ou nouveau-nés, traités ou non par la 6-OHDA, nous ferons quelques brefs rappels des données anatomo-fonctionnelles concernant le système 5-HT. Nous illustrerons ensuite le contexte neurobiologique expérimental, en présentant le raphé mésencéphalique, ses deux principales structures cibles dans les ganglions de la base (striatum et substance noire) et le développement de ses projections. Nous verrons ensuite les principales données concernant la plasticité anatomique des neurones 5-HT telles qu'acquises par des techniques de lésion ou de transplantation neurale. Nous analyserons enfin l'influence des astrocytes sur la plasticité anatomique neuronale, en replaçant ces données dans le cadre de notre modèle expérimental.

2: Modèles expérimentaux de transplantation dans le néostriatum du rat

Pour étudier la capacité de croissance des fibres 5-HT adultes, nous avons eu recours à deux modèles de transplantation intrastriatale, homotypique et hétérotypique.

Les greffes homotypiques de tissu striatal fœtal, réalisées chez le rongeur ou le primate adulte dont la structure homologue a été préalablement détruite par des acides aminés excitateurs, ont la capacité de reconstruire en partie la circuiterie neuronale détruite [162], et de compenser les déficits comportementaux produits par ce type de lésion [144, 163]. La plupart des régions cérébrales de l'hôte qui innervent normalement le striatum innervent aussi le greffon selon des distributions distinctes reflétant présumément des affinités spécifiques et des capacités de croissance axonale différentes. En effet, les afférences DA provenant de la substance noire innervent spécifiquement les parties véritablement striatales du greffon (zones immunopositives pour la DARPP-32, "Dopamine and

Adenosine 3', 5'- monophosphate-Regulated PhosphoProtein, 32 000 PM") avec une densité d'innervation similaire à celle retrouvée dans le striatum normal. Dans ce modèle, il a été rapporté que les fibres 5-HT de l'hôte innervent de manière uniforme le transplant [179], tandis que les fibres corticales et thalamiques restent plutôt confinées à sa périphérie [316]. Le tissu striatal greffé ou, plus précisément, les régions véritablement striatales de ces greffes se projettent en retour vers la plupart des cibles normalement innervées par le striatum [316]. Quelques fibres provenant du greffon striatal ont été trouvées jusque dans le noyau entopédunculaire et dans le globus pallidus du rat [316]. Enfin, des études récentes ont permis de mettre en évidence une capacité encore plus grande du tissu striatal fœtal humain à s'intégrer anatomiquement dans le striatum de rats adultes, préalablement lésés à l'acide quinolinique [247, 248].

Les transplants de tissu striatal fœtal peuvent aussi s'intégrer dans le striatum non lésé d'un receveur adulte [179, 196]. Dans cette condition, Lu et coll. [196] ont rapporté que la densité d'innervation 5-HT des transplants striataux est comparable à celle retrouvée dans le striatum normal, alors que Labandeira-Garcia et coll. [179] ont décrit une innervation 5-HT plus faible, avec un gradient de densité décroissant de la périphérie vers le cœur de la greffe.

L'autre modèle expérimental de transplantation utilisé pour ce travail est présentement à l'étude comme approche thérapeutique de la maladie de Parkinson chez l'humain [190]. En effet, on sait que la dégénérescence des neurones DA et des troubles de motricité de type parkinsonien peuvent être reproduits expérimentalement chez l'animal par injection locale (substance noire) ou intraventriculaire de 6-OHDA [331]. La transplantation intrastriatale de tissu mésencéphalique ventral fœtal compense en partie les déficits comportementaux observés chez ces animaux [25, 48, 91]. Des effets bénéfiques, importants mais partiels, sur les fonctions motrices des parkinsoniens opérés ont été observés [191]. Toutefois, les mécanismes par lesquels ces effets s'exercent sont encore mal compris [29]. Il est généralement admis que la présence de cellules DA est essentielle pour corriger les symptômes moteurs parkinsoniens [90]. En effet, le retrait par succion du greffon mésencéphalique implanté dans une cavité corticale [27], ou la destruction de la greffe par injection subséquente de 6-OHDA [92] entraîne la réapparition des déficits comportementaux observés chez des rats adultes préalablement traités à la 6-OHDA, tandis que la transplantation de

tissus fœtaux dépourvus de neurones DA n'a aucun effet bénéfique vis-à-vis de ces déficits [90]. Enfin, certains auteurs ont suggéré que la qualité thérapeutique de la greffe de tissu mésencéphalique serait proportionnelle à la quantité de neurones DA inclus dans le transplant mésencéphalique [175, 235] (voir [154] pour revue).

Plusieurs études ont montré que les terminaisons axonales des neurones DA greffés forment des contacts synaptiques avec les cibles appropriées dans le néostriatum de l'hôte [118, 200, 214, 296, 305]. Cependant, d'après les travaux de Brundin [47], le pourcentage de cellules mésencéphaliques fœtales qui survivent aux procédures de transplantation et deviennent des neurones DA est plutôt faible. Il serait donc raisonnable de penser que la protection de ces neurones, l'augmentation de leur efficacité sécrétrice et une optimisation du réseau de fibres DA dans le striatum dénervé pourraient contribuer à l'amélioration de la thérapie de la maladie de Parkinson par transplantation. C'est dans ce contexte que l'étude réalisée dans le chapitre 4 a été présentée. Cependant, on ne connaît pas encore l'importance que pourraient jouer les connexions venant de l'hôte vers la greffe [29]. Des études ont montré que les greffes intrastriatales de tissu mésencéphalique fœtal reçoivent une innervation modérée du cortex cérébral de l'hôte [88]. Le striatum de l'hôte innerve aussi ces greffes, mais les prolongements axonaux de ces neurones striataux restent confinés à la périphérie des greffes, aussi bien après transplantation chez le rat immature (7-14 jours) que chez l'adulte [56, 88]. Aucune innervation ne provient du thalamus de l'hôte [220], comme on pouvait le prévoir du fait de l'absence d'une projection thalamo-nigrale chez l'animal normal [103]. Enfin, les fibres 5-HT projetant vers le néostriatum de l'hôte n'innervent pratiquement pas les transplants mésencéphaliques, après implantation dans le striatum du rat adulte [88]. Pourtant, l'innervation 5-HT de la substance noire est l'une des plus denses du cerveau [219]. Elle est formée majoritairement collatérales se projetant vers le néostriatum [158, 309].

3: Le système 5-HT innervant les ganglions de la base

3.1: Données anatomo-fonctionnelles

3.1.1: Fonctions

Dérivée du tryptophane, la 5-HT est un neurotransmetteur indolamine monoaminergique intervenant dans le contrôle de nombreuses fonctions cérébrales. On lui a attribué un rôle dans la régulation de plusieurs types

d'activités physiologiques: cycle veille/sommeil [313], thermorégulation, comportements alimentaires [65], activité sexuelle [132], nociception [255], ainsi que dans la modulation de certaines fonctions sensori-motrices [166]. Des désordres neuropsychiatriques tels que les dépressions [213], les troubles obsessionnels compulsifs [159] et l'anxiété [300] ont aussi été associés à des anomalies fonctionnelles de la transmission 5-HT. Enfin, on assiste à une importante déplétion des neurones 5-HT dans la maladie de Parkinson [2], notamment ceux situés au niveau du raphé médian et du raphé obscurus [141].

La 5-HT agit par l'intermédiaire de différentes classes et sous-classes de récepteurs qui se distinguent non seulement par leur pharmacologie et leur structure moléculaire, mais aussi par leur localisation différentielle dans le SNC [240].

3.1.2: Organisation anatomique

Les corps cellulaires à l'origine des projections 5-HT sont localisés au niveau du tronc cérébral, au sein de structures situées le long de l'axe rostro-caudal [165]. Ils peuvent être divisés en deux groupes, supérieur et inférieur ou, respectivement, groupes mésencéphalique et myélocéphalique [165]. Selon la classification originale de Dahlström et Fuxe [67], le système 5-HT est constitué de neuf groupes de neurones numérotés de B1 à B9, coïncidant avec les noyaux du raphé dont la composition cellulaire n'est toutefois que partiellement 5-HT [165]. Cette nomenclature originale a par la suite été légèrement modifiée [165, 303]. C'est en tenant compte de ces changements que nous présenterons les différents noyaux du raphé.

Le groupe inférieur ou myélocéphalique est formé de cinq noyaux: le raphé pallidus (B1), le raphé obscurus (B2), le raphé magnus (B3), le noyau paragentocellulaire (B1/B3) et l'area postrema [165, 303].

Le groupe supérieur ou mésencéphalique est formé de quatre noyaux: le raphé médian caudal et rostral (B5, B8), le raphé dorsal caudal et rostral (B6, B7), le noyau linéaire caudal (B8) et la région supralémniscale (B9) [165, 303].

Le raphé dorsal est le plus gros des noyaux du raphé. Il est situé dans la partie ventrale de la matière grise périaqueducale. Il est composé de plusieurs sous-régions distinguables par la morphologie des neurones 5-HT, leur densité et leurs aires de projection. Le noyau du raphé médian est le second plus gros noyau du raphé. Dans celui-ci, la morphologie des

neurones 5-HT diffère selon leur emplacement, médian ou médio-latéral [303].

Les axones 5-HT innervent la plupart des régions du SNC, de la moelle épinière jusqu'au cortex cérébral en passant par les structures limbiques et les ganglions de la base [292]. Pour l'essentiel, on peut décrire actuellement une voie descendante principale provenant des groupes inférieurs et deux voies ascendantes principales qui proviennent des groupes supérieurs; l'une, dorsale, prend naissance au même niveau rostro-caudal que le *locus caeruleus* et est formée de fibres en provenance des régions latérale et ventromédiane du raphé dorsal alors que l'autre, ventrale, prend naissance au niveau du noyau trochléaire, dans l'ensemble des noyaux du groupe supérieur, mais surtout du raphé dorsal et du raphé médian [165, 239, 303].

La plupart des projections 5-HT sont ipsilatérales et leur organisation indique une encéphalo-topographie rostro-caudale [165]. Elles sont en outre connues pour leur important degré de collatéralisation [165]. Ainsi, les premières études hodologiques ont montré que la majorité des neurones 5-HT du raphé dorsal qui projettent vers la substance noire ont des collatérales innervant le néostriatum [309]. Les neurones 5-HT innervant la substance noire sont principalement localisés dans la partie rostrale du raphé dorsal, tandis que ceux projetant vers le néostriatum se retrouvent à travers tout le raphé dorsal [309]. Lors de cette étude, l'injection de traceurs rétrogrades fluorescents dans le striatum et dans la substance noire a aussi permis de mettre en évidence des neurones simplement marqués qui pourraient donc n'innervent que l'une ou l'autre des deux régions [309]. Par exemple, seul le striatum reçoit des afférences 5-HT en provenance du noyau linéaire caudal [158], ce dernier étant pratiquement confondu avec la partie la plus rostrale du raphé médian [303].

Ce sont ces projections provenant du raphé dorsal et de la partie la plus rostrale du raphé médian et innervant ces deux structures des ganglions de la base que sont le striatum et la substance noire, que nous avons étudiées au cours de ce travail.

3.1.3: Développement et synaptologie de l'innervation 5-HT dans le striatum et dans la substance noire

Le striatum est le plus gros des noyaux formant les ganglions de la base, lesquels représentent une partie du système moteur extra-pyramidal [136]. Il peut être divisé en deux parties, dorsale et ventrale [151]. La partie

ventrale inclut notamment le noyau accumbens et le tubercule olfactif. La partie dorsale comprend les noyaux caudé et putamen qui, chez le rat, ne forment qu'une seule large structure, le néostriatum, traversée par les faisceaux de la capsule interne [135]. Trois genres de cellules ont été décrits dans le néostriatum du rat sur la base de leur taille: ceux de taille moyenne, subdivisés en 4 types (I, II, III, IV) et formant 96% de la population neuronale, les géants et les petits, gliiformes [83]. Le neurotransmetteur prédominant est le GABA (acide gamma amino butyrique). Il est exprimé par pratiquement tous les neurones de projection [136]. Un des outils les plus utilisés pour marquer spécifiquement les neurones du striatum est l'immunohistochimie de la DARPP-32. En effet, cette protéine cytosolique est retrouvée dans les neurones dopaminoceptifs et est particulièrement concentrée dans les neurones du striatum [237]. Le néostriatum est organisé en une mosaïque complexe reflétant de multiples niveaux fonctionnellement distincts [127]. Le premier niveau est déterminé par la ségrégation de deux voies, l'une striato-pallido-nigrale (voie indirecte) et l'autre striato-nigrale (voie directe) [126]. Le deuxième niveau est constitué de deux compartiments recevant des informations d'aires corticales définies [126]. Cette différenciation a initialement été révélée par l'immunohistochimie du récepteur opiacé μ suivie par celle de l'acétylcholinestérase (enzyme de dégradation de l'acétylcholine) et de la calbindine [127]. Certains compartiments, nommés striosomes (ou "patches") et caractérisés par l'absence d'une activité acétylcholinestérasique chez l'adulte coïncident avec la distribution du récepteur μ et modulent les afférences DA du striatum en relation avec les informations motivationnelles du système limbique. D'autres, formant la "matrice", présentent une activité acétylcholinestérasique très importante ainsi qu'une immunoréactivité à la calbindine et régulent plus spécifiquement les paramètres moteurs et sensoriels [136, 153]. Enfin, le troisième niveau suggère un lien entre les fonctions des différentes aires du striatum et les propriétés des aires corticales avec lesquelles elles sont connectées [127].

Chez le rat, c'est à partir du 17ème jour de gestation (E17) que les premières fibres 5-HT pénètrent et traversent l'éminence ganglionnaire du primordium striatal [186]. Toutefois, ces fibres ne deviennent détectables par immunohistochimie de la 5-HT qu'à partir du 14ème jour post-natal (P14) dans le striatum [165]. Des varicosités sont alors visibles et présentes dans

tout le néostriatum. Cependant, la densité d'innervation n'atteint pas encore celle de l'adulte [186].

Les études immunohistochimiques n'ont pas montré, chez le rat adulte, de territoires ou îlot striataux préférentiellement innervés par les fibres 5-HT [186]. Toutefois, une innervation préférentielle a été mise en évidence dans la "matrice" du néostriatum chez les primates adultes [181]. Deux types d'axones 5-HT ont été caractérisés dans le néostriatum du rat: des axones variés fins et, en nombre moindre, des fibres larges en chapelet, provenant respectivement du raphé dorsal et du raphé médian [233]. Dans le néostriatum du rat adulte, les synapses formées par des varicosités axonales 5-HT sont distribuées également entre les épines et les branches dendritiques [286]. Elles sont pratiquement toutes asymétriques, avec une incidence d'environ une synapse pour 10 varicosités [286]. Cette faible incidence synaptique n'est pas liée à la densité d'innervation puisqu'une hyperinnervation expérimentale, induite dans le néostriatum de rats adultes après injection intraventriculaire bilatérale de 6-OHDA chez le rat nouveau-né [291], ne se traduit pas par une modification du pourcentage des varicosités 5-HT synaptiques [79].

La substance noire fait partie du tegmentum mésencéphalique ventral [102, 103]. C'est seulement chez les primates que l'on note la présence de mélanine lui donnant une pigmentation noire typique [102]. La substance noire comprend une partie compacte, une partie réticulée et une partie latérale. La partie compacte ou *pars compacta* est un feuillet constitué de quatre à dix neurones d'épaisseur formant un capuchon sur la partie réticulée ou *pars reticulata*. Celle-ci, de forme plus ovoïde, partage de nombreuses caractéristiques histologiques avec le noyau entopédonculaire (homologue du segment interne du pallidum des primates). Ces deux structures, qui représentent les principales voies de sortie des ganglions de la base, sont souvent considérées comme formant une seule et même entité [151]. Enfin, la partie latérale ou *pars lateralis*, formée d'un petit bouquet de cellules, est une extension de la *pars compacta* [102]. Les neurones situés dans la substance noire ont été catégorisés selon qu'ils expriment ou non la DA et selon leur morphologie [102]. Les neurones DA sont localisés principalement dans l'aire tegmentaire ventrale et dans la substance noire *pars compacta* [102]. Certains neurones de la *pars compacta* et de l'aire tegmentaire ventrale adjacente expriment la cholécystokinine [102]. Ceux

situés dans la *pars reticulata* expriment le GABA [61] alors que quelques neurones de la *pars lateralis* expriment la dynorphine [102].

La substance noire du rat reçoit une innervation 5-HT relativement forte chez l'adulte, qui se développe au cours des 2 premières semaines après la naissance [165]. Une étude récente de notre laboratoire montre qu'il s'agit d'une des innervation 5-HT les plus denses du cerveau, dont l'incidence synaptique est de 100% dans la *pars reticulata* et de 50% dans la *pars compacta* [218].

4: Plasticité anatomique des neurones 5-HT

Il a été proposé que le potentiel de plasticité d'un système neuronal dépende de son niveau d'organisation anatomique. Ainsi, d'après l'hypothèse de Sotelo, les systèmes organisés avec des projections dites "point-par-point" (cas de la majorité des systèmes sensoriels et moteurs), par lesquelles chaque neurone entre en contact synaptique avec un nombre relativement restreint de cibles bien précises, sont considérés comme étant peu plastiques [287, 288]. En revanche, les systèmes dits "à projections diffuses", tels que les systèmes noradrénergique, cholinergique, 5-HT ou DA, qui interviennent plutôt comme régulateurs ou modulateurs de l'activité neuronale, présenteraient d'importantes capacités de réponse plastique après lésion [80]. Dans ce type de système, un nombre réduit de neurones, situés dans des noyaux bien circonscrits, émet des projections qui se distribuent dans de vastes territoires terminaux, grâce à des arborisations axonales très étendues, qui peuvent agir de manière paracrine en l'absence de synapses morphologiquement différenciées [287]. L'étude de la plasticité anatomique des neurones 5-HT repose sur l'utilisation de divers modèles de lésion ou de transplantation neurale.

4.1: Données obtenues après lésions

Les premiers résultats expérimentaux montrant une plasticité anatomique neuronale chez les mammifères ont été obtenus par l'étude des réponses du SNC à des lésions [63, 64]. Pour le système 5-HT, la 5,6- et la 5,7-dihydroxytryptamine (5,6- ou 5,7-DHT), analogues cytotoxiques de la 5-HT, ont été largement utilisées dans ce genre d'étude. Leur administration par voie intracisternale ou locale entraîne en effet une axotomie dite "chimique", sans formation de cicatrice gliale [14].

Les études de diverses structures cérébrales, après une telle dénervation neurotoxique, ont clairement établi l'existence d'une réinnervation 5-HT

spontanée (pour revue, voir [31, 40]). Par exemple, l'administration intracisternale de 5,7-DHT chez des rats adultes produit une axotomie proximale aux corps cellulaires 5-HT qui est suivie d'une réinnervation de tous les niveaux rostro-caudaux de la moelle épinière, après 6 à 18 mois [31]. Trente-cinq jours après la disparition complète de l'innervation 5-HT de l'olive inférieure, provoquée par l'administration intraventriculaire de 5,6-DHT, une réinnervation 5-HT de densité comparable à l'innervation normale suivie, 7 mois après, par une hyperinnervation confinée uniquement à l'olive inférieure a été mise en évidence [36]. Enfin, l'injection unilatérale de 5,7-DHT dans la partie dorsale du faisceau télencéphalique médian de rats adultes induit la disparition quasi complète de l'innervation 5-HT de l'hypothalamus mais celle-ci est suivie, au bout de 8 semaines, d'un bourgeonnement des fibres 5-HT environnantes qui produisent même une hyperinnervation de certains noyaux hypothalamiques (latéral et dorsomédian) [116] (pour revue voir [165]).

Ces trois exemples ont permis de mettre en relief l'aptitude des fibres 5-HT à régénérer après une lésion chez l'animal adulte.

Chez le nouveau-né, l'injection sous-cutanée de 5,7-DHT produit une dénervation 5-HT complète de la moelle épinière. Celle-ci est entièrement réinnervée par les fibres 5-HT dans les 8 semaines qui suivent la lésion [131]. Par ailleurs, la lésion d'un groupe de neurones non 5-HT peut aussi provoquer des changements dans l'innervation 5-HT. Ainsi, l'injection intraventriculaire bilatérale de 6-OHDA chez le nouveau-né produit une perte de 99% de la DA endogène, ainsi que la disparition de l'immunoréactivité DA au niveau du striatum. Cette déplétion s'accompagne d'une hyperinnervation 5-HT qui persiste à l'âge adulte [79, 291].

Les exemples ci-dessus et plusieurs autres études du même type ont permis de constater qu'il existe un haut degré de plasticité anatomique des neurones 5-HT dans le SNC des mammifères adultes, même si la régénération axonale est plus importante dans le SNC de l'animal immature. Il a été proposé que l'un des facteurs qui déterminent les potentialités de réinnervation post-lésionnelle d'un territoire donné soit lié à la nature des relations intercellulaires normalement établies par les afférences 5-HT dans le territoire en question [36]. En effet, plusieurs résultats expérimentaux indiquent que les régions propices à une hyperinnervation 5-HT post-lésionnelle seraient celles où les fibres 5-HT forment peu de relations synaptiques morphologiquement définies. Cela est

effectivement le cas de l'olive inférieure [36], de l'hippocampe [328] et du noyau dorso-médian de l'hypothalamus [116]. Inversement, des régions telles que l'organe sous-commissural (OSC) [321], l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) [263] ou le noyau suprachiasmatique (NSC) [39], qui reçoivent une innervation 5-HT majoritairement synaptique, ne sont que partiellement réinnervées (NSC, OVLT), voire pas réinnervées du tout (OSC) après dénervation par la 5,7-DHT. L'ensemble de ces observations est en accord avec l'hypothèse de Wiklund selon laquelle les terminaisons non synaptiques seraient les plus susceptibles d'être rétablies après lésion neurotoxique (voir [321]). Cependant, certains résultats expérimentaux suggèrent que d'autres facteurs, vraisemblablement de nature trophique, sont également fondamentaux dans les processus de réinnervation 5-HT [68].

4.2: Données obtenues après transplantation neurale

Pour étudier les phénomènes de plasticité neuronale, une approche alternative aux lésions est la transplantation neurale de tissu nerveux fœtal. Celle-ci permet de suivre l'intégration anatomique de la greffe dans le cerveau receveur et d'étudier aussi bien les projections de l'hôte, adulte ou immature, que celles provenant des neurones greffés.

4.2.1: Innervation 5-HT du tissu hôte par la greffe

La transplantation de neurones embryonnaires dans le SNC adulte permet d'analyser l'influence de l'environnement cérébral adulte sur la croissance axonale des neurones fœtaux.

Ainsi, des neurones 5-HT fœtaux transplantés chez des rats adultes dans différentes régions du SNC telles l'hippocampe [35, 69, 114], la moelle épinière [115, 207, 244], l'hypothalamus [41, 68, 197], et le striatum [113] sont capables d'innover le tissu cible et de reformer des contacts synaptiques. Toutefois, et conformément à ce qui a été souligné précédemment pour la réinnervation spontanée après lésion, l'étendue de la réinnervation 5-HT post-greffe se révèle fortement dépendante de la cible. Par exemple, la transplantation de neurones 5-HT fœtaux dans l'hypothalamus basal de rats adultes dont l'innervation 5-HT intrinsèque a été préalablement détruite par la 5,7-DHT produit une innervation toujours incomplète du noyau suprachiasmatique [68]. Par contraste, on observe une hyperinnervation du noyau supraoptique voisin [68]. Des patterns d'innervation plus dense que la normale ont également été décrits après implantation de neurones 5-HT dans d'autres régions, notamment le striatum [113] et l'hippocampe [69, 114].

D'autres travaux ont aussi montré que la densité de réinnervation d'une structure donnée est également liée à l'origine micro-régionale, au niveau des noyaux du raphé, des neurones 5-HT transplantés. Il a ainsi été rapporté que, quelle que soit l'origine du transplant (raphé mésencéphalique ou myélocéphalique), la densité des fibres réinnervant la moelle épinière est très élevée. Cependant, seuls les transplants des noyaux 5-HT qui innervent normalement cette structure sont capables de d'innervent les motoneurones de la corne ventrale [115]. D'autres études basées sur des dissections plus sélectives du raphé myélocéphalique ont mis en évidence une microspécificité régionale très fine des transplants 5-HT dans la réinnervation de la moelle épinière [252].

Dans l'hippocampe, la transplantation de neurones 5-HT entraîne une hyperinnervation du gyrus dentelé, indépendamment de l'origine mésencéphalique ou myélocéphalique des cellules greffées [114]. En revanche, dans le striatum de l'hôte adulte traité à la 5,7-DHT, une greffe de raphé mésencéphalique induit une réinnervation 5-HT plus importante qu'une greffe de raphé myélocéphalique [113]. On pourrait alors supposer qu'il existe dans le striatum des facteurs trophiques plus spécifiques pour certains types de neurones 5-HT, selon que ceux-ci appartiennent au raphé mésencéphalique ou myélocéphalique.

On a rapporté que la transplantation de raphé embryonnaire chez des rats adultes soumis non plus à une dénervation 5-HT mais à une dénervation DA par la 6-OHDA produit une hyperinnervation 5-HT du néostriatum de l'hôte indépendamment de l'origine des neurones greffés (raphé mésencéphalique ou myélocéphalique) [299]. Néanmoins, la greffe de raphé mésencéphalique dans le striatum d'un rat adulte, sans lésion préalable, ne produit pas d'hyperinnervation [299]. On pourrait alors supposer que la dégénérescence des fibres DA striatales induit la production d'un facteur stimulant la croissance de fibres 5-HT fœtales (voir aussi [79]).

Ces études ont mis en évidence les conditions déterminant la capacité des neurones 5-HT fœtaux à innervent le tissu hôte après implantation. Ainsi, la pousse des fibres 5-HT est modulée à la fois par l'origine micro-régionale des neurones 5-HT greffés et par la région neuroanatomique ciblée.

4.2.2: Innervation 5-HT des greffes par les neurones de l'hôte

On peut aussi étudier la plasticité anatomique et le potentiel de croissance axonale des neurones 5-HT **adultes** en examinant les projections

axonales des neurones 5-HT de l'hôte dans des greffes de tissu nerveux fœtal initialement dépourvues de tels neurones.

Les fibres 5-HT de l'hôte sont capables d'innervier des greffes homotypiques de moelle épinière fœtale [232], d'hypothalamus [167] ou de thalamus [231] réalisées chez le rat adulte, ainsi que des greffes homotypiques de tissu cérébelleux embryonnaire normal faites chez la souris mutante *pcd* adulte ("Purkinje cell degeneration") [306]. Par ailleurs, des greffes de tissu hippocampique fœtal implanté dans le ventricule latéral de souris adultes sont innervées par des fibres 5-HT provenant de l'hôte, selon un gradient décroissant de densité d'innervation à partir de la frontière greffe-tissu de l'hôte [8]. Les fibres 5-HT innervent de manière uniforme un transplant homotypique de tissu striatal fœtal chez le rat dont la structure homologue a été préalablement détruite par des acides aminés excitateurs [179]. D'autres études ont rapporté que la densité d'innervation 5-HT de transplants striataux dans le striatum non lésé est comparable à celle retrouvée dans le striatum de l'hôte [196], alors que Labandeira-Garcia et al. [179] ont décrit une innervation 5-HT plus faible, avec un gradient de densité décroissant de la périphérie vers le cœur de la greffe. Enfin, les fibres 5-HT n'innervent pratiquement pas les transplants mésencéphaliques, après implantation dans le striatum du rat adulte [88]. Pourtant, l'innervation de la substance noire est une des plus denses du cerveau [218]. De plus, les neurones 5-HT qui innervent normalement la substance noire ont aussi des collatérales vers le néostriatum [309]. En outre, ces mêmes axones 5-HT ont la capacité d'innervier le tissu cortical ou striatal fœtal implanté dans le striatum non lésé de rats adultes [196]. Il semble donc que les axones 5-HT qui innervent le néostriatum adulte aient une affinité différentielle pour les transplants de tissu nerveux fœtal selon leur provenance anatomique.

Pour expliquer l'affinité différentielle des axones 5-HT pour différentes régions du SNC fœtal, on peut envisager une implication de molécules inhibitrices ou promotrices de la croissance des fibres 5-HT. Ces molécules seraient exprimées par le transplant selon une spécificité liée à son origine neuroanatomique. Cette spécificité anatomique pourrait même être liée à une hétérogénéité régionale des astrocytes que l'on sait effectivement produire des molécules ayant une influence sur l'élongation et/ou sur le guidage axonaux [46, 206, 278, 310]. On peut aussi penser à l'influence de la cicatrice gliale induite par la transplantation intracérébrale et formée

d'astrocytes réactifs, susceptibles d'influer sur la croissance des axones 5-HT à travers l'interface hôte/greffe [1].

5: Influence des astrocytes sur la plasticité anatomique neuronale

Les astrocytes ne constituent pas un type cellulaire unique mais plutôt une famille de cellules présentant des phénotypes divers avec des spécificités régionales [143, 182, 246]. Généralement, on établit une distinction d'ordre morphologique entre les astrocytes fibreux, localisés préférentiellement dans la substance blanche et ayant des prolongements longs, peu branchés et les astrocytes protoplasmiques, situés plutôt dans la substance grise et présentant des prolongements plus courts et ramifiés [142]. Les astrocytes peuvent aussi être différenciés selon des critères fonctionnels. Ainsi, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence deux lignées distinctes d'astrocytes [5, 251]. Les astrocytes de type-1, impliqués dans la relation entre les neurones et les vaisseaux sanguins, et les astrocytes de type-2 qui ont un rôle dans la coopération fonctionnelle avec les neurones [322].

La famille des astrocytes comprend aussi la glie radiaire, première forme de cellule gliale qui apparaît lors de la formation du SNC [253]. Probable précurseur des astrocytes fibreux et protoplasmiques [183], elle ne persiste pas à l'âge adulte [269], sauf dans le cervelet (glie de Bergmann) [217] et dans la rétine (cellules de Müller) [224, 279]. Enfin, mentionnons les cellules épendymaires, parmi lesquelles on distingue les épendymocytes typiques et les tanocytes des régions neuro-hémales, qui forment un épithélium séparant le tissu nerveux du liquide céphalo-rachidien [256], les pinéaloctes de la glande pinéale [238] et les pituicytes de la post-hypophyse [147].

Lors d'un traumatisme dans le SNC, les astrocytes réagissent en proliférant, en s'hypertrophiant et en augmentant fortement leur concentration en GFAP ("Glial Fibrillary Acidic Protein", constituant essentiel des gliofilaments). Cette réaction à une lésion est nommée gliose. Ces astrocytes sont dits réactifs et forment alors une nouvelle population morphologiquement différente [201].

5.1: Rôles promoteurs et inhibiteurs des astrocytes sur la croissance axonale

De nombreux travaux *in vitro* ont mis en évidence la capacité des astrocytes à favoriser la croissance neuronale [104-106]. En effet, l'adhérence et la croissance neuritique de neurones embryonnaires provenant de

différentes régions du SNC est meilleure lors de la mise en culture sur une couche de ces cellules gliales [229]. Cette facilitation pourrait être due à la capacité des astrocytes à exprimer des molécules de la matrice extracellulaire, comme la laminine ou la fibronectine [187, 242], ainsi que des molécules d'adhérence cellulaire telles la N-cadhérine [223] ou la N-CAM [228]. L'idée d'une influence facilitatrice des astrocytes sur la croissance neuritique doit toutefois être relativisée car des cultures d'astrocytes en trois dimensions, plus apparentés à la situation *in vivo*, sont moins favorables à la pousse axonale de neurones post-nataux que les cultures à deux dimensions [107].

Les astrocytes peuvent donc avoir une influence positive ou négative sur la croissance neuritique. Cette dualité peut être liée à plusieurs facteurs. Par exemple, les cultures d'astrocytes peuvent présenter des zones promotrices et d'autres inhibitrices de la croissance des axones. Les zones favorisant la pousse axonale sont constituées d'astrocytes aplatis ("flat"), alors que celles qui sont inhibitrices contiennent des astrocytes de forme plus globuleuse ("rocky"). L'étude immunocytochimique de ces derniers a permis de mettre en évidence une forte expression de ténascine [138], une molécule de la matrice extracellulaire qui peut inhiber la croissance axonale [46, 101, 314]. L'expression de cette molécule est hautement régulée et elle disparaît avec la maturation du système nerveux, sauf dans les cellules gliales de Bergmann et dans celles du système olfactif [46].

5.2: Relations entre l'état de maturité des astrocytes et leur effet sur la croissance axonale

L'état de maturité des astrocytes peut jouer un rôle important dans la croissance des axones. Les astrocytes matures mis en culture sont en effet moins favorables à une pousse neuritique que les astrocytes fœtaux ou néonataux. Cette observation a été corrélée à une perte d'expression, à la surface des astrocytes matures, de molécules promotrices de la croissance axonale telles que la N-CAM, la G4/L1 ou la laminine. Cela a été démontré *in vitro* [283] comme *in vivo* [280]. La capacité des astrocytes immatures à favoriser la pousse neuritique a aussi été mise en évidence par Fawcett dans son modèle tridimensionnel de culture d'astrocytes [107]. *In vivo*, l'implantation d'astrocytes immatures stimule la régénération d'axones chez des souris nouveau-nées dont le corps calleux a été lésé [282] et induit une remyélinisation des axones en croissance chez des rats adultes dont le

fornix a été sectionné [323]. La remyélinisation se ferait par l'intermédiaire des oligodendrocytes de l'hôte réactivés par la transplantation d'astrocytes de type-1 [117]. Enfin, la transplantation d'astrocytes immatures dans le cortex visuel de chats adultes ayant été privés unilatéralement de lumière induit une nouvelle plasticité neuroanatomique de la dominance oculaire [222]. Cette permissivité sur la croissance axonale a aussi été retrouvée lors de l'ajout d'astrocytes immatures dans un tube siliconé réunissant les deux bouts sectionnés du nerf sciatique de rats adultes [169]. Cependant, une étude plus récente a montré que l'addition d'astrocytes immatures aussi bien que matures dans une prothèse tubulaire semi-perméable rattachée aux deux bouts d'un nerf sciatique sectionné ne favorise pas sa régénération, celle-ci ne se produisant que si l'on ajoute des cellules de Schwann [139].

5.3: Impact des astrocytes greffés sur la récupération fonctionnelle

Si les astrocytes agissent sur la plasticité anatomique des neurones en permettant dans certains cas la pousse neuritique, on pourrait s'attendre à ce qu'ils puissent aussi favoriser la récupération fonctionnelle. Des études *in vivo* ont effectivement montré que des greffes d'astrocytes permettent dans certains cas de compenser des déficits comportementaux induits par des lésions. Par exemple, la transplantation intracorticale d'astrocytes en culture provenant du cortex cérébral corrige des déficits comportementaux induits par des lésions mécaniques du cortex frontal [171]. Cependant, aucune restauration de déficits comportementaux dûs à une lésion du striatum par l'acide kaïnique chez l'adulte n'a été observée après greffe intrastriatale d'astrocytes provenant du striatum [195]. Pareillement, des greffes d'astrocytes dans l'hippocampe lésé par l'acide iboténique n'induisent aucun effet positif sur le comportement [172]. La différence de récupération comportementale entre la première expérience et les suivantes est apparemment due au type et à l'étendue de la lésion. En effet, Kesslak (1986) a réalisé une lésion mécanique partielle du néocortex alors que les autres auteurs ont utilisé un agent excitotoxique produisant des lésions extensives des structures ciblées et des déficits fonctionnels à long terme qui ne pourraient être compensés seulement par des astrocytes [195].

5.4: Influence des astrocytes réactifs et de la cicatrice gliale sur la croissance axonale

Les astrocytes réagissent à tout traumatisme, qu'il s'agisse de lésions mécaniques ou toxiques ou encore de maladies neurodégénératives [95], par

des modifications biochimiques dont la plus évidente est une synthèse accrue de la GFAP, suivies d'une hypertrophie du corps cellulaire, d'une augmentation de leurs prolongements et dans certains cas, d'une prolifération [146, 201]. Cette réaction astrocytaire aux traumatismes est appelée **gliose** [230].

Différentes études ont mis en évidence, lors des premières phases de la réactivité astrocytaire, la présence transitoire de facteurs neurotrophiques au niveau du site de lésion [161, 225]. La plupart de ces facteurs sont faiblement exprimés ou même indétectables dans les astrocytes adultes normaux [261]. Néanmoins, certains peuvent apparaître ou être ré-exprimés à la hausse dans les astrocytes réactifs adultes [260]. Cependant, leur expression est modulée selon le type ou le site de lésion [275]. Par exemple, une lésion locale du cortex stimule l'expression du facteur de croissance fibroblastique de type basique (bFGF) [111], ainsi que celle du facteur de croissance transformant de type $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) [194], alors qu'une lésion électrolytique de la voie septo-hippocampique augmente l'expression du facteur de croissance du nerf (NGF) [234]. Les astrocytes réactifs entourant une greffe intrastriatale expriment le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) [284]. Enfin, les taux d'ARNm du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), normalement bas dans les astrocytes normaux, sont augmentés lors d'une lésion par aspiration de l'hippocampe [161]. Les astrocytes réactifs ont aussi la capacité d'exprimer des molécules promotrices de la croissance axonale comme la laminine [188], la fibronectine [211] ou des protéoglycanes héparane-sulfate [89]. Toutefois, l'expression *in vivo* de ces molécules se produit dans des astrocytes réactifs éloignés du site de lésion et diminue au fur et à mesure que l'on approche du site lésé, ce qui est corrélé avec une perte de la pousse axonale et avec une augmentation des molécules inhibitrices [211]. D'autres études ont mis en évidence des molécules comme la cytotactine/ténascine [99], ou des protéoglycanes chondroïtine-sulfate ou kératane-sulfate [60] pouvant inhiber *in vitro* la croissance neuritique (pour revue voir [274]). Ces molécules sont exprimées transitoirement par les astrocytes normaux lors du développement du système nerveux [46] et peuvent être ré-exprimées par les astrocytes réactifs [210, 211].

La transplantation intracérébrale provoque elle aussi une lésion au niveau du site d'implantation et induit dans la plupart des cas une réaction astrocytaire [1]. Les astrocytes réactifs forment éventuellement une **cicatrice**

gliale qui peut constituer une barrière mécanique ou chimique entre le transplant et le tissu environnant de l'hôte [193]. Dans certains cas, cette barrière peut être infranchissable pour les axones provenant de l'hôte [282]. Les astrocytes réactifs formant la cicatrice gliale pourraient exprimer des molécules inhibitrices de la croissance axonale et donc être impliqués dans l'incapacité des axones à franchir la cicatrice [210, 211]. Cependant, l'effet inhibiteur des astrocytes réactifs peut varier suivant leur état de maturité. En effet, ceux provenant du cortex lésé d'un rat nouveau-né peuvent supporter la croissance de neurites *in vitro* contrairement à ceux prélevés chez un animal adulte [125]. *In vivo*, la formation d'une cicatrice gliale chez un rat adulte est pratiquement supprimée par l'implantation d'astrocytes immatures de type-1 [281], ce qui permet alors une régénération axonale [282].

L'analyse des constituants cellulaires de la cicatrice gliale montre que celle-ci est une mixture hétérogène formée aussi d'oligodendrocytes, de microglie et de macrophages [146]. Ces autres types cellulaires pourraient aussi exercer une influence sur la croissance axonale.

Si la composition cellulaire et moléculaire de la cicatrice gliale varie avec le type de lésion [108] et avec l'âge de l'animal [307], sa formation après transplantation intracérébrale peut aussi varier suivant le type ou la technique de greffe. Par exemple, il a été rapporté que la transplantation intrastriatale de tissu nerveux mésencéphalique chez le rat adulte induit une cicatrice gliale éphémère [1], alors qu'une greffe homotypique de tissu striatal fœtal provoquerait au contraire la formation d'une cicatrice gliale persistante, provenant en partie du tissu greffé [329]. Cependant, la présence, permanente ou transitoire, d'une cicatrice gliale ne représente pas une barrière absolument infranchissable pour les afférences ou efférences du greffon. Ainsi, un greffon striatal même entouré d'une cicatrice gliale peut être innervé par les afférences 5-HT et DA de l'hôte et émettre en retour des efférences vers les cibles de l'hôte normalement innervées par le striatum [316]. De même, la cicatrice gliale transitoirement formée lors d'une greffe de tissu mésencéphalique fœtal chez le rat adulte n'empêche pas la croissance des axones DA de la greffe vers le néostriatum de l'hôte [84], ou celle des axones du cortex frontal de l'hôte vers le transplant [88]. L'influence de la cicatrice gliale sur la croissance des axones fœtaux ou adultes reste donc mal comprise.

6: Objectifs du présent travail

Notre travail avait pour but d'identifier et de caractériser les conditions déterminant la croissance axonale et la plasticité des axones 5-HT du néostriatum à l'aide de transplants intrastriataux homo- ou hétérotypiques.

Pour comprendre l'influence de l'âge du receveur et de la provenance du tissu greffé sur la croissance des fibres 5-HT, nous avons effectué des greffes intrastriatales de tissu mésencéphalique ou striatal fœtal chez des rats immatures, juvéniles ou adultes. Les résultats indiquent, d'une part que la capacité des axones 5-HT d'innover les greffes diminue en fonction de l'âge du receveur et, d'autre part, que les fibres 5-HT ont une affinité différente pour le tissu nerveux transplanté à partir de différentes régions cérébrales (Chapitre 2). Afin d'identifier les raisons de cette différence d'affinité, nous avons étudié l'influence d'astrocytes cultivés provenant du mésencéphale, du striatum ou du cortex cérébral, co-greffés avec du tissu mésencéphalique fœtal chez le rat adulte (Chapitre 3). Les premiers résultats indiquent que les astrocytes du striatum et du cortex mais pas ceux du mésencéphale favorisent l'innervation 5-HT du tissu mésencéphalique. Ces expériences nous ont de plus permis d'observer un effet trophique des astrocytes provenant du striatum sur les neurones DA de la greffe (Chapitre 4). Enfin, nous avons voulu savoir si la cicatrice gliale, conséquence de la procédure d'implantation, avait une influence sur la croissance des fibres 5-HT dans le tissu mésencéphalique ou striatal fœtal greffé dans le striatum de rats nouveau-nés, juvéniles ou adultes (Chapitre 5). Ces dernières expériences ont permis de montrer que la densité de la cicatrice gliale dépend elle aussi, de l'âge du receveur au moment de la transplantation, de même que de l'origine anatomique du tissu nerveux greffé.

Chapitres 2-5: RÉSULTATS

Chapitre 2:

**INNERVATION DE GREFFES INTRASTRIATALES PAR LES FIBRES 5-HT DE L'HÔTE
SELON L'ÂGE DE CELUI-CI ET L'ORIGINE ANATOMIQUE DU TISSU GREFFÉ**

**Host serotonin axons innervate intrastriatal ventral mesencephalic grafts
after implantation in newborn rats**

by

Abderhamane Mounir, Myriem Chkirate, Annie Vallée, **Philippe Pierret**,
Michel Geffard, Guy Doucet

European Journal of Neuroscience, 6, pp. 1307-1315, 1994

et

**Serotonin axons of the neostriatum show a higher affinity for striatal than
for ventral mesencephalic transplants: a quantitative study in adult and
immature recipient rats**

by

Philippe Pierret, Annie Vallée, Olivier Bosler, Marc Dorais, Hakima
Moukhles, Roya Abbaszadeh, Yves Lepage, Guy Doucet

Accepté pour publication à:

Experimental Neurology

**HOST SEROTONIN AXONS INNERVATE INTRASTRIATAL VENTRAL
MESENCEPHALIC GRAFTS AFTER IMPLANTATION IN NEWBORN
RATS**

by

**A. MOUNIR, M. CHKIRATE, A. VALLÉE, P. PIERRET, M. GEFFARD¹,
G. DOUCET**

Département de pathologie and Centre de recherche en sciences
neurologiques, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal,
Québec, Canada

¹Laboratoire d'Immunologie et Pathologie, Université de Bordeaux II,
Bordeaux, France

Key words: axon guidance, transplantation, development, substantia nigra,
immunocytochemistry

Abstract

This study investigated the potential of immature and adult serotonin (5-HT) neurons for axonal growth into intrastriatal grafts of ventral mesencephalic tissue. Implantation of dissociated fetal (embryonic days 14-15) ventral mesencephalic tissue was carried out in immature [postnatal days (P) 5-14] and adult rat neostriatum. The brains were processed 2 - 6 months later for dopamine and 5-HT immunocytochemistry. A few grafts implanted into adult and P7 recipients contained small numbers of cotransplanted 5-HT cell bodies. These also displayed a rich network of 5-HT axons, even in adult rats prelesioned with 5,7-dihydroxytryptamine, indicating the graft origin of these axons. All other grafts were totally devoid of 5-HT cell bodies. After implantation in adults, such grafts contained rare 5-HT axons. In contrast, in P5 - P7 recipients, they displayed many 5-HT fibres, which were uniformly distributed. Such was no longer the case after implantation in P14 recipients, which showed minimal 5-HT innervation, as in adult recipients. Processing of naïve rat brain at different ages for 5-HT immunocytochemistry showed that 5-HT axons were still clearly less numerous in the neostriatum at P21 than in adults, whereas in the substantia nigra the 5-HT innervation developed more rapidly and was comparable, at P21, to that of adults. It was concluded that 5-HT axons are able to grow into ventral mesencephalic grafts, but mainly at the fetal stage and with decreasing capacity after birth. Since 5-HT axons are still normally growing in the developing striatum beyond P21, it appears that their inability to innervate mesencephalic grafts after P14 is not the result of a developmental decrease in growth capacity. Rather, the better temporal correlation with the maturation of the 5-HT innervation in the substantia nigra suggests that this inability reflects an ontogenic change in the affinity of these axons for nigral tissue.

INTRODUCTION

Serotonin (5-HT) neurons of the adult as well as the neonatal mammalian CNS are capable of considerable axonal growth following brain lesions, as demonstrated in several experimental models (e.g. Wiklund and Bjorklund, 1980; Frankfurt and Beaudet, 1987; Polistina et al., 1990; Bosler et al., 1992; Descarries et al., 1992; for a review see Bjorklund et al., 1981). Adult 5-HT neurons also show a propensity to innervate homo- or heterotypic transplants of fetal CNS in the adult CNS (e.g. Azmitia et al., 1981; Nothias et al., 1988, 1990; Labandeira-Garcia et al., 1991; Lu et al., 1991; Triarhou et al., 1992). Yet, when implanted into the adult rat striatum, grafts of fetal ventral mesencephalic tissue receive a very scant 5-HT innervation from the host (Doucet et al., 1989).

Few studies have compared the 5-HT innervation of grafts after implantation into immature versus adult rats. After homotypic transplantation into the transected spinal cord, 5-HT innervation of grafts was reported to be more profuse following implantation in newborn than in adult rats (Bregman, 1987). The present study was therefore undertaken to determine whether, after transplantation into the neostriatum of immature rats compared to adults, neonatal 5-HT neurons would show greater capacity than adult ones to elongate their axons into a graft of fetal ventral mesencephalic tissue. Our results show that such a graft can be 5-HT-innervated only by cotransplanted fetal 5-HT neurons or by early postnatal 5-HT neurons of the host. There is almost no 5-HT innervation of the graft after implantation in rats older than 14 days, even though the developmental growth period of host 5-HT axons in the neostriatum extends beyond 21 days.

Preliminary data from these experiments have previously been published in abstract form (Doucet et al., 1992a, b).

MATERIALS AND METHODS

Outline

In order to assess the 5-HT innervation of grafts implanted in adult versus immature hosts, fetal ventral mesencephalic tissue was implanted into the neostriatum of postnatal day 5 (P5), P7, P12, P14 and adult rats. Experiments were also carried out so as to be able to distinguish the growth of 5-HT axons from host and graft origin. First, to avoid the cografting of fetal 5-HT neurons, the dissection was restricted to the rostral two-thirds of the fetal ventral mesencephalon, and this tissue was treated with 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) before implantation into the neostriatum of adult or immature (P5—P14) rats. Second, ventral mesencephalic tissue containing a small number of fetal 5-HT neurons was implanted in adult rats previously lesioned with 5,7-DHT to eliminate the host 5-HT innervation. In such cases, dissection of fetal tissue was extended to include slightly more caudal mesencephalic areas containing 5-HT neurons and the tissue was not treated with 5,7-DHT. In addition, 5-HT innervation of the grafts was examined in animals in which 5-HT- hyperinnervation was induced in neostriatum by neonatal administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Descarries et al., 1992). Other studies (Snyder-Keller et al., 1989; Abrous et al., 1993) have indeed shown that grafts of ventral mesencephalic tissue implanted shortly after the neonatal lesion would not prevent the 5-HT hyperinnervation of the neostriatum. It was thus of interest to see whether this stimulation of 5-HT axonal growth in the neostriatum would promote the 5-HT innervation of intrastriatal grafts.

Lastly, normal rat brains were perfused at P7, P14, P21 and at the adult stage, and processed for 5-HT immunocytochemistry to see if the critical age of the recipient beyond which 5-HT axons fail to innervate ventral mesencephalic grafts correlated with the normal maturation of the 5-HT innervations in the neostriatum or substantia nigra.

Experimental animals

Fifty-seven Sprague—Dawley rats of both sexes were included in this study: 42 rats were implanted with fetal ventral mesencephalic tissue at perinatal ages or as adults (Table 1) and 15 were untreated.

Adult 5, 7-DHT lesion of nucleus raphe dorsalis

Seven adult rats (six females and one male) weighing 200-250 g, were subjected to a unilateral cerebroventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine creatinine sulphate (5,7-DHT, 200 μ g/20 μ l, free base) 1 h after intraperitoneal administration of desmethyylimipramine (15 mg/kg) and under ketamine/xylazine anaesthesia (60 and 7.5 mg/kg respectively) (Jonsson, 1983). Completeness of these lesions was attested by the total bilateral depletion of host 5-HT-immunoreactive fibres in the cortex, septum and striatum. Only occasional 5-HT-immunopositive fibres were seen in the ventral striatum of these animals. In cases where grafts contained some 5-HT cell bodies, success of the lesion was confirmed by looking at the contralateral striatum, cortex, septum and areas of the ipsilateral forebrain distal from the graft, which were all totally depleted of 5-HT-immunoreactive fibres. Moreover, very few 5-HT immunopositive cell bodies were detected in the dorsal raphe of these animals, while the median raphe appeared to be spared (Fig. 2A).

Adult 6-OHDA lesion of substantia nigra

In five adult female rats (200-250 g), 6-OHDA (3 mg/ml free base) was injected unilaterally, under ketamine/xylazine anaesthesia, as described previously (Doucet et al., 1989). The 6-OHDA-lesioned, grafted rats showed distributions of dopamine fibres consistent with successful lesions: dopamine-immunopositive axons were present only in host striatal tissue adjacent to the graft, and the extent of dopamine innervation correlated with graft size, showing decreasing density with increasing distance from the graft (Doucet et al., 1990). The dopamine innervation of the olfactory tubercles was occasionally spared.

All rats that were lesioned with 5,7-DHT or 6-OHDA as adults underwent transplantation 2 weeks later, together with eight unlesioned littermates.

Neonatal 6-OHDA lesion

Eight newborn rats of both sexes (P3) were anaesthetized with ether, cooled on ice, and then submitted to bilateral cerebroventricular injection of 6-OHDA, 1 h after administration of desmethyylimipramine (Descarries et al., 1992). The pups were returned to their mother and their intact littermates ($n = 15$) until transplantation 2-11 days later (at P5-P14). Such rats showed complete bilateral elimination of dopamine immunopositive fibres in the

neostriatum, consistent with previous reports (e.g. Descarries et al., 1992). Only a few dopamine neurons remained in the substantia nigra of these animals, while the ventral tegmental area was relatively spared. When successful grafts were present, only striatal areas ipsilateral to the graft contained dopamine-immunopositive fibres. There was clear 5-HT-hyperinnervation of neostriatum in these rats, as also reported previously (e.g. Descarries et al., 1992).

Transplantation procedure

Cell aggregate suspensions of ventral mesencephalon were prepared from E14-E15 rat fetuses (crown-rump length, 12-14 mm) and grafted according to the technique of Björklund et al. (1983). In all cases (except for transplantation in 5,7-DHT-lesioned rats; see Outline above), the dissected tissue was exposed to 5,7-DHT (Doucet et al., 1989). In rats aged P5-P7, implantation was done after anaesthesia with ether and cooling on ice, while older rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol diluted to 8 mg/ml, 60 mg/kg). The cell suspension was injected 1.0 mm anterior to bregma, 2.5 mm to the right and at 3.5 and 4.0 mm below dura in immature rats, and 1.0 mm anterior to bregma, 3.0 mm to the right and at 4.1 and 5.0 mm below dura, with the tooth bar at 0 in adults.

Immunocytochemistry

Grafted rats

Grafts were examined 2 months after transplantation, except in some adult recipients, which were perfused up to 6 months after transplantation.

Naïve rats

Fifteen pups from a single litter were perfused at P7, P14 or P21 and their brains were processed for 5-HT immunocytochemistry, to document the developmental state of the 5-HT innervation in the neostriatum and substantia nigra at each of these ages. The brains of normal adults, similarly processed in other studies, were used for comparative purposes.

Processing

Alternate series of 50 µm thick vibratome sections through the graft, striatum or mesencephalon were immunostained with mono- or polyclonal antibodies directed against 5-HT-glutaraldehyde-protein (Geffard et al., 1988) or with a monoclonal antibody directed against dopamine glutaraldehyde-protein (Chagnaud et al., 1987), following a previously published procedure (Doucet et al., 1989). The immunoreactivity was revealed with horse or goat

antisera against mouse (Vector; 1:200) or rabbit immunoglobulins (ICN; 1:100) respectively, and, after thorough rinsing, with avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain, ABC kit, Vector) or rabbit peroxidase-antiperoxidase complex (Dakopatts; 1:1000).

Estimation of graft size and number of dopamine neurons

Since these experiments were aiming at comparing innervation of grafts in rats which differed by their condition (age or prior lesion), measurements were performed in the different experimental groups to assess the influence of the host condition on other parameters of the graft. The size of the grafts and the number of grafted dopamine neurons were determined on every third section immunostained for dopamine from series across whole grafts. The size of these grafts was measured with an image analysis system (ImageSet; Dapple Systems, SuMyvale, CA) as total sectional area. The number of dopamine neurons was counted visually under the light microscope, since these cell bodies could not be discriminated by grey levels in non-lesioned striata. No correction was made to extrapolate the actual number of dopamine neurons per whole graft volume. Comparisons between animals, grouped according to recipient age or prior lesioning (6-OHDA or 5,7-DHT), were performed with the ANOVA factorial test and post hoc Fisher's Protected Least Significant Difference test (Statview 4.0, Abacus Concepts).

Assessment of 5-HT innervation within grafts

The 5-HT-immunostained sections were examined under the light microscope with bright- and dark-field illumination. The amount of 5-HT innervation within grafts was compared to the 5-HT fibre network in host neostriatal tissue and evaluated semiquantitatively on a \pm (rare fibres) to + + + + scale, + + + being equivalent to the density of 5-HT innervation in the normal neostriatum.

RESULTS

Features of grafts in different experimental groups

As shown in Table 1, a total of 42 rats had successful grafts in the various groups of 6-OHDA-lesioned, 5,7-DHT-lesioned or unlesioned recipients, adult or immature at the time of transplantation. All these rats were adult at the time of perfusion-fixation. As visualized with dopamine or 5-HT immunocytochemistry, ventral mesencephalic grafts included in the

present report all consisted of a tissue mass which was clearly distinct from the host tissue (Figs 1A and 3A). This allowed comparison of the ingrowth of 5-HT fibres in immature as well as adult recipients.

The mean dimension of the grafts in each group as well as the number of dopamine neurons they contained are given in Table 2. The only significant difference was in graft size between adult and immature, (P5-P14) recipients: grafts were generally larger in rats grafted as adults. Nevertheless, the number of dopamine neurons did not differ significantly. However, as reported earlier (Chkirate et al., 1993), some dopamine neurons migrated further in the host striatal tissue, occasionally several hundred microns from the graft proper, following transplantation into immature recipients (Fig. 3A). In adult recipients, dopamine neurons lying in host tissue remained within 50 mm of the graft boundaries. Thus, the grafts were strictly comparable among all immature groups (P5-P14), whereas they were larger and displayed more limited neuronal emigration in adult groups. Lesions had no effect on these parameters.

Most transplants treated with 5,7-DHT before implantation into adult or immature hosts were entirely devoid of 5-HT-immunopositive neurons. In a few P7 and adult recipients (Table 1, columns 1 and 3), the grafts contained 3-10 (up to a hundred in one case) 5-HT-immunopositive nerve cell bodies per 50 mm thick section. This treatment had no apparent effect on the survival of dopamine neurons in the grafts, since their number was comparable to that of dopamine neurons in untreated graft tissue implanted into 5,7-DHT-lesioned, adult recipients (Table 2).

In the latter rats, the untreated grafts contained three to five 5-HT neurons per section in one case, 10-30 per section in another, and between 30 and 60 per section in a third case. The majority of these 5-HT neurons were located within the graft, near the graft-host border, but occasionally some were found in the host striatum. In the remaining four 5,7-DHT-lesioned animals, the grafts were devoid of 5-HT neurons.

Serotonin innervation of the grafts

All grafts containing 5-HT neurons showed a rich network of 5-HT immunoreactive thin varicose fibres, comparable in density to the 5-HT innervation of normal striatum (Fig. 1A, B; Table 1, columns 1 and 3). In all cases, an increased number of 5-HT-immunoreactive fibres was also visible in the immediately adjacent host striatal tissue. In adult rats lesioned with

5,7-DHT prior to transplantation, grafts containing 5-HT neurons ($n = 3$, included in column 3 of Table 1) were also richly invested by 5-HT fibres (Fig. 2). These 5-HT fibres of graft origin extended profusely into the adjacent host striatum.

In contrast, serotonin-immunopositive fibres were very rare inside grafts devoid of 5-HT neurons and implanted in adult recipients (Fig. 1C; Table 1, columns 2 and 4). Occasional 5-HT-immunopositive varicose fibres were seen mainly at the periphery of these grafts.

However, after implantation in P5 and P7 recipients, many 5-HT immunoreactive fibres were present inside grafts, in the total absence of grafted 5-HT cell bodies (Fig. 3B; Table 1, columns 2 and 4). Serotonin fibres were seen in the core as well as at the periphery of the grafts, in network densities slightly lower than in the adjacent host striatum. The number of 5-HT-immunopositive fibres was considerably lower in grafts implanted in P12 recipients (Table 1, columns 2 and 4; Fig. 3C). After implantation at P14, 5-HT innervation of the grafts was almost as scant as in adult recipients (Table 1, columns 2 and 4; Fig. 3D).

There were no notable differences in 5-HT innervation density between grafts in 6-OHDA-lesioned (Table 1, column 2) and unlesioned rats (column 4) at any age.

Serotonin innervation of striatum and substantia nigra in normal rat pups

Since 5-HT innervation of ventral mesencephalic grafts was clearly dependent on a critical age of the recipient at the time of implantation (between P7 and P14), the question was raised as to whether it was related to the cessation of developmental 5-HT axonal growth into the striatum. We thus examined the development of 5-HT innervation in the striatum and substantia nigra, to see if their maturation occurred at the same age.

In rat pups perfused at P7, the 5-HT innervation of the neostriatum was very sparse (Fig. 4C), except in the medioventral neostriatum, at the level of the anterior commissure, where a moderate density of innervation was present. In the substantia nigra of these rats, the density of 5-HT innervation was already moderately dense, particularly in the pars lateralis, pars compacta and in the medial half of the pars reticulata (Fig. 4A, B). At P14 and P21, the density of 5-HT innervation showed progressive increases in both regions (Fig. 4D-I). In the neostriatum at P21, however, it was still much lower (Fig. 4I) than in the adult (Fig. 4L) while in the substantia nigra

it was already comparable (Fig. 4G, H) to the adult (Fig. 4J, K). Thus 5-HT axons were still growing-in the striatum after P21, beyond the critical age of the recipient where 5-HT innervation of the ventral mesencephalic graft ceased to occur.

DISCUSSION

Technical considerations

The present immunocytochemical observations were based on the use of polyclonal or monoclonal antibodies directed against dopamine- or 5-HT-glutaraldehyde-proteins (Geffard et al., 1988). The specificity of these antibodies was verified in this material by the distribution of labelled cell bodies and axon terminals observed in the normal and lesioned brain, which was entirely consistent with previous descriptions (e.g. Steinbusch 1981; Lindvall and Björklund, 1987).

It was essential that no fetal 5-HT neurons be included in the ventral mesencephalic grafts in order to ascertain that 5-HT axons subsequently detected inside these grafts would come from host 5-HT neurons. The existence of 5-HT cell bodies within ventral mesencephalic grafts has indeed been reported repeatedly (e.g. Freed et al., 1980; Foster et al., 1988; Mahalik and Clayton, 1991). To exclude these neurons, care was taken to dissect only the rostral two-thirds of the fetal ventral mesencephalon, and the tissue pieces were incubated with 5,7-DHT (Doucet et al., 1989). However, the presence of 5-HT neurons inside some transplants treated with 5,7-DHT and their absence in other grafts not subjected to this cytotoxin (in some 5,7-DHT-lesioned hosts) questioned the efficacy and usefulness of this treatment in removing 5-HT neurons from fetal tissue. On the other hand, grafts devoid of 5-HT cell bodies could be obtained by careful dissection of the fetal ventral mesencephalon, avoiding its caudal third, where fetal 5-HT neurons are lying (Lidov and Molliver, 1982b). Since the great majority of the present grafts were free of 5-HT cell bodies, it could be concluded that 5-HT immunoreactive axons and terminals present inside such grafts were indeed of host origin.

Serotonin innervation of the grafts

Grafts containing cotransplanted 5-HT neurons

In some grafts made in adults or at P7, the presence of intrinsic 5-HT cell bodies correlated with very extensive 5-HT arborization in the graft. 5-HT autoinnervation of mesencephalic grafts containing high numbers of 5-HT

neurons has previously been reported after implantation into 5-HT-denervated adult rat striatum or hippocampus (Foster et al., 1988; Daszuta et al., 1991). In view of the small numbers of 5-HT neurons occasionally observed in the present study, the question was raised as to the graft versus host origin of such a rich 5-HT innervation. The graft origin was demonstrated by the persistence of a similarly high density of 5-HT innervation within the graft, when the host 5-HT innervation of neostriatum had been previously removed with 5,7-DHT. Compared to dopamine neurons, which were much more numerous in these same transplants, 5-HT neurons showed a much greater capacity to arborize locally in the grafts. There are indications that 5-HT itself might promote 5-HT axonal growth via 5-HT_{1A} receptors on astrocytes, which stimulate the release of protein S-100, a 5-HT growth factor (Whitaker Azmitia et al., 1990). Even though the expression of 5-HT_{1A} receptors is very low in the neostriatum and substantia nigra (Miquel et al., 1991; Riad et al., 1991), it is possible that donor 5-HT neurons in the grafts were able to stimulate a glia-mediated trophic action on their own axons.

Grafts devoid of 5-HT cell bodies in adult recipients

The rarity of 5-HT axons in intrastriatal mesencephalic grafts devoid of 5-HT cell bodies and implanted in adult recipients confirmed earlier results (Doucet et al., 1989). The contrast between the low capacity of adult host 5-HT neurons to innervate intrastriatal ventral mesencephalic tissue and the extensive axonal network produced in this same tissue by even small numbers of grafted fetal 5-HT neurons was striking.

This low capacity of 5-HT neurons to innervate intrastriatal grafts in adult hosts also contrasted with multiple reports of a profuse 5-HT innervation into ectopic as well as homotopic grafts made in other regions of the brain (Azmitia et al., 1981; Sotelo and Alvarado-Mallart, 1985; Castro et al., 1988; Houlé and Reier, 1988; Nothias et al., 1990; Bregman et al., 1991). Furthermore, adult 5-HT axons of the neostriatum were found to be able to grow and to innervate fetal striatal or cortical grafts even in the absence of prior excitotoxic lesion (Labandeira-Garcia et al., 1991; Lu et al., 1991). One example of intraparenchymally grafted nervous tissue with poor 5-HT innervation from the host is the fetal spinal cord implanted into the adult transected spinal cord (Bregman, 1987). However, grafts of dissociated fetal

spinal tissue placed in the excitotoxically lesioned spinal cord of adult rats do become richly 5-HT innervated by the host (Nothias and Peschanski, 1990).

Since these examples indicate that host 5-HT neurons have the capacity to innervate other grafts of fetal nervous tissue even in the neostriatum of adults, it was excluded that an inherent limitation of the growth capacity of these neurons was responsible for the lack of 5-HT innervation of ventral mesencephalic grafts made in adults. Rather, this inability specifically to innervate these grafts seemed to be due to a low affinity towards ventral mesencephalic tissue.

Grafts devoid of 5-HT cell bodies in immature recipients

Our results indicated that fetal ventral mesencephalic tissue was an appropriate substrate to support axonal elongation from 5-HT neurons which were P7 or younger, but that this property was gradually lost at P12 and P14.

The normal development of the 5-HT innervation in these two brain regions was therefore examined to see if this decreasing capacity of host 5-HT axons to invade the ventral mesencephalic grafts was related to the end of their developmental growth period. The late development of the 5-HT innervation in the neostriatum has been described by Lidov and Molliver (1982a). No comparable data were available concerning the 5-HT innervation in the ventral mesencephalon (see also Wallace and Lauder, 1992). The present results showed that the 5-HT innervation of the substantia nigra develops more rapidly than in the neostriatum. The adult density and uniform distribution were reached between P14 and P21 in the substantia nigra.

The fact that 5-HT axons were still actively growing in the normal neostriatum beyond P21 was another indication that the more limited 5-HT fibre ingrowth in grafts implanted at P14 was not a reflection of diminished intrinsic growth capacity. Moreover, neonatal 6-OHDA denervation of the host had no apparent effect on the 5-HT innervation of the grafts in any age group, even though 5-HT axonal growth in the host neostriatum was several-fold greater than normal (Descarries et al., 1992).

There were no reasons to believe that differences in the cellular or molecular composition of the grafts implanted at P5-7 compared to P14 could account for their observed difference in 5-HT innervation. Graft size and shape, as well as the extent of dopamine neuron emigration, differed following transplantation in adult compared to immature neostriatum, but

were similar in P5 and P14 recipients. Changes in the affinity of host 5-HT axons for ventral mesencephalic tissue were therefore likely to be directly attributable to the host brain and the state of maturation of the host 5-HT neurons themselves. Indeed, assuming some delay for the graft to take and for the 5-HT fibres to grow, there was a remarkable coincidence between the development of a mature 5-HT innervation in the substantia nigra (between P14 and P21) and the end of the period during which transplantation of ventral mesencephalic tissue would result in extensive host 5-HT innervation of the graft (before P14).

Since at least some of the 5-HT neurons innervating the neostriatum, and potentially the grafts, also innervate the substantia nigra (van der Kooy and Hattori, 1980), a maturational decrease in the affinity of 5-HT axons for ventral mesencephalic tissue could be mediated by some kind of receptor on 5-HT axons recognizing nigral cell or extracellular matrix adhesion molecules. Such a receptor would be down-regulated once the innervation of substantia nigra was complete, as has been shown to occur in other neuronal systems (for a review see Reichardt and Tomaselli, 1991).

Conclusion

Our results show that 5-HT axons innervating the neostriatum can grow into fetal ventral mesencephalic tissue only during development, at the fetal and neonatal stages. The critical age at which this ability is lost correlates with the maturation of the 5-HT innervation in the substantia nigra rather than with that in the neostriatum, which extends well beyond that age. This suggests that host 5-HT axons lose the ability to grow into ventral mesencephalic tissue, even ectopically positioned, as soon as they reach maturity in the substantia nigra. Ventral mesencephalic grafts may thus be a good model to study the factors regulating the density of 5-HT innervation in the substantia nigra during development.

ACKNOWLEDGEMENTS

The expert photographic work of Gaston Lambert and Denis Dicaire is gratefully acknowledged. The authors also thank Dr Laurent Descarries for his careful revision of the manuscript. This study was supported by grant MT-10982 from the Medical Research Council of Canada and by a scholarship and grant from the Fonds de la recherche en santé du Québec (G. D.). A. M. was supported by a studentship from the Groupe de recherche sur le système nerveux central (grant FCAR 92-CE-166).

REFERENCES

- Abrous, D. N., Manier, M., Mennicken, F., Feuerstein, C., Lemoal, M. and Herman, J. P. (1993) Intra-striatal transplants of embryonic dopaminergic neurons counteract the increase of striatal enkephalin immunostaining but not serotonergic sprouting elicited by a neonatal lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Eur. J. Neurosci.*, 5, 128-136.
- Azmitia, E. C., Perlow, M. J., Brennan, M. J. and Lauder, J. M. (1981) Fetal raphe and hippocampal transplants into adult and aged C57BL/6N mice: a preliminary immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.*, 7, 703-710.
- Björklund, A., Wiklund, L. and Descarries, L. (1981) Regeneration and plasticity of central serotonergic neurons: a review. *J. Physiol. (Paris)*, 77, 247-255.
- Björklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R. H., Dunnett, S. B. and Gage, F. H. (1983) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. 1. Introduction and general methods of preparation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 522, 1-7.
- Bosler, O., Vuillon-Cacciuttolo, G. and Saidi, H. (1992) Long-term serotonin reinnervation of the suprachiasmatic nucleus after 5,7-dihydroxytryptamine axotomy in the adult rat. *Neurosci. Lett.*, 143, 159-163.
- Bregman, B. S. (1987) Spinal cord transplants permit the growth of serotonergic axons across the site of neonatal spinal cord transection. *Dev. Brain Res.*, 31, 265-279.
- Bregman, B. S., Bernstein-Goral, H. and Kunkel-Bagden, E. (1991) CNS transplants promote anatomical plasticity and recovery of function after spinal cord injury. *Rest. Neurol. Neurosci.*, 2, 327-338.
- Castro, A. J., Tonder, N., Sunde, N. A. and Zirnmer, J. (1988) Fetal neocortical transplants grafted to the cerebral cortex of newborn rats receive afferents from the basal forebrain, locus coeruleus and midline raphe. *Exp. Brain Res.*, 69, 613-622.
- Chagnaud, J.-L., Mons, N., Tuffet, S., Grandier-Vazeilles, X. and Geffard, M. (1987) Monoclonal antibodies against glutaraldehyde-conjugated dopamine. *J. Neurochem.*, 49, 487-494.
- 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.

Daszuta, A., Chazal, G., Garcia, S., Oleskevich, S. and Descarries, L. (1991) Ultrastructural features of serotonin neurons grafted to adult rat hippocampus-an immunocytochemical analysis of their cell bodies and axon terminals. *Neuroscience*, 42, 793-811.

Descarries, L., Soghomonian, J.-J., Garcia, S., Doucet, G. and Bruno, J. P. (1992) Ultrastructural analysis of the serotonin hyperinnervation in adult rat neostriatum following neonatal dopamine denervation with 6-hydroxydopamine. *Brain Res.*, 569, 1-13.

Doucet, G., Murata, Y., Brundin, P., Bosler, O., Mons, N., Geffard, M., Ouimer, C. C. and Björklund, A. (1989) Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp. Neurol.*, 106, 1-19.

Doucet, G., Brundin, P., Descarries, L. and Björklund, A. (1990) Effect of prior dopamine denervation on survival and fiber outgrowth from fetal mesencephalic grafts. *Eur. J. Neurosci.*, 2, 279-290.

Doucet, G., Chkirate, M., Mounir, A. and Vallée, A. (1992a) Host striatal and serotonin projections into fetal ventral mesencephalic transplants in the newborn or adult rat striatum. *Rest. Neurol. Neurosci.*, 4, 164.

Doucet, G., Mounir, A., Chkirate, M., Vallée, A. and Geffard, M. (1992b) Serotonin axons lose the ability to grow into fetal ventral mesencephalic grafts shortly after birth. *J. Neural Transplant Plasticity*, 3, 219.

Foster, G. A., Schultzberg, M., Gage, F. H., Björklund, A., Hokfelt, T., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J., Visser, T. J. and Emson, P. C. (1988) Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphe neurones after transplantation to the adult rat central nervous system. III. Grafts to the striatum. *Exp. Brain Res.*, 70, 242-255.

Frankfurt, M. and Beaudet, A. (1987) Ultrastructural organization of regenerated serotonin axons in the dorsomedial hypothalamus of the adult rat. *J. Neurocytol.*, 16, 799-809.

Freed, W. J., Perlow, M. J., Karoum, F., Seiger, A., Olson, L., Hoffer, B. J. and Wyatt, R. J. (1980) Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long-term behavioral, biochemical and histochemical studies. *Ann. Neurol.*, 8, 510-519.

Geffard, M., Tuffet, S., Peuble, L. and Patel, S. (1988) Production of antisera to serotonin and their metabolites and their use in

immunocytochemistry. In Osborne, N. N. and Hamon, M. (eds), *Neuronal Serotonin*. Wiley, London, pp. 1-23.

Houlé, J. D. and Reier, P. J. (1988) Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 269, 535-547.

Jonsson, G. (1983) Chemical lesioning techniques: monoamine neurotoxins. In Björklund, A. and Hokfelt, T. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 1. *Methods in Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, Arnsterdarn, pp. 463-507.

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

Lidov, H. G. and Molliver, M. E. (1982a) An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.*, 8, 389-430.

Lidov, H. G. W. and Molliver, M. E. (1982b) Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res. Bull.* 9, 559-604.

Lindvall, O. and Bjorklund, A. (1987) Neuroanatomical localization of dopamine in the brain and spinal cord. In Henn, F. A. and DeLisi, L. E. (eds), *Handbook of Schizophrenia*, Vol. 2: *Neurochemistry and Neuropharmacology of Schizophrenia*. Elsevier, Amsterdarn, pp. 49-99.

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.

Mahalik, T. J. and Clayton, G. H. (1991) Specific outgrowth from neurons of ventral mesencephalic grafts to the catecholamine-depleted striatum of adult hosts. *Exp. Neurol.*, 113, 18-27.

Miquel, M. C., Doucet, E., Boni, C., Elmestikawy, S., Matthiessen, L., Daval, G., Verge, D. and Hamon, M. (1991) Central serotonin-1A receptors. Respective distributions of encoding messenger RNA, receptor protein and binding sites by in situ hybridization histochemistry, radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem. Int.*, 19, 453-465.

Nothias, F. and Peschanski, M. (1990) Homotypic fetal transplants into an experimental model of spinal cord neurodegeneration. *J. Comp. Neurol.*, 301 520-534.

Nothias, F., Onténiente, B., Geffard, M. and Peschanski, M. (1988) Rapid growth of host afferents into fetal thalamic transplants. *Brain Res.*, 463 341-345.

Nothias, F., Onténiente, B., Geffard, M. and Peschanski, M. (1990) Dissimilar responses of adult thalamic monoaminergic and somatosensory afferent fibers to implantation of thalamic fetal cells. *Neuroscience*, 37, 353-366.

Polistina, D. C., Murray, M. and Goldberger, M. E. (1990) Plasticity of dorsal root and descending serotonergic projections after partial deafferentation of the adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 299, 349-363.

Reichardt, L. F. and Tomaselli, K. J. (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14, 531-570.

Riad, M., Elmestikawy, S., Verge, D., Gozlan, H. and Hamon, M. (1991) Visualization and quantification of central 5-HT_{1A} receptors with specific antibodies. *Neurochem. Int.*, 19, 413-423.

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.

Sotelo, C. and Alvarado-Mallart, R.-M. (1985) Cerebellar transplants: immunocytochemical study of the specificity of Purkinje cells inputs and outputs. In Bjorklund, A. and Stenevi, U. (eds), *Neural Grafting in the Mammalian CNS*. Elsevier, Amsterdam, pp. 205-215.

Steinbusch, H. W. M. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6, 557-618.

Triarhou, L. C., Low, W. C. and Ghetti, B. (1992) Serotonin fiber innervation of cerebellar cell suspensions intraparenchymally grafted to the cerebellum of pcd mutant mice. *Neurochem. Res.*, 17, 475-482.

van der Kooy, D. and Hattori, T. (1980) Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double study in the rat. *Brain Res.*, 186, 1-7.

Wallace, J. A. and Lauder, J. M. (1997) Development of the serotonergic system in rat and chick embryos. In Bjorklund, A., Hokfelt, T. and Tohyama, M. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Volume 10: Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS*. Elsevier, Amsterdam, pp. 619-645.

Whitaker-Azmitia, P. M., Murphy, R. and Azmitia, E. C. (1990) Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res.*, 528, 155-158.

Wiklund, L. and Bjorklund, A. (1980) Mechanisms of regrowth of the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence histochemical observations. *Brain Res.*, 191, 129 - 160.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Grafts in adult recipients without 6-OHDA lesions. A) Bright field micrograph at low magnification showing a graft containing a small number of 5-HT neuronal cell bodies (arrows). This graft was located caudally in the neostriatum, just above globus pallidus. Note the stronger immunostaining in the host striatal tissue around the graft, particularly near the ventricle. cx: cortex; g: graft; gp: globus pallidus; se: septum; st: striatum; v: lateral ventricle. Scale bar: 1.0 mm. B) In the graft in A, the presence of 5-HT cell bodies (dark profile; curved arrow), viewed in dark field, was associated with a very dense network of 5-HT immunopositive axonal fibers (bright linear profiles; small straight arrows). g: graft; st: striatum. Scale bar: 100 μ m. C) In grafts which were devoid of 5-HT cell bodies, very few 5-HT immunopositive axons could be observed in the grafts, where they were mostly located in peripheral zones. g: graft; st: striatum. Scale bar: 100 μ m.

Figure 2. Grafts in adult recipients treated with 5,7-dihydroxytryptamine to destroy the host 5-HT neurons. A) Section through the dorsal (DR) and medial (MR) raphe, in the midbrain tegmentum. Note the almost total disappearance of 5-HT neurons (arrows) in the DR, and the relative sparing of 5-HT neurons in the MR. aq: central aqueduct. Scale bar: 200 μ m. B) Graft (g) in a 5,7-DHT-lesioned animal, containing a small number of 5-HT neuronal cell bodies (arrows) and displaying a dense network of 5-HT axonal fibers. The adjacent neostriatum (st) was also innervated by 5-HT axons of graft origin. Scale bar: 200 μ m.

Figure 3. Grafts from transplantation into immature recipients. A) Section through the striatum, immunostained for DA and showing a graft in a rat transplanted at P7. DA neurons were present in the host striatum (white arrows) as well as inside the body of the graft (black arrows). Scale bar: 600 μ m. B) Graft in a rat transplanted at P7. Such grafts were invested with 5-HT-immunopositive axons (arrows). Scale bar: 100 μ m. C) Grafts resulting from transplantation in P12 rats contained less numerous 5-HT axons. Scale bar: 100 μ m. D) After implantation in P14 recipients, the number of 5-HT axons inside the grafts was almost as low as in grafts in adult recipients. Scale bar: 100 μ m. g: graft; ic: internal capsule; se: septum; st: striatum.

Figure 4. Postnatal development of 5-HT innervations in substantia nigra and striatum. Serotonin immunostained sections from normal rats at P7 (A,B,C), P14 (D,E,F), P21 (G,H,I) and adults (J,K,L). A,D,G,J are low magnifications of the substantia nigra, while B,E,H,K display the medial area (* in A) of pars reticulata (snr) at higher magnification. C,F,I,L are from dorsomedial neostriatum. At P7 (A,B,C), a moderate 5-HT innervation was already present in substantia nigra, mainly in the pars lateralis (snl), pars compacta (snc) and medial half of pars reticulata (snr), while 5-HT fibers were rare in neostriatum and found mostly paraventricularly. The number of 5HT fibers increased in both regions at P14 (D,E,F). In substantia nigra, the density of 5-HT innervation at P21 (G,H) has already reached that of the adult (J,K), whereas in the neostriatum (I) it is still less than in the adult (L). i.c.: internal capsule. Scale bars: 500 μ m (A,D,G,J); 100 μ m (B,C,E,F,H,I,L)

TABLE 1. Density of 5-HT innervation according to age of recipients, prior 6-OHDA lesion and presence or absence of 5-HT neuronal cell bodies inside the graft

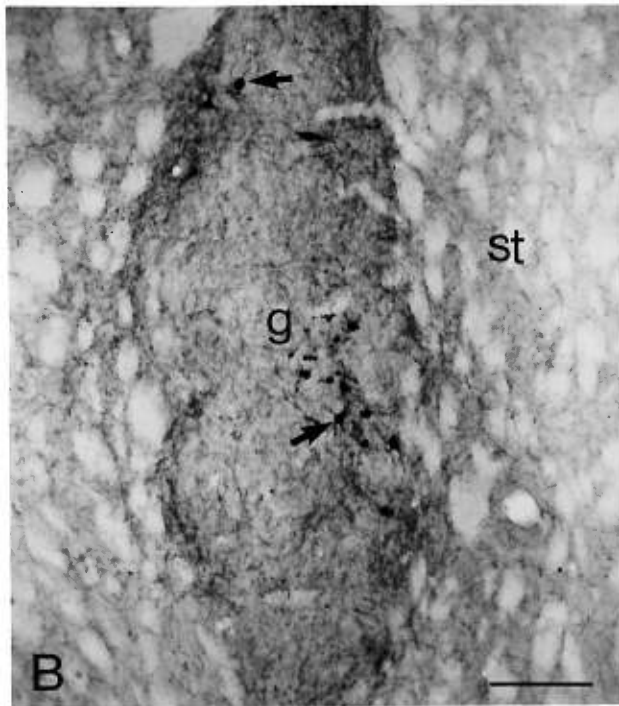
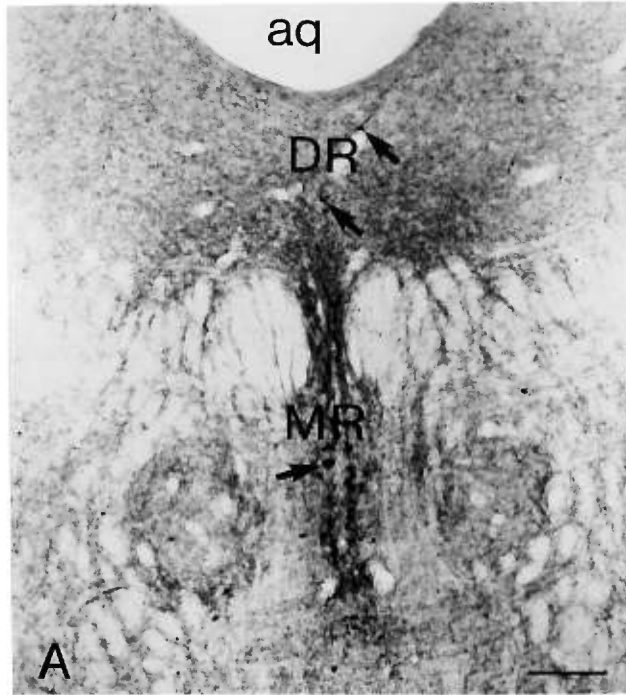
Age of recipient	6-OHDA-lesioned		6-OHDA-unlesioned	
	1. Graft with 5-HT neurons	2. Graft without 5-HT neurons	3. Graft with 5-HT neurons	4. Graft without 5-HT neurons
Adult	+++ (3)	± (2)	++++ (7)	± (7)
P14		+ (2)		+ (3)
P12		++ (1)		++ (4)
P7	++++ (2)	+++ (1)	++++ (1)	+++ (4)
P5		+++ (2)		+++ (3)

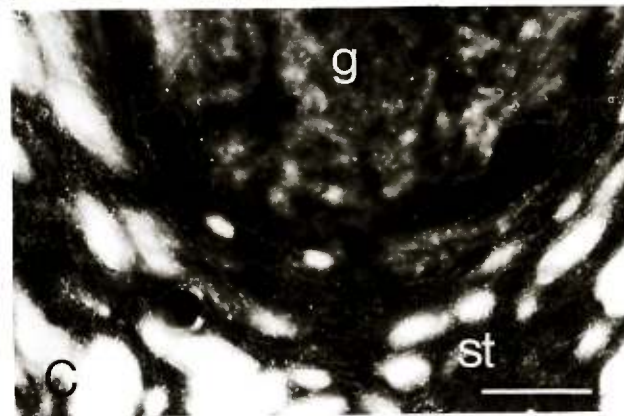
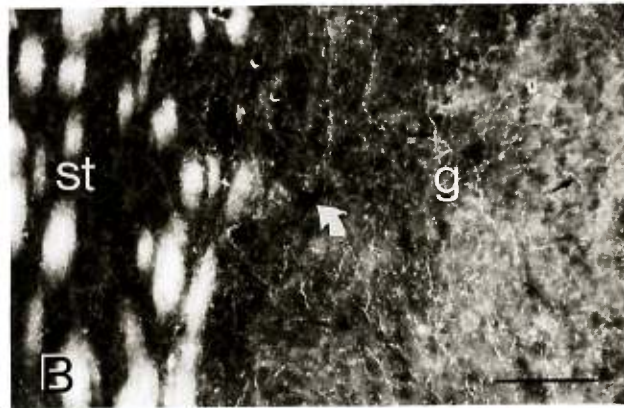
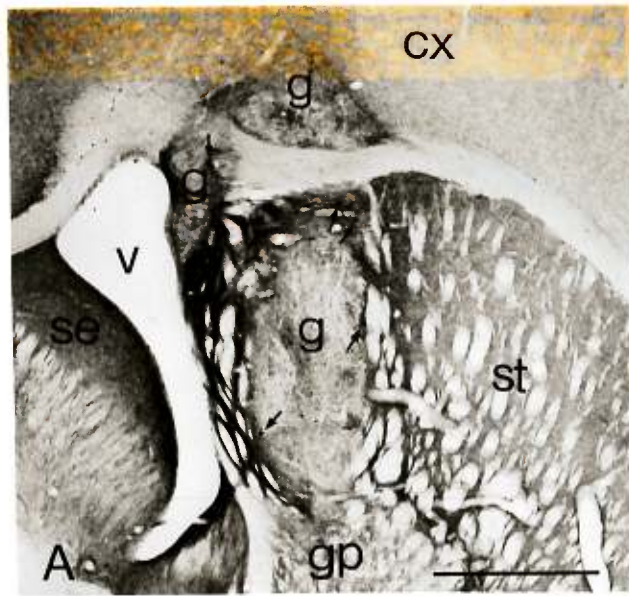
The density of 5-HT innervation is expressed semiquantitatively: ± indicates the presence of rare fibres while + + + represents a density comparable to that of normal adult striatum and + + + + a still higher density. In brackets is indicated the number of grafted animals in each group. Half of the fourteen 6-OHDA-unlesioned adults (three with and four without 5-HT neurons in graft; columns 3 and 4 respectively) had been subjected to intraventricular 5,7-DHT injection prior to transplantation.

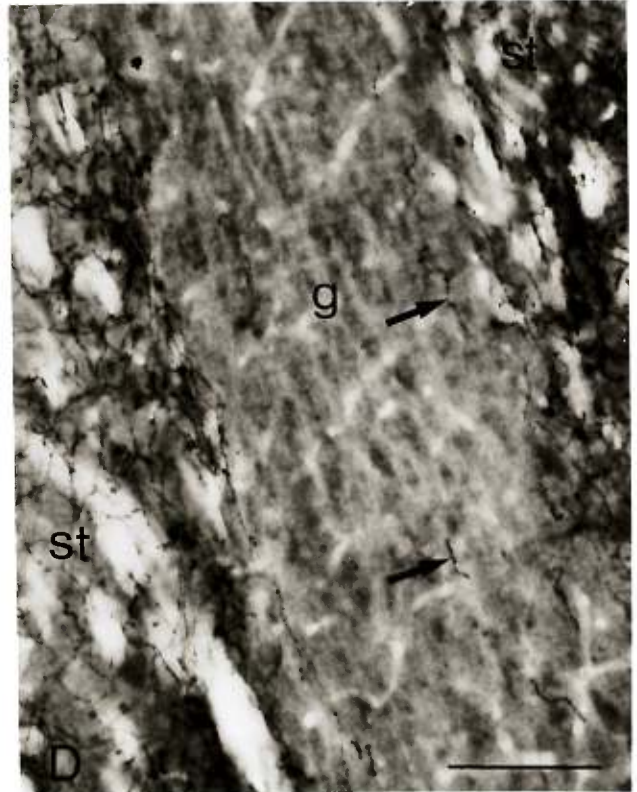
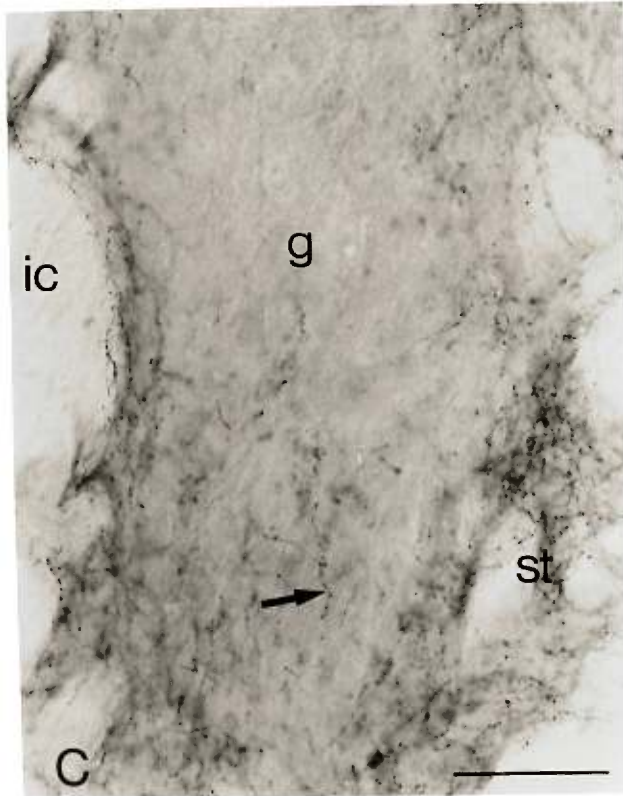
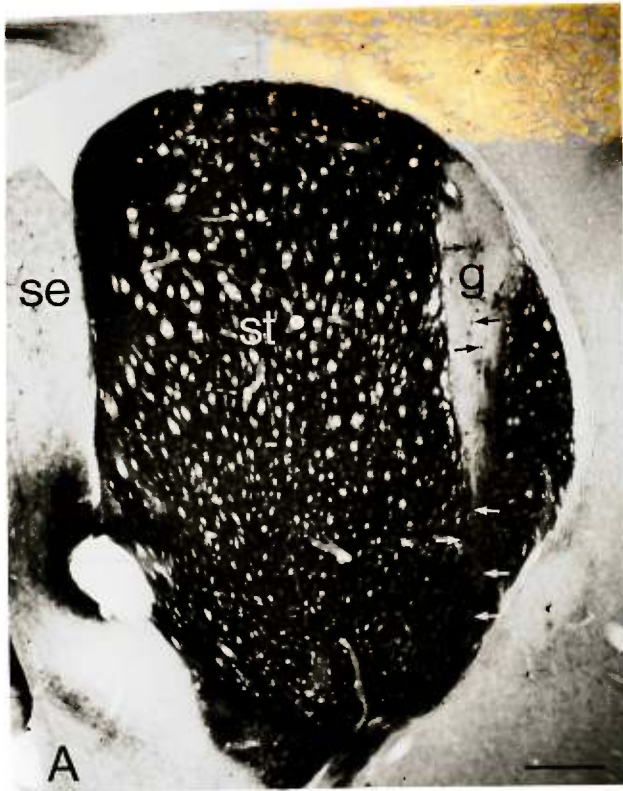
TABLE 2. Dimension of grafts and number of grafted dopamine cell bodies according to the age of recipients and condition of host neostriatum at the time of transplantation

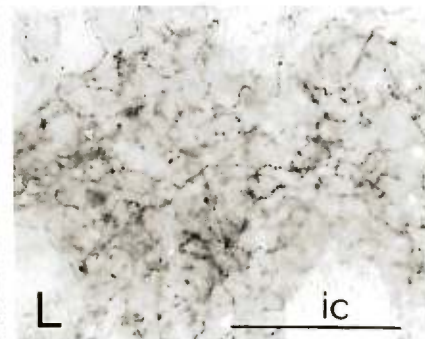
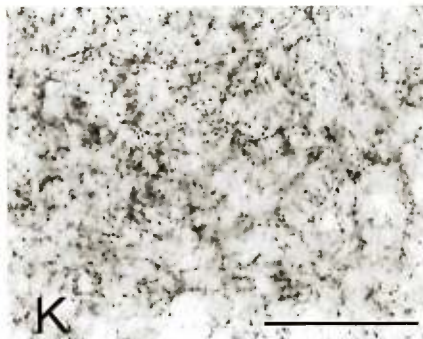
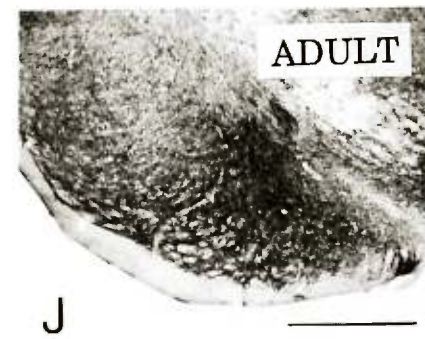
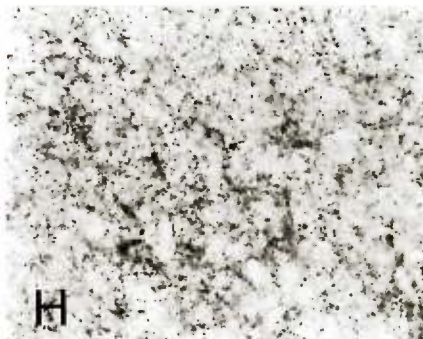
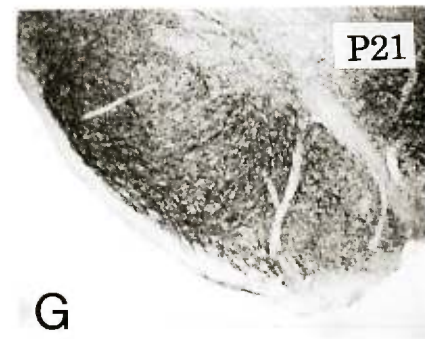
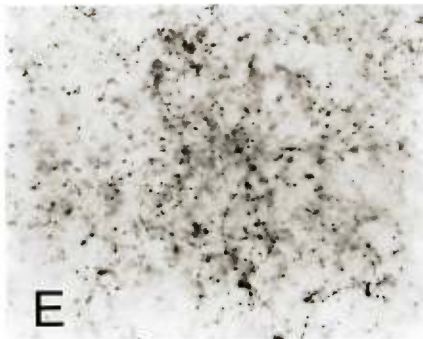
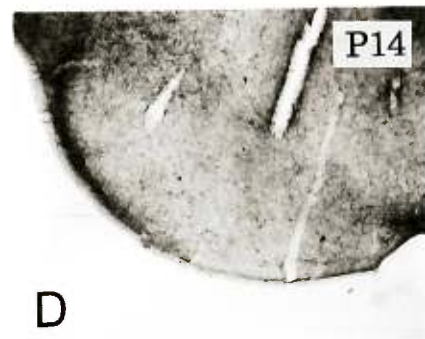
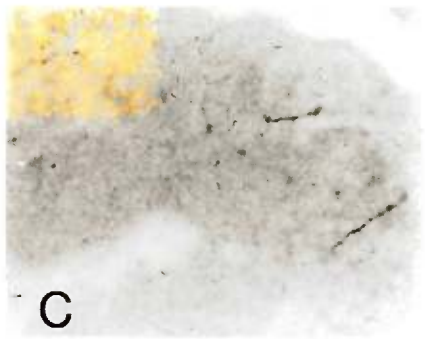
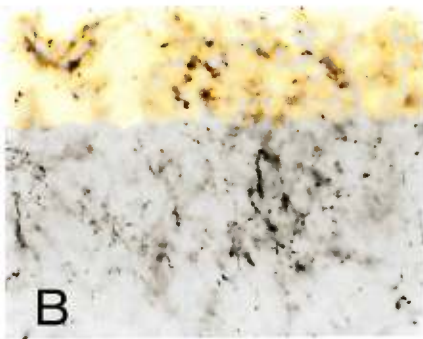
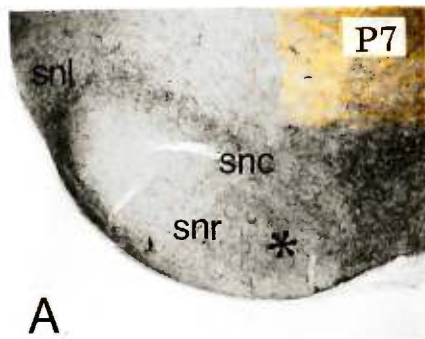
Age at transplantation		Condition of host neostriatum			Means
		Non-lesioned	6-OHDA-lesioned	5,7-DHT-lesioned	
Adult	<i>n</i>	2	3	7	
	graft size (mm ²)	8.36 ± 2.87	5.39 ± 2.54	7.83 ± 1.54	7.31 ± 1.13
	DA cell number	260 ± 127	549 ± 195	435 ± 65	433 ± 63
P12-P14	<i>n</i>	7	2		
	graft size (mm ²)	2.13 ± 0.25	1.73 ± 1.15		2.04 ± 0.28**
	DA cell number	362 ± 69	551 ± 355		403 ± 84
P5-7	<i>n</i>	7	3		
	graft size (mm ²)	3.99 ± 1.25	4.21 ± 2.69		4.06 ± 1.10*
	DA cell number	870 ± 299	505 ± 161		761 ± 216
Means	graft size (mm ²)	3.72 ± 0.78	4.03 ± 1.34		
	DA cell number	572 ± 146	533 ± 107		

Means ± SEM for the number of rats indicated (*n*). The average sectional area of grafts and number of dopamine (DA) neurons were determined on every third dopamine-immunostained section, as explained in Materials and methods. Significance of difference from grafts in adults on ANOVA factorial test (**P* < 0.05; ***P* < 0.0001).









**SEROTONIN AXONS OF THE NEOSTRIATUM SHOW A HIGHER
AFFINITY FOR STRIATAL THAN FOR VENTRAL MESENCEPHALIC
TRANSPLANTS: A QUANTITATIVE STUDY IN ADULT AND
IMMATURE RECIPIENT RATS**

by

***P. PIERRET, *A. VALLÉE, ‡O. BOSLER, †M. DORAIS,
*H. MOUKHLES, *R. ABBASZADEH, †Y. LEPAGE, *G. DOUCET**

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

†Département de mathématiques et de statistique, same address

‡Institut Fédératif Jean Roche, INSERM, U297, Faculté de médecine Nord, Marseille, France

Key words: Axon guidance, Chemoaffinity, Neural transplantation, Striatal primordium, Ventral mesencephalon, Monoamine uptake, Autoradiography, Quantification

Running head: Serotonin innervation of neural grafts

Send proofs to: Dr. Guy Doucet, Université de Montréal, Département de pathologie & biologie cellulaire, case postale 6128, succursale Centre-ville, Montréal (Québec) Canada H3C 3J7; Telephone: (514) 343-6255; Fax: (514) 343-5755; E-Mail: doucetg@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

We previously showed that grafts of fetal ventral mesencephalic tissue are practically not innervated by host serotonin (5-HT) axons after implantation into the striatum of rats aged more than 14 days, at variance with transplants of cortical or striatal tissue into the adult striatum which are well innervated by these axons. Using 5-HT immunohistochemistry and *in vitro* [³H]5-HT uptake/autoradiography, we have examined and quantified the innervation of ventral mesencephalic versus striatal grafts several months after implantation into the striatum of neonatal (postnatal day 5 or P5), juvenile (P15) and adult rats. Ventral mesencephalic grafts implanted in P5 rats received a moderate 5-HT innervation, while similar grafts implanted in P15 or adult recipients were almost free of any 5-HT fibers (-80%, compared to P5). The density of 5-HT innervation showed a tendency towards higher values in striatal than in ventral mesencephalic grafts (1.6-2 times higher in P5 and adult recipients; 4 times higher in P15 recipients). The difference was more striking, and significant, when only the true striatal portions of the striatal grafts were considered, i.e. DARPP-32-immunopositive areas (4-5 times higher in P5 and adult recipients; 10 times higher in P15 recipients). Accordingly, these DARPP-32-positive areas were also more densely innervated than the DARPP-32 negative zones of the same grafts (3 times higher at any age). The 5-HT innervation density also decreased with increasing age of the recipients in DARPP-32-positive, as well as DARPP-32-negative compartments of the striatal grafts (-75% in adults), but this decrease appeared more gradual (-50% in juveniles) than with mesencephalic grafts. It is concluded that the 5-HT axons innervating the neostriatum have a better affinity for striatal grafts than for ventral mesencephalic grafts or the non-striatal portions of striatal grafts. In adulthood, the relative affinity of these axons for the different types of grafts

is maintained, even though their growth capacity decreases irrespective of the target tissue considered. This experimental model may prove useful for the identification of the receptors and ligands that are responsible for target recognition by 5-HT axons and to test the possibility that the progressive decrease of axonal growth capacity from neonatal age to adulthood be related to a downregulation of such molecules.

INTRODUCTION

The capacity of central serotonin (5-HT) neurons to regrow following a brain lesion has long appeared as a characteristic feature of these neurons, even in the adult (8, 10). It has been well documented, for example, that 5-HT neurons can reinnervate all levels of the adult rat spinal cord following a proximal neurotoxic axotomy induced by intracisternal injection of 5,6- or 5,7-dihydroxytryptamine (5,6- or 5,7-DHT) (57). Similar reinnervations were also described in the inferior olive (58) and the hypothalamus (27), following chemical 5-HT denervation in the adult rat.

Adult host 5-HT neurons have also been shown to grow within neural grafts, but the extent of 5-HT innervation was clearly dependent on the anatomical origin of the transplant and its site of implantation (4, 31, 32, 35, 41). They have also been reported to invade homotypic spinal cord grafts less profusely than the 5-HT neurons of immature recipients (13).

Therefore, 5-HT neurons constitute an interesting model to study the properties and mechanisms of axonal regeneration and guidance in the adult brain. To this aim, 5-HT axonal ingrowth may be examined in potential target neural tissue transplanted homo- or ectopically in the immature or adult rat brain.

We have previously shown that host 5-HT axons moderately innervate grafts of fetal ventral mesencephalic tissue following implantation into the newborn rat striatum and that they practically do not penetrate such grafts if implantation occurs in rats aged 14 days or more (22, 38). Yet, the same 5-HT axons of the adult neostriatum were reported to be able to grow and innervate the core as well as the periphery of striatal or cortical grafts (32, 35).

Altogether, these results have suggested that the apparent failure of 5-HT axons to significantly innervate ventral mesencephalic grafts following implantation into the adult striatum is not due to an intrinsic loss of growth

capacity but rather to a loss of affinity of these axons for fetal midbrain tissue. Nevertheless, since the 5-HT innervation of striatal grafts implanted homotopically into newborn rats has not yet been examined, it is not known whether 5-HT axons also lose some of their capacity to grow into the transplanted fetal striatal tissue with increasing age of the host. Would it be the case, then it would be asked whether the decreasing ability of host 5-HT axons to innervate striatal grafts would parallel, on a temporal basis, that observed for axons growing into ventral mesencephalic grafts. If the 5-HT innervation of striatal grafts does not decrease proportionately after implantation in the adult, compared to neonatal brain, then one would need to explain why 5-HT axons lose their capacity to grow into mesencephalic but not into striatal graft tissue.

The aim of the present study was therefore to obtain quantitative data on the 5-HT innervation of both striatal and ventral mesencephalic grafts of fetal tissue after implantation into the intact striatum of immature (P5, P15) versus adult rats. The quantitative method was based on *in vitro* [³H]5-HT uptake and autoradiography (20), which was run in parallel with 5-HT immunohistochemistry. Since it has been shown that transplantation of the striatal primordium yields grafts with compartments containing true striatal tissue, i.e. exhibiting DARPP-32 (Dopamine and Adenosine monophosphate-Regulated PhosphoProtein (42)) -positive staining, as well as compartments with neurons of presumed pallidal or cortical origins (DARPP-32-negative) (55), we have adapted our method so as to be able to count radiolabelled 5-HT terminals separately in each compartment. To this aim, we used alternate serial 4 µm-thick sections that were processed either for autoradiography or for DARPP-32 immunostaining.

Preliminary accounts of the immunohistochemical and autoradiographic parts of the present study have previously been published separately in abstract form (44, 46).

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Fifty-one female Sprague-Dawley rats aged 5, 15 days (P5, P15) or adults (200-250 g) were included in this study. Twenty-three rats (10 P5, 6 P15, 7 adults) were implanted into their intact striatum with fetal ventral mesencephalic tissue and 28 rats (8 P5, 7 P15, 13 adults) with fetal striatal tissue.

Transplantation procedure

Transplantation of embryonic day 14 (E14) ventral mesencephalic tissue and of E15-16 striatal tissue, taken from pregnant dams anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol, 60 mg/kg, i.p.), was performed according to the cell suspension technique of Björklund et al. (9). The fetal neural tissues were dissected in minimal essential medium (MEM; Gibco-BRL) supplemented with 0.220 g/l sodium bicarbonate and 25 mM HEPES buffer, pH 7.35 (Gibco-BRL) and collected in the same solution supplemented with 1% D-glucose (DMEM). Only the rostral two-thirds of the fetal ventral mesencephalon was included in order to avoid co-grafting of fetal 5-HT neurons from the mesencephalic raphe. For striatal grafts, the dissection was restricted to the lateral ganglionic eminence to improve the yield in true striatal tissue (40, 43). The tissue pieces were incubated during 20 min with 0.1% trypsin (Sigma Crude Type II) in DMEM, rinsed in DMEM, mechanically dissociated with fire-polished Pasteur pipettes, and injected stereotaxically into the intact striatum of the recipient rats anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol, MTC Pharmaceutical, diluted to 8 mg/ml

with saline, 60 mg/kg) (see (45) for details) supplemented with methoxyflurane (Metofane, Janssen Pharmaceutica) inhalation.

Pre-embedding immunohistochemistry

Fourteen rats (7 P5, 4 P15, 3 adult recipients) with ventral mesencephalic grafts and 17 rats (6 P5, 3 P15 and 8 adult recipients) with striatal grafts were processed for pre-embedding immunohistochemistry. Monoclonal antibodies against 5-HT (28) (generous gift of Dr. M. Geffard, Université de Bordeaux II, FR), tyrosine hydroxylase (TH, Boehringer-Mannheim) and DARPP-32 (42) (kindly donated by Dr. E. L. Gustafson, Rockefeller University, NY) were used on alternate serial sections to visualize, respectively, the host 5HT axons (and control the absence of co-grafted 5-HT neurons), the dopamine (DA) neurons or the striatal neurons in the grafts.

Two to 4 months after transplantation surgery, the animals were perfused through the ascending aorta, under deep pentobarbital anesthesia (70 mg/kg), with 10-20 ml sodium phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), followed with 600 ml of 3.5% glutaraldehyde buffered to pH 7.4 with 0.1 M sodium phosphate and containing 0.2% sodium metabisulfite to protect 5-HT from oxidation. Animals from each group were sacrificed together, at a given survival time. A thick slice including the striatum was further fixed in the same solution during 2 h at room temperature. After extensive rinsing, 50 μ m-thick sections were cut on a vibrating microtome and divided in alternate series that were immunostained free-floating for 5-HT, TH or DARPP-32, according to previously published peroxidase procedures (14, 38, 39). The amount of 5-HT innervation was estimated mainly in dark field illumination, which allowed easy distinction between graft and host tissues (see Figs. 1-3, B and D). Serotonin innervation of true striatal tissue within the striatal grafts was assessed by using drawings of adjacent sections immunostained for DARPP-32.

[³H]5-HT uptake and autoradiography

Nine rats (3 P5, 2 P15, 4 adult recipients) with ventral mesencephalic grafts and 11 rats (2 P5, 4 P15, 5 adult recipients) with striatal grafts were processed for the *in vitro* uptake of tritiated 5-HT in fresh brain slices, in order to quantify the number of 5-HT axonal varicosities per mm² of mesencephalic or striatal graft, according to a procedure described in detail elsewhere (20, 21) and only briefly summarized below.

For this quantitative analysis, all the animals were sacrificed after the same survival time, in order to reduce potential variations in the results. Thus, 5 months after grafting, the animals were deeply anesthetized with a lethal dose of sodium pentobarbital (Somnotol, 70-80 mg/kg, i.p.), and perfused through the ascending aorta with ice-cold artificial cerebrospinal fluid (CSF; see (20)). Three or 4 coronal slices of the fresh brain (200 µm-thick) were cut through the graft on a vibrating microtome, in the same solution. They were incubated with 1 µM of [³H]5-HT (5-[1,2-³H(N)]-hydroxytryptamine creatinine sulfate; NET-498, 1032 GBq/mmol; DuPont-NEN, Boston, MA) in the presence of a monoamine oxidase inhibitor (Pargyline 0.1 mM; Aldrich, Milwaukee, WI) and an inhibitor of monoamine uptake by DA terminals (BENZTROPINE mesylate, 10 µM; Merck, Sharp & Dohme, Kirkland, Qc, Canada). The slices were fixed by immersion in 3.5% glutaraldehyde buffered at pH7.4 with 0.1M sodium phosphate, dehydrated in ethanol and flat-embedded in epoxy resin (Epon 812, Mecalab). Semi-thin sections (4 µm-thick) of the whole slices were cut on a Polycut™ microtome (Reichert-Jung, Leica; Vienna, Austria), flattened on gelatinized glass slides and dipped in liquified nuclear emulsion (K5; Ilford, Cheshire, England), which was developed in freshly prepared D-19 after 3 weeks of exposure. Complete series of sections from all experimental animals were processed together.

As a first control for the detection of eventual co-grafted 5-HT neurons in the ventral mesencephalic grafts, brain slices (200 μm -thick) including the rostral and caudal parts of the grafts were taken for pre-embedding 5-HT immunohistochemistry. These slices were fixed overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde buffered with 0.1 M sodium phosphate. After extensive rinsing, they were processed as free-floating sections, using a commercial antibody against 5-HT (1:10 000; Incstar, Stillwater, MN), according to a standard peroxidase procedure, as above.

Post-embedding immunohistochemistry

Series of 4 μm -thick sections of the embedded brain slices, taken adjacent to the sections intended for autoradiography, were processed for post-embedding immunohistochemistry. Tyrosine hydroxylase immunostaining was performed on a first series to assess the distribution of DA neurons in mesencephalic graft. Other sections of mesencephalic grafts were immunoreacted with an anti-tryptophane hydroxylase (TpOH) antibody, to control the absence of 5-HT neurons within these grafts. Sections through striatal grafts were immunostained for DARPP-32, to delineate their true striatal compartments (DARPP-32-positive patches). In addition, similar sections from the dorsal raphe were also treated for TpOH immunohistochemistry, as positive controls for the detection of 5-HT perikarya.

Depending on the antigen to be localized, two different staining procedures, adapted from the technique described by Beaulieu (6), were used. In all cases, they were applied to semi-thin sections that had been mounted onto gelatinized glass slides, dried at 60°C, and treated with saturated sodium hydroxyde in 100% alcohol during 30-45 min to etch the resin. The sections were rehydrated and permeated by a 10 min incubation in 0.0001% pronase E in 0.5 M Tris buffer. After rinsing, all subsequent steps were

achieved in a wet chamber and at room temperature, except for the incubation step with the primary antisera, which was performed at 4°C.

For TH and DARPP-32 immunostaining, the sections were rinsed during 10 min with 0.5M Tris buffer, pH7.4, containing 40% Triton X-100. They were exposed during 60 min to a solution of 12% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide and 40% Triton X-100 in Tris buffer. Then, they were incubated overnight with either the rabbit polyclonal antibody against TH (1:500, Pel-Freez, Rogers, AR) or the mouse monoclonal antibody against DARPP-32 (1:9000) in 2% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide and 40% Triton X-100 in Tris buffer. After extensive rinsing, the sections were incubated during 1 h with the appropriate secondary, biotinylated antibody, either goat anti-rabbit (1:100; Vector) or horse anti-mouse IgGs (1:200; Vector), rinsed and incubated during 2 h with an avidin-biotin-peroxydase complex (ABC, Vector). Finally, they were rinsed in Tris buffer and in 0.2 M potassium phosphate buffer, and reacted with diaminobenzidine in the presence of Nickel, Cobalt and H₂O₂ (2, 29).

Sections intended for TpOH immunohistochemistry were rinsed with sodium phosphate-buffered saline (PBS, 0.2 M, pH 7.4) and treated with 0.5% sodium borohydride during 30 min. After 3 x 10 min rinses in PBS containing gelatin (1:50; Amersham, IGSS grade), they were pre-incubated for 60 min in the same solution containing 1% sodium azide and 40% Triton X-100. They were then incubated during 2 days with a sheep polyclonal antibody against TpOH (1:1000, kindly donated by Dr. D. Weissman, CNRS, Lyon, FR (54)). Afterward, the sections were rinsed extensively with PBS-gelatin, incubated sequentially with biotinylated rabbit anti-sheep IgG (1:1000) and ABC (2 h each), and processed as above for the peroxidase reaction.

Quantification and statistical analysis

Following [³H]5-HT uptake and autoradiography, labeled axonal varicosities were visualized as small aggregates or clusters of silver grains, over a background of diffuse silver grains, as described previously (20, 21) (see Figures 4-6). These silver grain clusters could then be counted under the light microscope, as representing individual 5-HT axonal varicosities. The background of diffuse silver grains was therefore automatically subtracted, since only the grain clusters were registered. In the present study they were counted by computerized image analysis as described in more detail in reference (20). The silver grain clusters were selected by gray scale adjustment, and the number of binary features was counted and expressed as relative values per square millimeter of tissue section. We had previously shown that only the labeled 5-HT varicosities present in the most superficial micrometer of the sections were detected in the nuclear emulsion (21). Since the 5-HT varicosities have similar diameters in the host striatum and in the ventral mesencephalic or striatal grafts ((37) and unpublished results), no correction was made to extrapolate the results to volume. For striatal grafts, the 5-HT innervation of striatal and non-striatal compartments was quantified separately, using drawings of adjacent DARPP-32-immunostained semi-thin sections as guides, with the help of a drawing tube. Counting was performed on one semi-thin section (4 μ m-thick) from each of 2 brain slices (200 μ m-thick) across the middle of each of the selected grafts. On each section, the whole graft area was systematically scanned by the counting window, under the visual control of the operator. Sections were labeled in a coded fashion, for a double-blind analysis.

Statistical analyses were performed using the SPSS/Unix+4.0 statistical software. To stabilize the variances, we used the decimal logarithm of the original data obtained in numbers of 5-HT axonal varicosities per mm² of

graft section. We first compared the density of 5-HT innervation in the two kinds of grafts (mesencephalic and striatal) at the different ages of the recipients at the time of transplantation (P5, P15, adult), using a two-way analysis of variance with interaction (ANOVA). Other two-way ANOVAs were performed to compare mesencephalic grafts with either DARPP-32-positive or DARPP-32-negative areas of striatal grafts at the different age groups. We then compared the 5-HT innervation between the DARPP-32-positive and -negative compartments of striatal grafts at different recipient ages, by using a two-way ANOVA with repeated measures. When age was a significant variable, according to the ANOVA, *post-hoc* contrasts were performed to locate the significant differences among the age groups. Because of the unequal variances of the data between P5 recipients, a *post-hoc* Welch *t*-test was used to compare the 5-HT innervation of mesencephalic and DARPP-32-positive areas of striatal grafts in this age group. A *post-hoc* Student's *t*-test was therefore chosen to compare the 5-HT innervation between mesencephalic and DARPP-32-positive areas of striatal grafts in P15 recipients and in adults recipients. A significance level of $p = 0.01$ was chosen to take into account the fact that tests were repeated on a same set of data.

RESULTS

Immunohistochemical observations

The aspect of ventral mesencephalic grafts after TH staining (pre- and post-embedding procedures), was consistent with our previous descriptions (14, 19, 22, 38). In immature as well as in adult recipients, most DA neuronal perikarya were located near the periphery of the graft, some being present within the host striatum at a short distance from the graft/host interface ($<100 \mu\text{m}$) (Fig. 1A,2A,3A). In all cases, the graft did not contain any labeled 5-HT- or TpOH- immunostained neuronal perikarya. In contrast, many

TpOH-immunoreactive cell bodies were observed in sections of the dorsal and medial raphe which were used as positive controls for the sensitivity of the post-embedding immunostaining procedure in detecting 5-HT perikarya (not shown).

The mesencephalic grafts implanted in P5 recipients contained a loose network of immunostained 5-HT axons that appeared slightly less dense than in the host striatum (Fig. 1B). In contrast, mesencephalic grafts that had been implanted into P15 (Fig. 2B) or adult rats (Fig. 3B) contained very few 5-HT-immunopositive fibers. Occasional axons could be seen in some of the sections.

As visualized following DARPP-32-immunostaining, the striatal grafts were very similar in immature (P5, P15) and adult recipients (Fig. 1C, 2C, 3C). They were readily distinguishable from the host tissue in dark field microscopy (see Figs 1D, 2D, 3D). DARPP-32-positive patches represented 20-40% of the graft volume. Irrespective of the age group, sections immunostained for 5-HT showed a very heterogeneous network of labeled fibers within these grafts, but without any predilection for the peripheral or core regions of the grafts. After comparison of adjacent sections stained for either DARPP-32 or 5-HT, it was clear that both DARPP-32-positive and DARPP-32-negative compartments received 5-HT fibers, but DARPP-32-positive regions usually appeared to be more densely innervated.

As compared to grafts implanted into P5 and P15 recipients, which were not obviously different, striatal grafts in adult recipients usually appeared to receive a lower density of fibers (Figs. 1D, 2D, 3D).

There was no detectable difference in any type of graft that could be attributable to differences in survival time (2 - 4 months).

Autoradiographic data

After [^3H]5-HT uptake labeling, light microscope autoradiographs displayed numerous silver grain aggregates, or clusters, over a diffuse background of individual silver grains (see Figs. 4B,D, 5B,D, 6B,D). Such clusters, which have previously been shown to represent labeled 5-HT axonal varicosities under identical conditions (21), were found in all areas of the host cerebral cortex and striatum, with a distribution matching previous descriptions of the 5-HT innervation of these brain regions (see (3, 21, 50)). In mesencephalic and striatal grafts, the distribution of [^3H]5-HT labeled varicosities was also consistent with the staining pattern observed after 5-HT immunostaining (Figs. 4-6).

Data obtained after counting silver grain clusters in the different types of grafts and in the different recipient age groups are presented in Table 1. All animals included in this quantitative analysis were sacrificed after a uniform survival time of 5 months. As expected from the above qualitative descriptions following 5-HT immunohistochemistry, the density of 5-HT innervation showed a tendency ($p < 0.02$) to be higher in striatal grafts (pooled DARPP-32-positive and -negative areas) than in ventral mesencephalic grafts, independently of the age of the recipients. The difference was even stronger, and then significant, between the ventral mesencephalic grafts and the DARPP-32-positive patches of striatal grafts (ANOVA; $p < 0.005$). No significant interaction was detected between the effects of age groups and types of graft. *Post-hoc* tests showed statistically significant differences between graft types in P15 ($p < 0.01$) as well as in adult recipients ($p < 0.01$): the density of 5-HT innervation being respectively 10-fold and 5-fold denser in DARPP-32-positive patches of striatal grafts than in mesencephalic grafts. In P5 recipients, the density of 5-HT innervation in DARPP-32-positive patches was nearly 4-fold higher than in ventral mesencephalic grafts, but

this difference did not reach statistical significance. Accordingly, the DARPP-32-positive regions were 3 times more densely innervated than the DARPP-32-negative zones ($p < 0.01$; with no interaction between graft compartments and age groups). The ANOVA showed no significant difference in 5-HT innervation density between ventral mesencephalic grafts and DARPP-32-negative areas of striatal grafts, although the mean densities were respectively 3 and 2 times higher in DARPP-32 negative areas in P15 and adult recipients.

The ANOVA also revealed a significant difference in 5-HT innervation between recipient age groups, with all graft types confounded ($p < 0.01$). *Post hoc* tests revealed that the 5-HT innervation was significantly denser in P5 than in P15 or adult recipients for ventral mesencephalic as well as striatal grafts (pooled compartments), whereas the differences in 5-HT innervation between grafts in P15 and adult recipients did not reach statistical significance. It was noteworthy that, in mesencephalic grafts, the density of 5-HT fibers reached the same low level in P15 and adult recipients (81% reduction as compared to grafts in P5 recipients, for both age groups), whereas, in striatal grafts, density values decreased gradually after grafting in P15 and in adult recipients (grafting in P15 rats: -52% for DARPP-32-positive, -55% for DARPP-32-negative zones; grafting in adult rats: -74% for DARPP-32-positive, -71% for DARPP-32-negative areas). Interestingly, the percent decrease in 5-HT innervation density, as evaluated after comparison between grafts implanted into adult and P5 recipients, was very similar for mesencephalic grafts (-81%), and both DARPP-32-positive (-74%) and DARPP-32-negative compartments (-71%) of striatal grafts (total grafted tissue: -75%). The decrease in 5-HT innervation with increasing recipient age was also strikingly parallel between the two compartments of striatal grafts: about -50% in P15 recipients and -75% in adult recipients. Accordingly, the

differences in 5-HT innervation between either one of the DARPP-32-positive or the DARPP-32-negative compartments of the striatal grafts and the ventral mesencephalic grafts was proportionately highest among P15 recipients (respectively 10 and 3 times higher). However, these differences between the types of grafts in the relative decrease of 5-HT innervation between P5 and P15 recipient groups was not demonstrated statistically, since the ANOVA showed no significant interaction between age groups and types of grafts.

DISCUSSION

Affinity of host striatal 5-HT axons for grafted fetal neural tissue

The present immunohistochemical and autoradiographic results were highly convergent in terms of qualitative evaluation of the 5-HT innervation of grafts. Consistent with previous observations from our group (22, 38) and from others (32, 35), these results show that 5-HT axons in the host striatum have a better affinity for striatal grafts than for ventral mesencephalic grafts, which is particularly striking when grafts are implanted into juvenile or adult recipients. The autoradiographic quantitative study allowed to go deeper in the analysis, showing a heterogeneous 5-HT innervation in the striatal grafts, depending on the identity of the tissue compartments considered.

Using DARPP-32 as a marker of true striatal tissue (56), we estimated that no more than 20- 40% of the cross-sectional area of the grafts in this study corresponded to true striatal tissue (DARPP-32-positive areas). This was foreseeable, given that the dissected striatal primordium contains pallidal-like and pyramidal-like neurons, i.e. neurons that do not belong to the striatum proper (see (55)).

It has previously been shown that DA axons from the substantia nigra densely innervate only those areas that are striatal-like, i.e. that resemble

their normal target areas (55). In contrast, afferents from the cerebral cortex, the thalamus or the 5-HT raphe nuclei were reported to innervate these grafts without any predilection for DARPP32-positive or -negative compartments (55). The present results contrast with these reports regarding 5-HT afferents, since immunolabelled or radiolabelled axons or terminals showed a preference for DARPP-32-positive areas, revealing a higher affinity of these fibers for the true striatal portions of the grafts.

It is well known that 5-HT projections from the mesencephalic raphe are highly divergent. For example, previous studies using double retrograde axonal tracing revealed the existence of projections from raphe neurons to both the substantia nigra and the striatum (30, 53). It then would be interesting to determine whether host 5-HT axons that penetrate the mesencephalic grafts (via the host striatum) are those that have collaterals to the substantia nigra. If this is the case, and if it may be shown that 5-HT axons projecting into the DARPP-32-negative areas in striatal grafts come from neurons that also innervate the cerebral cortex or pallidum, it would mean that host 5-HT axons possess a highly selective, although multiple, affinity for their normal target tissue, contrasting with the view that their diffuse mode of projection would render them less selective (51).

The importance of the target identity in 5-HT reinnervation patterns has previously been shown after spontaneous as well as graft-induced reinnervation in CNS. It has been extensively illustrated that, after selective neurotoxic denervation using 5,6- or 5,7-DHT, in which case no glial scar occurs, the axotomized 5-HT neurons are able to regrow and reestablish some of their original connections. It has been pointed out, however, that the extent of reinnervation may depend on the target structure considered. For example, 5,6-DHT axotomy at the brain stem or higher spinal cord level is followed by a rapid regrowth of 5-HT fibers over long distances which results

in an hyperinnervation of certain territories such as the inferior olive and an incomplete reinnervation of the cord, even after 8 months (10). Similarly, it has been reported that, after 5,7-DHT denervation, the dorsal hypothalamus is the site of a 5-HT hyperinnervation (26), while the suprachiasmatic nucleus remains definitively hypoinnervated (11).

Graft-derived 5-HT reinnervation patterns are also clearly dependent on the target region. This has been well exemplified in a study involving transplantation of fetal raphe neurons into the basal hypothalamus of rats previously subjected to 5,7-DHT denervation. As in the case of spontaneous reinnervation, the suprachiasmatic nucleus was found to be poorly reinnervated while the supraoptic nucleus was hyperinnervated by 5-HT fibers from the same transplants (17). Other studies with fetal raphe transplants have also illustrated 5-HT hyperinnervation patterns in the striatum (24) and the hippocampus (16, 18, 23) after 5-HT denervation.

Previous transplant studies had also clearly shown that grafted 5-HT neurons have a higher affinity for, i.e. innervate more profusely, their normal targets (23-25).

Influence of synaptic incidence on the 5-HT ingrowth into grafted tissue

There are experimental data to support the view that the mode of termination of the 5-HT axons in a given region could be determinant in the reinnervation process (10, 57). Indeed, complete spontaneous 5-HT reinnervation (or even hyperinnervation) has been disclosed in brain areas where 5-HT axonal varicosities normally establish few synaptic contacts, while a limited extent or no reinnervation at all have been observed in regions characterized by a high incidence of synaptic junctions, such as the subcommissural organ (59). According to this view, the limited ingrowth of adult 5-HT fibers into the mesencephalic grafts could be related to the

relatively high synaptic incidence of the 5-HT varicosities in the normal rat substantia nigra (36).

However, exceptions to this general rule have been emphasized. One particular case is the subcommissural organ which receives many 5-HT synapses and is not spontaneously reinnervated after neurotoxic lesioning (see above, (59)), but is the site of a profuse 5-HT reinnervation by fetal raphé transplants (52). In addition, graft-derived 5-HT fibers form hypo- and hyperinnervation patterns, respectively, in the suprachiasmatic and the supraoptic nuclei, even though the endogenous 5-HT innervation was found to exhibit comparable synaptic incidences in both nuclei (12). Thus, the relationship between innervation density and synaptic incidence does not account for all aspects of the 5-HT reinnervation process. Specific target-derived chemotactic or haptotactic molecules must be determinant in promoting 5-HT axonal ingrowth (5, 60), and maintenance (7). The present observations therefore suggest that subpopulations of 5-HT axons innervating the host striatum bear receptors to more than one of these molecules, allowing the axons to grow into grafted tissue from other brain regions.

Decreasing capacity of maturing host 5-HT axons to innervate neural grafts

The amount of 5-HT innervation produced by the host 5HT neurons in any type of grafted tissue (ventral mesencephalic, DARPP-32-positive or DARPP-32-negative) decreased in similar proportions (70-80%), when transplantation was performed in adult rather than in newborn rats. This suggests that 5-HT neurons undergo a substantial decrease in their intrinsic growth capacity during their postnatal maturation.

Nevertheless, both our immunohistochemical observations and autoradiographic data suggest that the capacity of host 5-HT axons to innervate ventral mesencephalic grafts, as compared to striatal grafts, decreases more rapidly. Indeed, the mesencephalic grafts did not receive

greater numbers of fibers after implantation in P15 than in adult recipients. These results confirm earlier immunohistochemical observations (38). Although admittedly still not confirmed by the statistical analyses (no interaction between recipient age groups and type of grafts according to the ANOVA; but such a demonstration would require much larger experimental groups than practically feasible with the present autoradiographic quantitative approach), this potential difference in the behavior of 5-HT axons towards mesencephalic and striatal grafts would be meaningful, since it would suggest that the decrease with age in graft innervation is not solely due to an intrinsic loss of growth capacity, but also to a change in specific recognition of target tissue, i.e. changes in the expression of cell-cell or cell-matrix interaction molecules (see (15)). In such an eventuality, the decreased growth capacity of 5-HT axons might be a reversible process. Interestingly, during postnatal development, the 5-HT innervation develops earlier in the substantia nigra than in the neostriatum (33, 38).

Other factors, linked to the host immune reaction, could also affect the capacity of maturing host 5-HT axons to innervate neural grafts. The glial scar that is known to be induced by the transplantation procedure at the site of grafting (1) might constitute a physical or molecular barrier between the host and graft tissues, and impede the growth of some types of axons (34, 48, 49). Indeed, recent results show that implantation of ventral mesencephalic tissue into the striatum of neonatal recipients, or homotypic striatal grafts in adult recipients, induce less glial scarring than heterotypic ventral mesencephalic grafts in adults (47). However, the present data also show that there is a clear difference in the degree of 5-HT innervation within the striatal grafts, between the DARPP-32-positive and -negative areas; the latter being innervated at a density comparable to ventral mesencephalic grafts. This observation argues against the glial scar as being primarily responsible

for the differences in 5-HT innervation between different types of grafted tissues or the different age groups.

Conclusions

Intracerebral neural transplantation remains a method of choice to study the axonal growth capacity of postnatal and adult neurons. Since adult neurons can hardly be studied *in vitro*, or after grafting, transplantation of fetal neural tissue can be used to examine the capacity of adult host neurons to grow into the grafts. The present quantitative results demonstrate two important aspects determining 5-HT axonal growth in the postnatal CNS: 5-HT axons innervating the host neostriatum display a higher affinity for striatal grafts, which more closely match their normal target tissue, and manifest a proportionate decrease, in adults, in their capacity to invade grafted neural tissue from any tested brain region. In addition, our observations indicate that their capacity to grow into fetal ventral mesencephalic tissue might decrease more rapidly, suggesting a role for interactions with the extracellular substrate, and therefore involving some regulation of cell surface receptors that might be reversible.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Drs. M. Geffard, E.L. Gustafson and D. Weissman for providing primary antibodies. We also thank Mr. G. Lambert for his expert photographic work and Dr. M.D. Franco and Mr. E. Rogers for their critical assessment of this manuscript. This study was supported by the Canadian Medical Research Council (MRC, MT 10982), and a cooperation program between the *Ministère des Affaires internationales du Québec* and the *Ministère des Affaires étrangères de France* (G.D./O.B.). P. P. was supported by a studentship from the *Groupe de recherche sur le système nerveux central* (GRSNC, Québec FCAR Grant), H. M. by fellowships from

the GRSNC and the MRC and G. D. by a scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec*.

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. Audet, M. A., Descarries, L., and Doucet, G. 1989. Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex. *J. Chem. Neuroanat.* **2**: 29-44.
4. Azmitia, E. C., Perlow, M. J., Brennan, M. J., and Lauder, J. M. 1981. Fetal raphe and hippocampal transplants into adult and aged C57BL/6N mice: A preliminary immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* **7**: 703-710.
5. Azmitia, E. C., and Whitaker-Azmitia, P. M. 1987. Target cell stimulation of dissociated serotonergic neurons in culture. *Neuroscience* **20**: 47-63.
6. Beaulieu, C. 1994. Estimation of the number and size of GABA-containing neurons in the cerebral cortex. *Neurosci. Protocols* **94-080-02**: 1-11.
7. Bernstein-Goral, H., and Bregman, B. S. 1995. Withdrawal of transient serotonergic projections from non-target transplants is regulated by the availability of neurotrophic factors. *Soc. Neurosci. Abstr.* **21**: 1057.

8. Björklund, A., and Stenevi, U. 1979. Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **59**: 62-100.
9. 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.
10. Björklund, A., Wiklund, L., and Descarries, L. 1981. Regeneration and plasticity of central serotonergic neurons: a review. *J Physiol Paris* **77**: 247-255.
11. Bosler, O., Vuillon-Cacciuttolo, G., and Saïdi, H. 1992. Long-term serotonin reinnervation of the suprachiasmatic nucleus after 5,7-dihydroxytryptamine axotomy in the adult rat. *Neurosci. Lett.* **143**: 159-163.
12. Boulaich, S., Daszuta, A., Geffard, M., and Bosler, O. 1994. Synaptic connectivity of serotonin graft efferents in the suprachiasmatic and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *Exp. Brain Res.* **101**: 353-364.
13. Bregman, B. S. 1987. Spinal cord transplants permit the growth of serotonergic axons across the site of neonatal spinal cord transection. *Dev. Brain Res.* **34**: 265-279.
14. 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.
15. Cohen, J., Nurcombe, V., Jeffrey, P., and Edgar, D. 1989. Developmental loss of functional laminin receptors on retinal ganglion cells is regulated by their target tissue, the optic tectum. *Development* **107**: 381-87.
16. Daszuta, A., Chazal, G., Garcia, S., Oleskevich, S., and Descarries, L. 1991. Ultrastructural features of serotonin neurons grafted to adult rat

hippocampus - An immunocytochemical analysis of their cell bodies and axon terminals. *Neuroscience* **42**: 793-811.

17. Daszuta, A., Marocco, C., and Bosler, O. 1991. Serotonin reinnervation of the suprachiasmatic nucleus by intrahypothalamic fetal raphe transplants, with special reference to possible influences of the target. *Eur. J. Neurosci.* **3**: 1330-1337.
18. Daszuta, A., Strecker, R. E., Brundin, P., and Björklund, A. 1988. Serotonin neurons grafted to the adult rat hippocampus. I. Time course of growth as studied by immunohistochemistry and biochemistry. *Brain Res.* **458**: 1-19.
19. Doucet, G., Brundin, P., Descarries, L., and Björklund, A. 1990. Effect of prior dopamine denervation on survival and fiber outgrowth from intrastriatal fetal mesencephalic grafts. *Eur. J. Neurosci.* **2**: 279-290.
20. Doucet, G., and Descarries, L. 1993. Quantification of monoamine innervations by light microscopic autoradiography following tritiated monoamine uptake in brain slices. *Neurosci. Protocols* : 93-050-09-01-15.
21. Doucet, G., Descarries, L., Audet, M. A., Garcia, S., and Berger, B. 1988. Radioautographic method for quantifying regional monoamine innervations in the rat brain: Application to the cerebral cortex. *Brain Res.* **441**: 233-259.
22. 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.
23. Foster, G. A., Schultzberg, M., Gage, F. H., Björklund, A., Hökfelt, T., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J., Visser, T. J., and Emson, P. C. 1988. Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphé neurones after transplantation to the

adult rat central nervous system. II. Grafts to the hippocampus. *Exp. Brain Res.* **70**: 225-241.

24. Foster, G. A., Schultzberg, M., Gage, F. H., Björklund, A., Hökfelt, T., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J., Visser, T. J., and Emson, P. C. 1988. Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphé neurones after transplantation to the adult rat central nervous system. III. Grafts to the striatum. *Exp. Brain Res.* **70**: 242-255.

25. Foster, G. A., Schultzberg, M., Gage, F. H., Björklund, A., Hökfelt, T., Normes, H., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J., and Visser, T. J. 1985. Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphé neurones after transplantation to the adult rat central nervous system. I. Grafts to the spinal cord. *Exp. Brain Res.* **60**: 427-444.

26. Frankfurt, M., and Azmitia, E. 1984. Regeneration of serotonergic fibres in the rat hypothalamus following unilateral 5,7-dihydroxytryptamine injection. *Brain Res.* **298**: 273-282.

27. Frankfurt, M., and Beaudet, A. 1988. Reinnervation of dopamine neurons by regenerating serotonin axons in the rat medial zona incerta: A combined radioautographic and immunocytochemical ultrastructural study. *Exp. Brain Res.* **72**: 473-480.

28. Geffard, M., Tuffet, S., Peuble, L., and Patel, S. 1988. Production of antisera to serotonin and their metabolites and their use in immunocytochemistry. Pages 1-23 in N. N. Osborne and M. Hamon, Eds., *Neuronal Serotonin*. Wiley, London.

29. 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.

30. Imai, H., Steindler, D. A., and Kitai, S. T. 1986. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **243**: 363-380.
31. Jacomy, H., and Bosler, O. 1996. Intrinsic organization and monoaminergic innervation of the suprachiasmatic nucleus transplanted to adult rats. A light- and electron-microscopic study. *J. Neurocytol.* **25**: 659-673.
32. 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.
33. Lidov, H. G. W., and Molliver, M. E. 1982. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.* **8**: 389-430.
34. Liuzzi, F. L., and Lasek, R. J. 1987. Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* **237**: 642-645.
35. Lu, S. Y., Shipley, M. T., Norman, A. B., and Sanberg, P. R. 1991. Striatal, ventral mesencephalic and cortical transplant into the intact rat striatum-A neuroanatomical study. *Exp. Neurol.* **113**: 109-130.
36. Moukhles, H., Bosler, O., Bolam, J. P., Vallée, A., Umbriaco, D., Geffard, M., and Doucet, G. 1997. Serotonin innervation in the rat substantia nigra: quantitative data at the light and electron microscopic levels. *Neuroscience* **76**: 1159-1171.
37. Moukhles, H., Geffard, M., and Doucet, G. 1996. Ultrastructure of graft- or host- derived 5-HT innervations in ventral mesencephalic grafts implanted into the adult or newborn rat striatum. *Soc. Neurosci. Abstr.* **22**: 47.
38. 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.

39. Mrini, A., Moukhles, H., Bosler, O., Jacomy, H., and Doucet, G. 1995. Efficient immunodetection of protein antigens in glutaraldehyde-fixed brain tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **43**: 1285-1291.

40. Nakao, N., Odin, P., and Brundin, P. 1994. Selective sub-dissection of the striatal primordium for cultures affects the yield of DARPP-32-containing neurones. *Neuroreport* **5**: 1081-1084.

41. Nothias, F., and Peschanski, M. 1990. Homotypic fetal transplants into an experimental model of spinal cord neurodegeneration. *J. Comp. Neurol.* **301**: 520-34.

42. Ouimet, C. C., Miller, P. E., Hemmings, H. C. J., Wallaas, 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.

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

44. Pierret, P., Moukhles, H., Campistron, G., and Doucet, G. 1994. Differential affinity of host serotonin axons for intrastriatal grafts of different anatomical origin. *Soc. Neurosci. Abstr.* **20**: 1699.

45. Pierret, P., Quenneville, N., Vandaele, S., Abbaszadeh, R., Lanctôt, C., Crine, P., and Doucet, G. 1998. Trophic and tropic effect of striatal astrocytes on co-grafted mesencephalic dopamine neurons. *J. Neurosci. Res.* **51**: 23-40.

46. Pierret, P., Vallée, A., and Doucet, G. 1997. Selective innervation of different types of intrastriatal neural grafts by host serotonin neurons:

- Quantitative assessment of the effect of host age and of the role of graft astrocytes. *Soc. Neurosci. Abstr.* **23**: 1454.
47. Quenneville, N., Pierret, P., and Doucet, G. 1995. Astrocytic reaction to the implantation of fetal substantia nigra into the neostriatum of newborn or adult rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* **21**: 316.
48. Reier, P. J., Stensaas, L. J., and Guth, L. 1983. The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. Pages 163-195 in C. C. Kao, R. P. Bunge, and P. J. Reier, Eds., *Fundamentals of spinal cord reconstruction*. Raven, New York.
49. Smith, G. M., Miller, R. H., and Silver, J. 1986. Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation. *J. Comp. Neurol.* **251**: 23-43.
50. Soghomonian, J. J., Doucet, G., and Descarries, L. 1987. Serotonin innervation in adult rat neostriatum. I. Quantified regional distribution. *Brain Res.* **425**: 85-100.
51. Sotelo, C., and Alvarado-Mallart, R.-M. 1985. Cerebellar transplants: Immunocytochemical study of the specificity of Purkinje cells inputs and outputs. Pages 205-215 in A. Björklund and U. Stenevi, Eds., *Neural Grafting in the Mammalian CNS*. Elsevier, Amsterdam.
52. Ueda, S., Ihara, N., Tanabe, T., and Sanao, Y. 1988. Reinnervation of serotonin fibers in the denervated rat subcommissural organ by fetal raphe transplants. An immunohistochemical study. *Brain Res.* **444**: 361-365.
53. van der Kooy, D., and Hattori, T. 1980. Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: A fluorescent retrograde double study in the rat. *Brain Res.* **186**: 1-7.
54. Weissmann, D., Belin, M. F., Aguera, M., Meunier, C., Maitre, M., Cash, C. D., Ehret, M., Mandel, P., and Pujol, J. F. 1987.

Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain.

Neuroscience **23**: 291-304.

55. Wictorin, K. 1992. Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants. *Prog. Neurobiol.* **38**: 611-639.
56. Wictorin, K., Ouimet, C. C., and Björklund, A. 1989. Intrinsic organization and connectivity of intrastriatal striatal transplants in rats as revealed by DARPP-32 immunohistochemistry: specificity of connections with the lesioned host brain. *Eur. J. Neurosci.* **1**: 690-701.
57. Wiklund, L., and Björklund, A. 1980. Mechanisms of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence histochemical observations. *Brain Res.* **191**: 129-160.
58. Wiklund, L., Descarries, L., and Møllgård, K. 1981. Serotonergic axon terminals in the rat dorsal accessory olive: Normal ultrastructure and light microscopic demonstration of regeneration after 5,6-dihydroxytryptamine lesioning. *J. Neurocytol.* **10**: 1009-1027.
59. Wiklund, L., and Møllgård, K. 1979. Neurotoxic destruction of the serotonergic innervation of the rat subcommissural organ is followed by reinnervation through collateral sprouting of non-monoaminergic neurons. *J. Neurocytol.* **9**: 469-480.
60. Zhou, F. C., and Azmitia, E. C. 1990. Neurotrophic factor for serotonergic neurons prevents degeneration of grafted raphe neurons in the cerebellum. *Brain Res.* **507**: 301-308.

TABLE 1. Density of 5-HT innervation in ventral mesencephalic and striatal grafts, 5 months after implantation into the striatum of P5, P15 or adult rats, as quantified on autoradiographs following *in vitro* uptake of [³H]5-HT.

	P5	P15	Adult
		**	
	**		
VM grafts	270 ± 129 (n= 3)	52 ± 18 (n= 2)	51 ± 17 (n= 4)
Striatal grafts	444 ± 231 (n= 2)	215 ± 68 (n= 4)	114 ± 31 (n= 5)
DARPP-32 +	1030 ± 31	493 ± 96	268 ± 70
DARPP-32 -	345 ± 186	155 ± 57	100 ± 31

**

Values represent mean numbers of silver grain clusters per mm² of graft sectional area (± SEM). n: number of grafts. The detailed results of the statistical analyses (ANOVA) are presented in the text. Only significant differences demonstrated by *post-hoc* tests are presented in this table.

Horizontal brackets indicate significant differences between P5 and P15 or adult recipients, respectively (**p<0.01; ANOVA, *post-hoc* contrasts), with pooled graft types. Vertical brackets indicate significant differences between VM grafts and the DARPP-32-positive compartments of striatal grafts, in P15 as well as adult recipients (**p<0.01; *post-hoc* Student's *t*-test).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Grafts implanted in P5 recipients. A) Section through a ventral mesencephalic graft immunostained for TH, in bright field. On top, is corpus callosum. The host neostriatum is easily recognized by its multiple fascicles of the internal capsule (asterisk). B) Section adjacent to the one in A, showing 5-HT-immunostained axons in dark field, which appear as white varicose fibers inside the graft. The asterisks in A and B point to the same fascicle of the host internal capsule. C) Section through a striatal graft immunostained for DARPP-32, as a marker for striatal neurons. Asterisks point to regions of the striatal graft which are immunonegative for DARPP-32. D) Section adjacent to C, immunostained for 5-HT. Note the heterogenous distribution of 5-HT fibers, even among DARPP-32-positive regions (arrows). Note that the graft can easily be distinguished from the host tissue in dark field. The arrows and asterisks in C and D point to the same regions of the graft. Scale bar: 100 μ m.

Figure 2: Grafts in P15 recipients. A and B) Ventral mesencephalic graft immunostained in adjacent sections for TH or 5-HT, respectively. Frame in A shows the approximate area of the picture in B, which was magnified further. Arrow in B point to on of the few 5-HT fibers present in the inner border of the graft. Asterisks in A and B mark axon fascicles that are common to both sections. C and D) Adjacent sections through a striatal graft, immunostained respectively for DARPP-32 and 5-HT. The graft occupies these pictures almost entirely: a small capillary (c), in the lower left corner, is at the graft-host border. Note the strong heterogeneity of the 5-HT innervation in both DARPP-32 -positive and -negative compartments. Magnification in A,C,D (scale bar in D) : 100 μ m. Scale bar in B : 100 μ m.

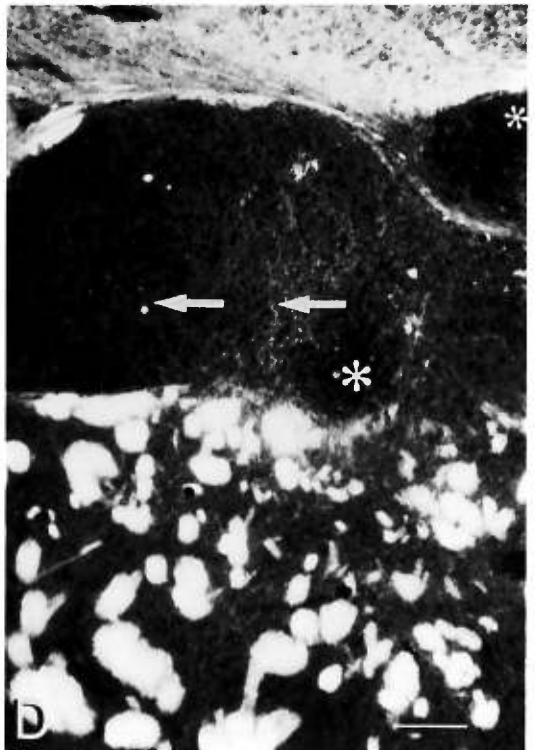
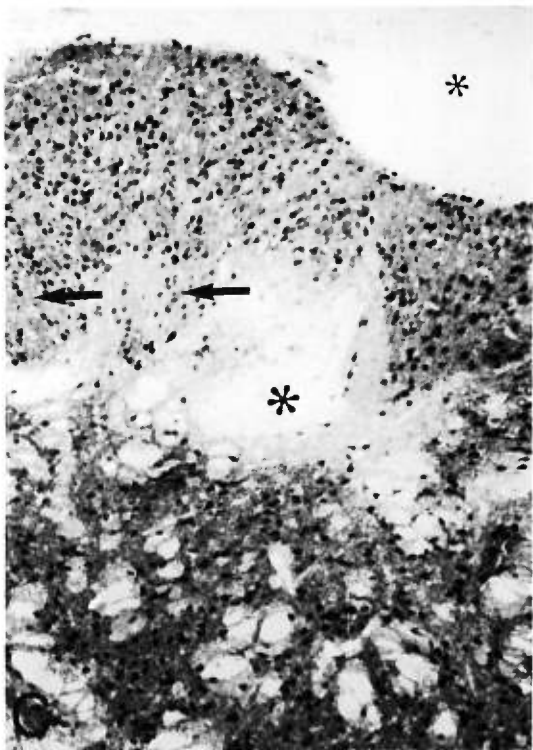
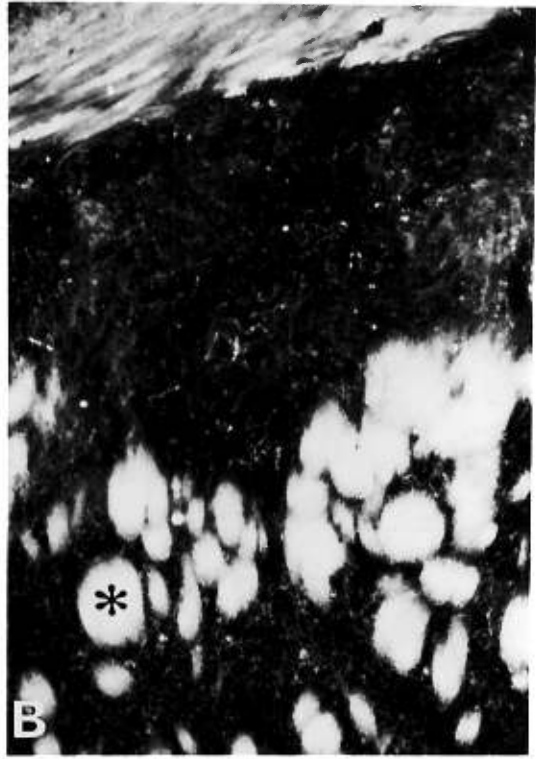
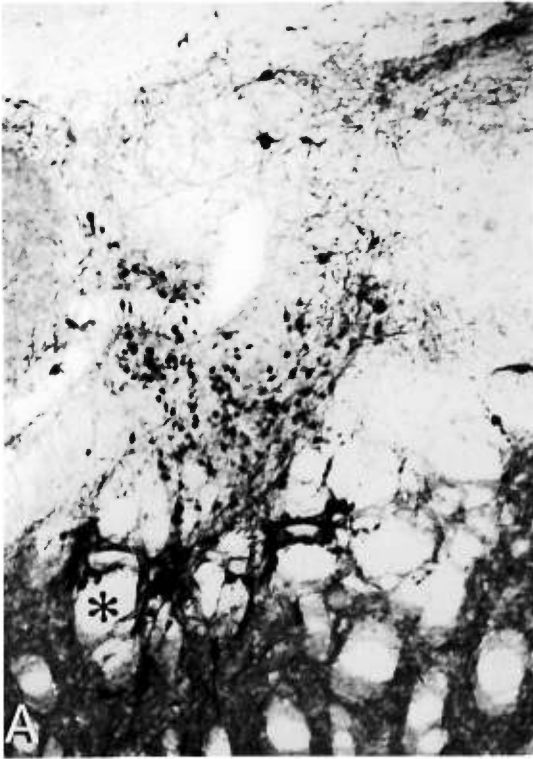
Figure 3: Grafts implanted in adult recipients. A and B) Ventral mesencephalic graft stained in adjacent sections for TH and 5-HT. The frame in A corresponds to the field displayed in B. The asterisks in A and B mark axon fascicles common to both sections. Arrows in B point to 5-HT-immunoreactive fibers at the graft-host border. Despite the strong diffraction inside the graft, it is clear that 5-HT axons are very rare. C and D) Striatal graft immunostained in alternate sections for DARPP-32 and 5-HT. Most of the field is occupied by the graft. The graft and host tissues are more easily distinguished in D, by the internal capsule fascicles which are brightly refringent in dark field. A capillary (c) and an internal capsule fascicle (asterisk) are marked at the graft-host border. Scale bar: 100 μm .

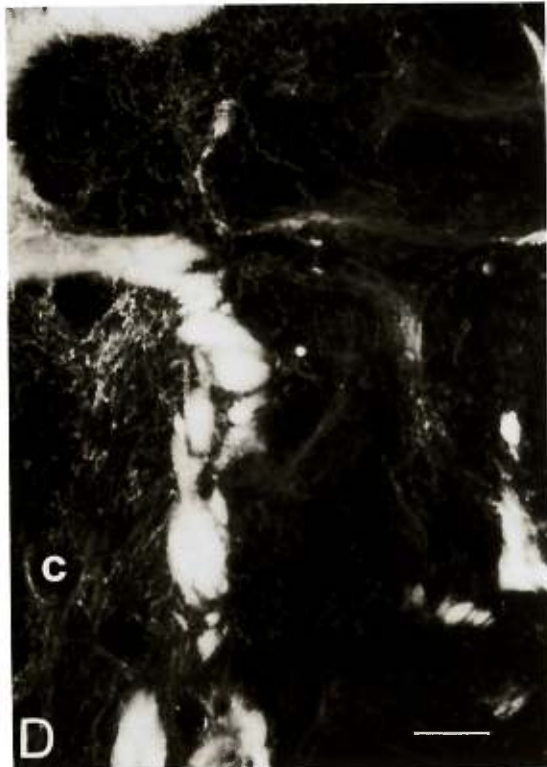
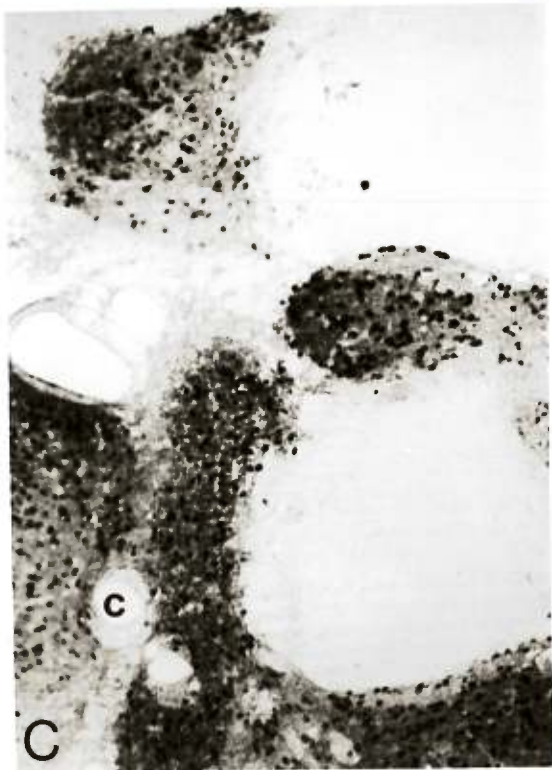
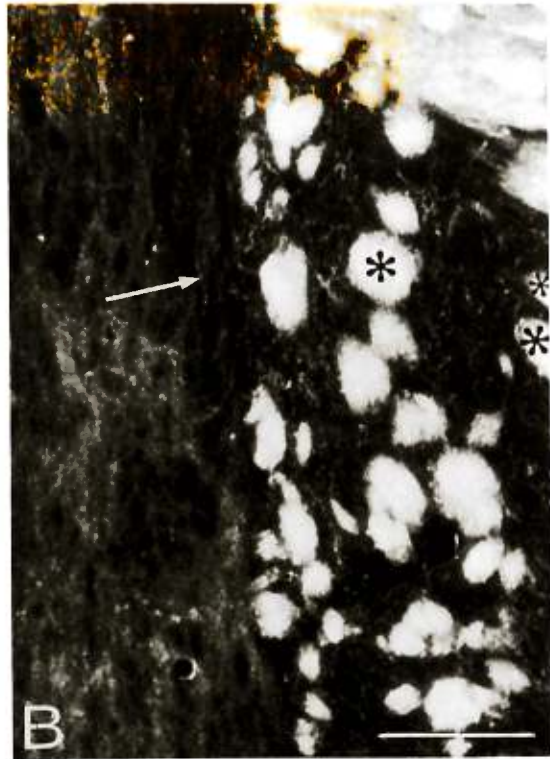
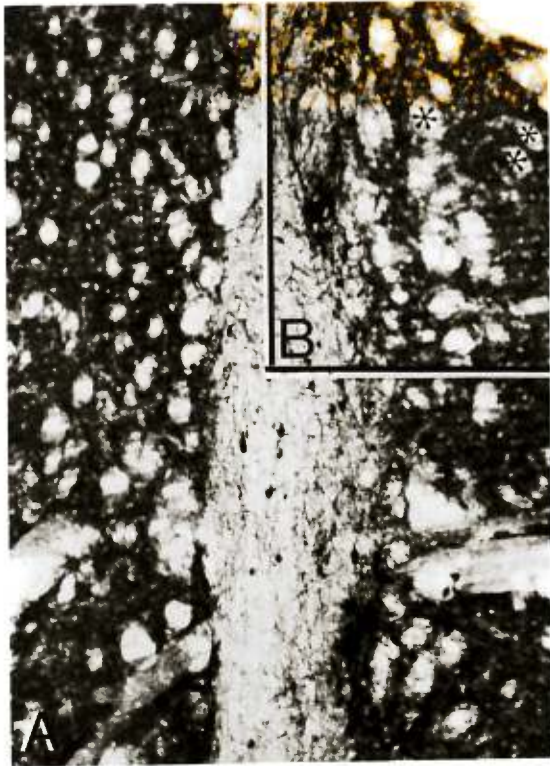
Figure 4: Grafts implanted in P5 recipients and treated for post-embedding immunohistochemistry (A,C) or for [^3H]5-HT autoradiography in 4 μm -thick sections of resin embedded tissue (B,D). A) Section of ventral mesencephalic graft immunostained for TH. The arrow indicates one of the DA cell bodies; asterisks point to axon fascicles in the host striatum. B) In a nearby section, a large number of silver grain clusters (e.g., arrows), representing labelled 5-HT axon terminals (or varicosities), are present inside the graft. C) Striatal graft immunostained for DARPP-32. D) Radiolabelled 5-HT axons concentrate in the DARPP-32-positive region of the graft. The arrows in C and D point to the same region of the graft. Scale bar: 100 μm .

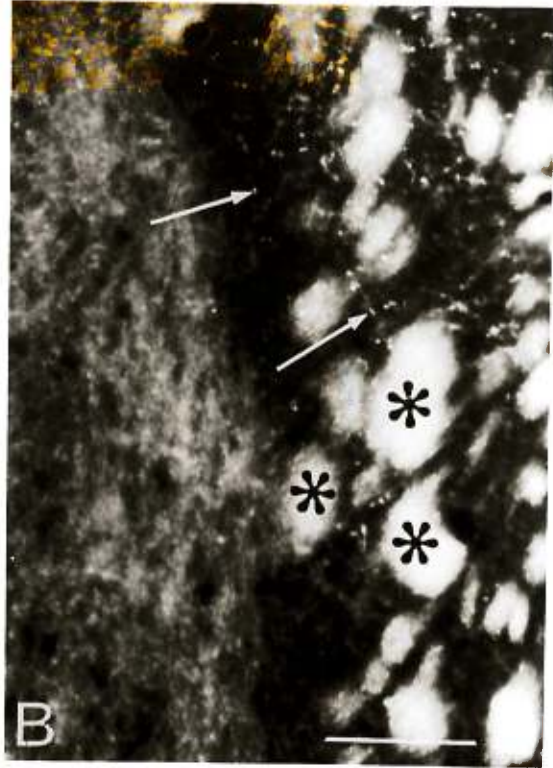
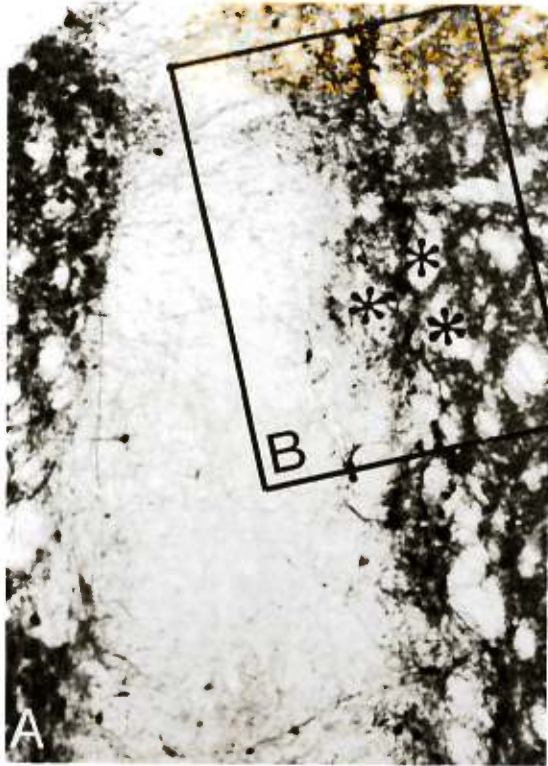
Figure 5: Grafts implanted in P15 recipients as visualized by post-embedding immunohistochemistry (A,C) and [^3H]5-HT autoradiography (B,D). A and B) Adjacent sections through a ventral mesencephalic graft. Asterisks point to myelin fascicles in the host striatum, with the graft on the left. Many DA cell bodies have infiltrated the host striatal tissue (A). Many 5-HT axons terminals (silver grain clusters) are detected in the host, but almost none in

the graft (B). C and D) Striatal graft visualized in adjacent sections by DARPP-32 immunohistochemistry and [³H]5-HT autoradiography, respectively. Scale bar: 100 μm.

Figure 6: Grafts implanted in adults. Ventral mesencephalic grafts visualized by post-embedding immunohistochemistry for TH (A) or DARPP-32 (C), respectively. The larger black profiles represent immunostained cell bodies in both pictures. B and D show the respective adjacent sections after [³H]5-HT autoradiography. Asterisks in A and B indicate the same axonal fascicles in the host striatum; c: points to a capillary present in both C and D. Scale bar : 100 μm.

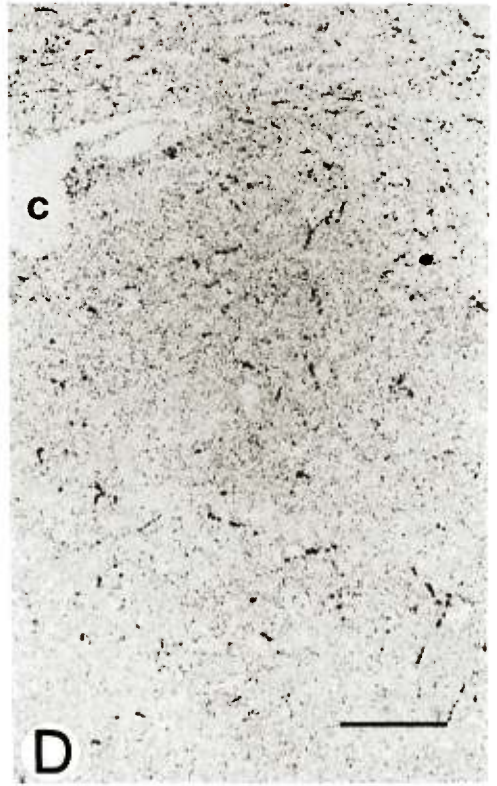
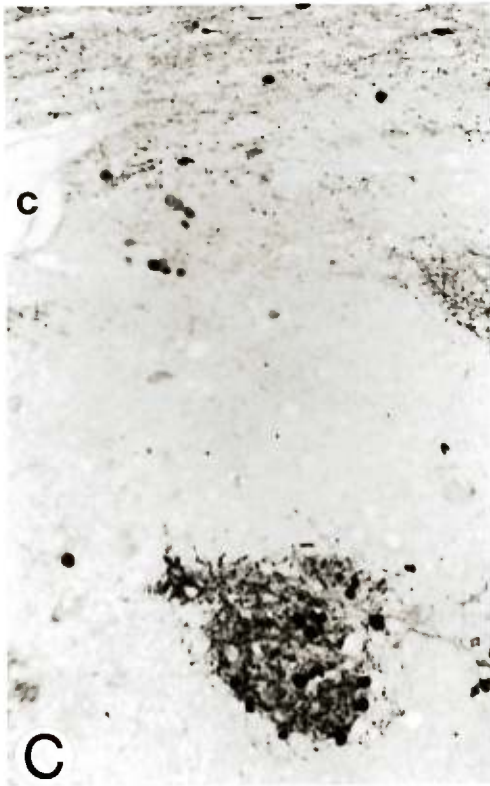












Chapitre 3:

RÔLE DES ASTROCYTES CO-GREFFÉS DANS LE GUIDAGE DES AXONES 5-HT

Effet promoteur de la co-transplantation d'astrocytes corticaux ou striataux sur l'innervation du tissu mésencéphalique ventral par les neurones sérotoninergiques de l'hôte

par

**Philippe Pierret, Annie Vallée, Olivier Bosler, Roya Abbaszadeh,
Anne-Marie Davis, Guy Doucet**

Résultats préliminaires

**EFFET PROMOTEUR DE LA CO-TRANSPLANTATION D'ASTROCYTES
CORTICAUX OU STRIATAUX SUR L'INNERVATION DE GREFFES DU
TISSU MÉSENCÉPHALIQUE VENTRAL PAR LES NEURONES
SÉROTONINÉRIQUES DE L'HÔTE.**

par

***P. Pierret, *A. Vallée, §O. Bosler, *R. Abbaszadeh, *A. M. Davis, *G. Doucet**

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

§Institut Fédératif Jean-Roche, INSERM, U297, Faculté de médecine Nord, Marseille, France

Correspondance: Dr. Guy Doucet, Département de pathologie, Université de Montréal, adresse comme ci-dessus; Téléphone: (514) 343-6255; Télécopieur: (514) 343-5755; Courrier électronique: doucetg@ere.umontreal.ca

Mots clés: Guidage axonal, Neurones sérotoninergiques, Astrocytes, Transplantation neurale, Quantification

Résumé

Les neurones à sérotonine (5-HT) montrent généralement une bonne capacité à innover des greffes intracérébrales de tissu nerveux fœtal. Toutefois, des greffes de mésencéphale ventral fœtal implantées dans le striatum du rat adulte sont très peu innervées par les fibres 5-HT de l'hôte, en contraste avec des greffes de même nature implantées chez le nouveau-né. Si la greffe est composée de tissu striatal fœtal, elle reçoit en revanche une innervation 5-HT assez dense provenant d'hôtes aussi bien adultes que nouveau-nés; l'innervation restant cependant plus importante avec les receveurs néonataux. Pour savoir si l'affinité variable des axones 5-HT adultes pour différents types de greffes pouvait être liée à une hétérogénéité phénotypique régionale des astrocytes, nous avons co-transplanté dans le striatum du rat adulte du tissu mésencéphalique ventral fœtal avec des astrocytes mis en culture à partir du cortex cérébral, du striatum ou du mésencéphale ventral néonataux. Deux à 5 mois plus tard, l'innervation 5-HT des greffes a été évaluée par immunohistochimie, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la 5-HT, et par autoradiographie après capture *in vitro* de 5-HT tritiée. L'immunohistochimie a montré que les greffes témoins de tissu mésencéphalique seul et les co-greffes enrichies en astrocytes du mésencéphale étaient similairement très peu innervées par les fibres 5-HT de l'hôte. Les co-greffes contenant des astrocytes du striatum présentaient une innervation 5-HT généralement supérieure à celle des greffes simples. Enfin, les co-greffes incorporant des astrocytes du cortex cérébral présentaient dans tous les cas une innervation 5-HT supérieure, parfois largement, à celle des greffes témoins. Des co-greffes de tissu striatal fœtal incorporant des astrocytes mésencéphaliques ont aussi été effectuées et ont montré une aussi bonne innervation 5-HT que des greffes striatales témoins, confirmant l'absence d'effet inhibiteur des astrocytes mésencéphaliques sur la croissance axonale 5-HT. L'autoradiographie a aussi montré une innervation 5-HT plus dense, en général, dans les co-greffes contenant des astrocytes striataux ou des astrocytes corticaux que dans les greffes témoins. Ces résultats indiquent que l'addition d'astrocytes peut promouvoir la croissance des fibres 5-HT dans des co-greffes intrastriatales de tissu mésencéphalique ventral fœtal. En outre, cet effet paraît dépendre de l'origine neuroanatomique des astrocytes co-greffés.

Introduction

Les neurones à sérotonine (5-HT) sont reconnus pour leur grande plasticité anatomique dans le système nerveux central (SNC) des mammifères (Björklund and Stenevi 1979; Björklund et al. 1981). Même chez l'adulte, ils sont capables de régénérer leur axone sur de longues distances, suite à une axotomie chimique proximale par action de drogues neurotoxiques telles que la 5,6- ou la 5,7- dihydroxytryptamine (Wiklund and Björklund 1980; Björklund, et al. 1981) ou après la lésion d'autres populations de neurones (Zhou et al. 1991). Ils présentent en outre la capacité d'innervier des transplants homotypiques ou hétérotypiques de tissu nerveux foetal implanté dans le SNC adulte, mais la densité d'innervation semble être fonction d'une part de l'origine anatomique des transplants (Azmitia et al. 1981; Nothias and Peschanski 1990; Labandeira-Garcia et al. 1991; Lu et al. 1991; Jacomy and Bosler 1996; Pierret et al. 1997b) et, d'autre part, de l'âge de l'hôte au moment de l'implantation (Bregman 1987; Pierret et al. 1997b).

Nos propres données ont montré que des fibres 5-HT provenant de l'hôte ne peuvent innervier de manière notable le tissu mésencéphalique foetal que lorsque celui-ci est implanté dans le striatum de rats âgés de moins de 14 jours. Le même tissu, greffé chez l'adulte, ne montre pas d'innervation 5-HT sauf si des neurones 5-HT, résultat d'une co-transplantation, sont présents au sein des greffons (Doucet et al. 1989; Mounir et al. 1994). En revanche, des greffes intrastriatales de striatum foetal reçoivent une innervation 5-HT de l'hôte aussi bien chez le rat adulte que chez le rat immature (Labandeira-Garcia, et al. 1991; Lu, et al. 1991; Pierret, et al. 1997b), quoique celle-ci soit plus importante après greffe chez le nouveau-né (Pierret, et al. 1997b).

Ces données suggèrent qu'il existe une affinité différentielle des fibres 5-HT de l'hôte adulte pour du tissu nerveux foetal transplanté à partir de régions différentes du cerveau. Ceci pourrait être lié à l'expression de molécules inhibitrices ou promotrices de la croissance des fibres 5-HT. Ces substances pourraient être produites par les astrocytes qui, de fait, constituent une source majeure de molécules capables d'influencer l'élongation des neurites et/ou le guidage axonal (Shea et al. 1992; Vogel et al. 1992; Brodkey et al. 1993; Martini 1994). Il est en outre connu que les caractéristiques phénotypiques des astrocytes s'expriment selon une spécificité régionale (Hansson 1990). Un effet différentiel des astrocytes, en relation avec leur origine anatomique, a d'ailleurs été observé sur la croissance axonale, la polarité et la taille de neurones monoaminergiques *in*

croissance axonale, la polarité et la taille de neurones monoaminergiques *in vitro* (Denis-Donini et al. 1984; Liu and Lauder 1992a). Nos propres données ont montré que l'ajout d'astrocytes striataux à une greffe de tissu mésencéphalique fœtal induisait une augmentation significative de la taille des neurones dopaminergiques transplantés dans le striatum (Pierret, et al. 1997a). Dans cette même étude, nous avons aussi observé que les astrocytes striataux avaient un effet rétenteur sur les axones dopaminergiques à l'intérieur de la greffe. Les astrocytes corticaux ou mésencéphaliques co-greffés de la même façon n'ont pas montré de tels effets. Des résultats antérieurs *in vitro* avaient en outre montré que la présence d'astrocytes mésencéphaliques promeut la survie mais pas la croissance de neurones 5-HT fœtaux, en synergie avec la 5-HT (Liu and Lauder 1992a). Selon cette étude, les astrocytes du mésencéphale auraient même, en fait, un effet inhibiteur sur la pousse des fibres 5-HT des neurones fœtaux.

Le but de la présente étude était d'évaluer l'effet d'un enrichissement en astrocytes cultivés à partir du striatum, du mésencéphale ventral ou du cortex cérébral néonataux sur le degré d'innervation 5-HT des greffes mésencéphaliques chez un hôte adulte. Pour ce faire, l'innervation 5-HT des transplants a été évaluée par immunohistochimie de la 5-HT et par autoradiographie quantitative après capture *in vitro* de 5-HT tritiée. Des greffes de tissu striatal fœtal comprenant, ou non, des astrocytes mésencéphaliques cultivés, ont aussi été examinées, comme témoins¹.

Matériels et Méthodes

Animaux expérimentaux

Soixante et douze rats femelles adultes (Sprague-Dawley, 200-250 g) ont été utilisés pour l'immunohistochimie ($n_i = 46$) et pour l'autoradiographie après capture de [³H]5-HT ($n_a = 26$). Tous ont été soumis à une lésion unilatérale de la voie dopaminergique (DA) nigrostriée par administration de 6-hydroxydopamine (6-OHDA-HCl, Sigma, 3 mg/ml dans 0.2 mg/ml ascorbate-saline) sous anesthésie au pentobarbital de sodium (Somnotol, 60 mg/kg) (Doucet, et al. 1989). Le traitement neurotoxique a eu lieu 45 à 60 minutes après l'injection sous-cutanée de desméthylimipramine (15 mg/kg,

¹ Cette étude est présentée ici sous une forme inachevée. La quantification sera incluse dans le manuscrit final qui sera soumis en anglais pour publication. De plus, nous allons augmenter le nombre de cas traités en autoradiographie et inclure des co-greffes de tissu mésencéphalique contenant des astrocytes mésencéphaliques cultivés. Enfin, nous allons examiner l'activité microgliale dans les cultures d'astrocytes ainsi que dans les greffes et co-greffes.

Sigma) pour protéger les neurones noradrénergiques et 5-HT (Breese and Traylor 1971). Quarante-trois rats ont reçu une co-greffe de tissu mésencéphalique fœtal et d'astrocytes cultivés à partir soit du cortex cérébral ($n_i=14$ et $n_a=5$), du striatum ($n_i=8$ et $n_a=11$) ou du mésencéphale ventral néonataux ($n_i=5$). Vingt-et un animaux n'ont reçu que du tissu mésencéphalique fœtal ($n_i=11$ et $n_a=10$). Enfin, 6 rats ont reçu une co-greffe de tissu striatal fœtal et d'astrocytes cultivés à partir du mésencéphale ventral néonatal ($n_i=6$) et 2 rats n'ont reçu que du tissu striatal fœtal ($n_i=2$). Tous ces animaux ont été traités conformément au protocole accepté par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal (Protocole #96-035), suivant, en conséquence, les "Principes des soins aux animaux de laboratoire" (*NIH publication No. 86-23*, révision 1985).

Suspensions cellulaires et transplantation intracérébrale

Les astrocytes destinés aux co-greffes ont été mis en culture primaire selon la technique de (McCarthy and DeVellis 1980). Préparés à partir du mésencéphale ventral, du striatum ou du cortex cérébral de rats nouveau-nés de 1 jour préalablement anesthésiés au méthoxyflurane (Metofane; Janssen Pharmaceutica, North York, ON, Canada), ils ont été mis en culture séparément pendant 21-22 jours dans du MEM ("minimum essential medium"; Gibco-BRL) complémenté avec 33 mM de glucose, 4 mM de glutamine, 26 mM de bicarbonate de sodium, 1 IU/ml de pénicilline/streptomycine et 10% de sérum de cheval. Des études immunocytochimiques effectuées en parallèle nous ont permis de contrôler la reproductibilité et la pureté astrocytaire de ces cultures (Pierret, et al. 1997a). Deux heures avant la séance de co-transplantation, les astrocytes à confluence ont été marqués avec un colorant vital fluorescent, le colorant de Hœchst (Baron-Van Evercooren et al. 1991), afin de monitorer ultérieurement leur migration éventuelle dans le tissu de l'hôte. Après 3 rinçages avec du MEM, ils ont été prélevés des boîtes de culture par ajout de trypsine/EDTA (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} ; Gibco-BRL) et resuspendus dans du MEM supplémenté avec 10% de sérum de cheval. Après une première centrifugation (10 min, 700g), ils ont été resuspendus dans un milieu d'implantation (MEM supplémenté avec 0.22 g/l sodium bicarbonate et 25 mM HEPES; Gibco-BRL), à pH 7.4, et centrifugés une seconde fois avant d'être mélangés avec du tissu mésencéphalique ou striatal fœtal.

Les suspensions cellulaires de tissu mésencéphalique fœtal ont été réalisées selon la technique de (Björklund et al. 1983). Le tissu mésencéphalique, disséqué au 2/3 rostral pour éviter d'inclure des neurones 5-HT du raphé mésencéphalique, a été prélevé sur des fœtus de 14 jours (E14) dans du milieu d'implantation. Il a ensuite été incubé pendant 20 minutes dans du MEM contenant 0.1% de trypsine (Sigma, Crude Type II). Après rinçage dans le milieu d'implantation, l'agrégat cellulaire contenant approximativement 3×10^6 cellules a été mélangé aux astrocytes en culture (environ 2×10^6 astrocytes) et dissocié mécaniquement à l'aide de pipettes Pasteur émoussées à la flamme. À chacune des séances de transplantation, la moitié des échantillons de tissu mésencéphalique a été traité similairement, mais sans addition d'astrocytes, afin de servir de greffes témoins.

Une de nos hypothèses de travail étant que les astrocytes du mésencéphale puissent avoir un effet inhibiteur sur la pousse des fibres 5-HT (Liu and Lauder 1992a), nous avons aussi réalisé, suivant le même protocole, des co-greffes d'astrocytes mésencéphaliques avec du tissu striatal fœtal (E15-16), ainsi que des greffes striatales simples, comme témoins.

Les suspensions cellulaires ont été centrifugées (3 min, 700g) et resuspendue dans un volume standard (40 μ l) de milieu d'implantation. Les greffes ont été réalisées à l'aide d'une micro-seringue Hamilton de 10 μ l pour l'injection stéréotaxique de 3 μ l de suspension dans le striatum ipsilatéral à la lésion, chez des rats anesthésiés au pentobarbital de sodium (Somnotol, 60 mg/kg). Après leur réveil, les animaux ont été gardés à l'animalerie, avec nourriture et eau *ad libitum*, pendant 2 à 4 mois.

Immunohistochimie en pré-enrobage

Les rats ont été fixés sous anesthésie profonde (Somnotol, 70-80 mg/kg) par perfusion vasculaire de glutaraldéhyde à 3.5% dans un tampon phosphate sodique 0.1 M, après rinçage rapide de la vasculature avec un petit volume (~15 ml) de saline tamponnée à pH 7.4 avec du phosphate sodique 0.01 M. Une tranche épaisse du cerveau comprenant le néostriatum greffé a ensuite été immergée pendant 2 h dans le même fixateur. Des coupes sériées de 50 μ m d'épaisseur, effectuées à travers le transplant intrastriatal à l'aide d'un vibratome, ont été traitées par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-5-HT (1:5000; (Geffard et al. 1988)) ou d'un antisérum polyclonal de lapin anti-tyrosine hydroxylase (TH; 1:1000; Pel-

Freez, Rogers, AR) selon des protocoles déjà publiés (Mounir, et al. 1994; Mrini et al. 1995).

Autoradiographie après capture de [³H]5-HT

L'autoradiographie après capture de [³H]5-HT a été réalisée sur des types de co-greffes qui présentaient en immunohistochimie une innervation 5-HT supérieure à celle trouvée dans des greffes simples: i.e des co-greffes comprenant des astrocytes du striatum ou du cortex cérébral, avec des greffes simples comme témoins.

La technique d'autoradiographie quantitative utilisée est celle de Doucet et collaborateurs (voir (Doucet and Descarries 1993)). Brièvement, après perfusion des animaux avec un liquide céphalo-rachidien artificiel froid (4 °C), des tranches de 200 µm d'épaisseur de la région striatale incluant le transplant ont été incubées en présence de 1 µM de [³H]5-HT (5-[1,2-³H(N)]-hydroxytryptamine creatinine sulfate; NET-498, 1032 GBq/mmol; DuPont-NEN, Boston, MA) et de drogues bloquant sa dégradation par la monoamine oxydase (pargyline 0.1 mM, Aldrich) ou sa recapture par les terminaisons dopaminergiques (benztropine mesylate, 10 µM, Merck). Les tranches ont ensuite été fixées par immersion dans du glutaraldéhyde à 3.5%, puis rincées et enrobées à plat dans une résine époxy, sans osmication. Des coupes semi-fines de 4 µm ont été effectuées à partir de 2 ou 3 tranches par animal, et montées sur lames. Certaines de ces coupes ont été trempées dans une émulsion nucléaire liquéfiée (K5; Ilford, Cheshire, England, diluée 1:1) puis révélées, après 3 semaines d'exposition, avec du D-19. D'autres coupes adjacentes des mêmes tranches ont été utilisées pour l'immunohistochimie en post-enrobage (voir plus loin).

Pour la quantification, les varicosités axonales 5-HT, marquées en autoradiographie seront comptées à l'aide d'un système informatisé d'analyse d'images (Image 1.58, gracieuseté de Mr. W. Rasband, NIH) sur une coupe par tranche. Le comptage sera effectué sur toute la surface de coupe des greffes. Pour déterminer la sensibilité de détection des terminaisons 5-HT après 3 semaines d'exposition autoradiographique, nous avons réalisé, en parallèle, une série de coupes plus fines (0.5 µm) qui ont été trempées dans l'émulsion nucléaire liquéfiée et développées à des temps allant de 5 à 60 jours. Cela nous permettra d'estimer l'effet de la durée d'exposition autoradiographique sur le nombre de varicosités 5-HT détectées.

Il a déjà été rapporté que cette approche autoradiographique après capture *in vitro* de monoamines tritiées ne marque pas les corps cellulaires et dendrites des neurones monoaminergiques (Doucet and Descarries 1993; Pierret, et al. 1997b). En conséquence, pour nous assurer que des neurones 5-HT n'avaient pas été inclus dans les greffes de tissu mésencéphalique au moment de la dissection des fœtus, des tranches de 200 µm des mêmes cerveaux receveurs, contenant le pôle caudal ou rostral des greffes, ont été fixées au paraformaldéhyde à 4% et traitées en immunohistochimie avec un anticorps polyclonal de lapin anti-5-HT (1:10 000; Incstar, Stillwater, MN). L'immunoréactivité a été révélée à l'aide d'un antisérum biotinylé de chèvre anti-lapin (1:100; Vector) et du complexe ABC (Vectastain ABC Kit; Vector). L'activité peroxydasique a été révélée à l'aide de peroxyde d'hydrogène (0.04%) et de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.05%, Sigma).

Immunohistochimie en post-enrobage

Nous avons aussi adapté la technique immunohistochimie en post-enrobage de C. Beaulieu et al. (Beaulieu, 1994) pour visualiser les neurones DA et nous assurer de l'absence de neurones 5-HT dans les greffes chez les animaux utilisés pour l'autoradiographie quantitative (voir (Pierret et al. 1997a)).

Brièvement, des coupes semi-fines de 4 µm d'épaisseur des mêmes tranches de cerveau incubées avec la [³H]5-HT et enrobées dans l'Epon pour l'autoradiographie ont été montées sur lames gélatinées, séchées à 60 °C et traitées pendant 30-45 min avec une solution éthanolique saturée d'hydroxyde de sodium, pour désagréger la résine. Les coupes ont ensuite été réhydratées et perméabilisées à l'aide de pronase E (0.0001% dans du tampon Tris 0.5 M, pH 7.4), pendant 10 min. Toutes les étapes subséquentes ont été réalisées dans une chambre humide à température de la pièce, sauf l'incubation dans l'anticorps primaire (4 °C).

Pour réaliser l'immunohistochimie de la TH, les coupes ont été rincées avec un tampon Tris (0.05M, pH7.4) contenant 40% de Triton X-100, pendant 10 min. Après une pré-incubation de 60 min dans le même tampon contenant 12% de sérum normal de chèvre (NGS), 1% d'albumine sérique bovine (BSA), 0.1% d'azide de sodium et 40% de Triton X-100, les coupes ont été incubées en présence d'un anticorps polyclonal dirigé contre la TH (1:500; Pel-Freez, Rogers, AR) dilué dans une solution semblable, mais ne contenant que 2% de NGS. Après plusieurs rinçages, le marquage a été révélé avec un anti-sérum

Les coupes traitées pour l'immunohistochimie de la TPOH ont été rinçées dans un tampon phosphate salin (PBS, 0.2 M, pH 7.4) et traitées avec 0.5% de borohydrure de sodium, pendant 30 min. Après plusieurs rinçages dans un PBS contenant de la gélatine (1:50; RPN416, Amersham), elles ont été pré-incubées dans ce même tampon contenant 1% d'azide de sodium et 40% de Triton X-100. Elles ont ensuite été incubées pendant 2 jours en présence d'un anticorps polyclonal dirigé contre la TPOH (1:1000; (Weissmann et al. 1987)) dans le même tampon que la pré-incubation.

Après plusieurs rinçages dans le tampon PBS/gélatine, le marquage a été révélé avec un anti-sérum biotinylé de lapin anti-mouton (1:1000, Jackson ImmunoRes Lab) et avec le complexe ABC puis la DAB en présence de peroxyde d'hydrogène.

Des coupes semi-fines provenant du raphé mésencéphalique ont été traitées en parallèle, dans les mêmes conditions, en tant que témoins positifs pour la détection de corps cellulaires 5-HT avec cette technique.

Résultats

Apparence générale des greffes et co-greffes

Grâce au colorant de Hoechst, nous avons pu localiser les astrocytes co-greffés plusieurs mois après implantation dans le cerveau des receveurs (voir (Pierret, et al. 1997a)). Ces observations ont montré que la très grande majorité des astrocytes est demeurée à l'intérieur de la greffe, avec toutefois un petit nombre de ceux-ci qui se trouvaient dans le striatum ipsilatéral de l'hôte, selon une distribution décroissante sur une distance de quelques millimètres à partir de la greffe (non illustré).

Dans le cas des greffes étudiées par immunohistochimie en pré-enrobage pour la 5-HT, l'immunocoloration TH sur des coupes sériées adjacentes nous a permis d'évaluer le taux de succès des greffes et des différentes co-greffes (voir (Pierret, et al. 1997a)). Sur ces 38 animaux, 25 présentaient une greffe suffisamment volumineuse pour être utilisée dans nos analyses, soit un taux de succès de 65%. Cependant le pourcentage de réussite n'a pas été uniforme pour les différents groupes expérimentaux: 6 des 14 co-greffes contenant des astrocytes du cortex (42%), 6 des 8 co-greffes contenant des astrocytes du striatum (75%), 4 des 5 co-greffes contenant des astrocytes du mésencéphale (80%) et 9 des 11 greffes normales (81%).

En ce qui concerne les greffes examinées par capture de [³H]5-HT et autoradiographie, l'immunohistochimie de la TH en post-enrobage nous a

aussi permis d'estimer leur taux de succès (voir (Pierret, et al. 1997b)). Sur ces 26 animaux transplantés, 11 présentaient une greffe visible, soit un taux de succès de 42%. Ici encore, il y a eu une hétérogénéité dans le succès des greffes, selon leur type. Ainsi, seulement 2 des 5 co-greffes contenant des astrocytes du cortex (40%) et 3 des 11 co-greffes contenant des astrocytes du striatum (27%) ont pu être étudiées, alors que 6 des greffes simples, sur les 10 implantées (60%), ont pu être retrouvées *in situ*.

Aucune des greffes examinées en immunohistochimie pour la 5-HT, en pré-enrobage, n'a montré de corps cellulaires 5-HT. De même, dans les cas préparés pour la capture de [³H]5-HT, nous n'avons vu aucun corps cellulaire immunopositif pour la 5-HT dans les tranches de 200 µm d'épaisseur des pôles rostral ou caudal des greffes. Enfin, les coupes semi-fines des tranches incubées avec le traceur et traitées en post-enrobage pour l'immunohistochimie de la TPOH n'ont pas, non plus, révélé la présence de corps cellulaire 5-HT à l'intérieur des greffes ou co-greffes, alors qu'un très grand nombre de corps cellulaires ont été immunocolorés dans les coupes du raphé utilisées comme témoins positifs.

Innervation 5-HT des greffes et co-greffes

Comme prévu (voir (Doucet, et al. 1989; Mounir, et al. 1994)), les greffes de tissu mésencéphalique seul traitées en immunohistochimie pour la 5-HT ne présentaient pratiquement pas d'innervation 5-HT (Fig. 1A). En effet, la distribution des fibres immunopositives pour la 5-HT montrait une frontière nette entre le tissu striatal de l'hôte et celui de la greffe; celle-ci ne contenant que quelques fibres occasionnelles sur certaines coupes, rarement au coeur même de la greffe. On a obtenu strictement le même résultat avec la co-transplantation d'astrocytes cultivés à partir du mésencéphale ventral néonatal: pratiquement aucune innervation 5-HT dans la greffe (Fig. 1B). Avec les co-greffes incluant des astrocytes du striatum, l'innervation 5-HT résultante était variable d'un cas à un autre. Certains cas montraient très peu de fibres 5-HT à l'intérieur de la greffe (fibres occasionnelles sur certaines coupes), alors que d'autres co-greffes contenaient un nombre plus important d'axones marqués qui avaient poussé jusqu'au coeur de la greffe (Fig. 1C). Les co-greffes de tissu mésencéphalique contenant des astrocytes du cortex ont aussi donné des résultats variables, mais elles présentaient toujours une innervation 5-HT supérieure, parfois largement, à celle trouvée dans les greffes mésencéphaliques simples (Fig. 1D).

Pour tester la possibilité que la faible innervation 5-HT des greffes mésencéphaliques puisse être due à une action inhibitrice des astrocytes mésencéphaliques, nous avons réalisé des co-greffes de tissu striatal fœtal enrichies en astrocytes du mésencéphale ventral. Or, celles-ci présentaient une riche innervation 5-HT (non illustré), identique à celle vue dans des greffes de tissu striatal seul (voir (Pierret, et al. 1997a)).

En autoradiographie, les greffes simples de mésencéphale ventral contenaient toutes très peu d'accumulations de grains d'argent typiques de varicosités marquées par capture de [^3H]5-HT, quoique un peu plus que prévu sur la base des résultats immunohistochimiques (Fig. 2A). En revanche, les agrégats de grains d'argent étaient beaucoup plus nombreux au sein des co-greffes contenant des astrocytes striataux ou corticaux, bien qu'en nombres variables d'un cas à un autre (Fig. 2B,C).

Ces observations seront documentées par des comptages de varicosités 5-HT marquées en autoradiographie et complétées avec des nouveaux cas additionnés, incluant des co-greffes contenant des astrocytes mésencéphaliques cultivés.

Discussion

Les deux méthodes utilisées ici pour estimer l'innervation 5-HT des différents types de greffes montrent que la co-implantation d'astrocytes cultivés à partir du striatum ou du cortex néonataux a un effet variable, mais généralement favorable sur la pénétration des axones 5-HT dans les greffes mésencéphaliques. D'autre part, l'addition d'astrocytes mésencéphaliques n'a pas eu d'effet négatif sur le degré d'innervation 5-HT des greffes striatales, indiquant que ces astrocytes n'ont pas d'effet inhibiteur sur la croissance axonale 5-HT, même s'ils ne la favorisent pas dans les greffes mésencéphaliques.

Aspects méthodologiques

Il a déjà été démontré que l'approche autoradiographique après capture *in vitro* de [^3H]5-HT permet la détection de varicosités 5-HT du SNC avec une grande sensibilité (Soghomonian et al. 1987; Doucet and Descarries 1993). Cette méthode permet d'apprécier plus facilement les différences entre les types de greffes parce que le marquage obtenu est plus constant, d'une préparation à une autre, que celui obtenu en immunohistochimie et parce que les agrégats de grains d'argent peuvent plus facilement être comptés.

Une caractéristique de l'approche autoradiographique après capture de [³H]monoamines est qu'elle ne détecte pas les corps cellulaires et les dendrites de ces neurones (Doucet and Descarries 1993). Cette caractéristique peut être un avantage dans certaines situations où la détection de ces éléments neuronaux peut gêner la quantification des axones (voir (Pierret, et al. 1997a). Dans le cas présent, cette particularité nous a forcés à recourir à d'autres approches pour nous assurer de l'absence de corps cellulaires 5-HT à l'intérieur des greffes examinées par autoradiographie. Celle-ci a donc été couplée à des méthodes d'immunohistochimie en pré- et en post-enrobage pour la détection respective de la 5-HT ou de son enzyme de synthèse, la tryptophane hydroxylase (TpOH). Les coupes de 200 µm contenant les pôles rostral ou caudal des greffes et des co-greffes n'ont montré aucun neurone 5-HT dans ces greffes, pas plus que l'immunohistochimie de la TpOH en post-enrobage sur des coupes semi-fines des tranches incubées avec la 5-HT tritiée.

L'absence totale de neurones immunoréactifs à la 5-HT ou à la TpOH, dans toutes les greffes et co-greffes, ainsi que l'absence d'innervation 5-HT dans les greffes simples de mésencéphale ventral, qui avaient été préparées en utilisant des échantillons de mésencéphale ventral prélevés des mêmes fœtus, indiquent fortement que les fibres 5-HT détectées dans les co-greffes qui contenaient des astrocytes du cortex ou du striatum provenaient bien de l'hôte et non pas de neurones 5-HT fœtaux co-transplantés par inadvertance avec le tissu mésencéphalique fœtal (Mounir, et al. 1994).

Variabilité dans la survie des différents types de co-greffes par rapport aux greffes simples

Globalement, nous avons observé une meilleure survie des greffes simples (71%) que des co-greffes (environ 45% avec des astrocytes du cortex ou du striatum). Le succès plus faible des co-greffes pourrait être dû à un effet délétère des cellules gliales co-implantés, soit direct ou indirect, via l'exacerbation d'une réaction immunitaire de l'hôte ((Perry et al. 1985; Thomas 1992; Schwarz et al. 1996)).

Effet promoteur de certains types d'astrocytes co-greffés sur l'innervation 5-HT des transplants mésencéphaliques

Les résultats immunohistochimiques concernant la 5-HT ont montré que les co-greffes contenant des astrocytes du mésencéphale ventral ainsi que les greffes simples ne sont pratiquement pas innervées par les fibres 5-HT de

l'hôte, alors que les co-greffes incluant des astrocytes du striatum le sont dans certains cas et que les co-greffes enrichies en astrocytes du cortex cérébral reçoivent toutes une innervation 5-HT notable en provenance de l'hôte. Selon ces données, les astrocytes corticaux et striataux, mais non les astrocytes mésencéphaliques, favoriseraient la pousse des axones 5-HT au sein des co-greffes.

L'examen autoradiographique a donc porté sur les co-greffes contenant des astrocytes corticaux ou striataux, avec des greffes mésencéphaliques simples comme témoins. La densité de l'innervation 5-HT dans les greffes simples et dans les co-greffes enrichies en astrocytes du cortex ou en astrocytes du striatum est en concordance avec les observations immunohistochimiques, sauf que le degré d'innervation 5-HT des co-greffes avec astrocytes striataux est apparu parfois largement supérieur à celui mis en évidence en immunohistochimie. Cette différence pourrait être due à une plus grande sensibilité de l'autoradiographie dans la détection des fibres 5-HT, comme l'indique aussi la détection d'un nombre plus grand de varicosités marquées en autoradiographie dans les greffes simples du mésencéphale ventral. Elle pourrait aussi représenter un continuum avec les variations déjà observées en immunohistochimie.

Ces variations dans le degré d'innervation des co-greffes, tant avec des astrocytes corticaux que striataux, ont peut-être une base biologique. Elles pourraient être dues à des différences dans le phénotype des astrocytes, résultant entre autres de la dissection des cerveaux ou de leur différenciation *in vitro* (voir (Pierret, et al. 1997a)). De nombreux travaux ont mis en évidence la capacité des astrocytes à promouvoir et guider la croissance axonale (Noble et al. 1984; Fallon 1985a; Fallon 1985b; Shea, et al. 1992; Vogel, et al. 1992; Brodkey, et al. 1993; Fawcett 1994; Martini 1994). Cette facilitation pourrait être due à l'expression par les astrocytes de molécules de la matrice extracellulaire telles que la laminine ou la fibronectine (Liesi et al. 1983; Price and Hynes 1985), ou de molécules d'adhérence cellulaire comme la N-cadhérine (Neugebauer et al. 1988) ou la N-CAM (Noble et al. 1985). Or, la forme embryonnaire, polysialylée, de la N-CAM, essentielle à la formation de voies nerveuses et à la croissance axonale (Rutishauser and Landmesser 1996) et mise en évidence par des études immunocytochimiques effectuées en parallèle sur nos cultures d'astrocytes, montre des différences d'expression, suivant l'origine anatomique, corticale ou striatale, de ceux-ci (Pierret, et al. 1997a). Il se pourrait que ces astrocytes, une fois co-greffés, continuent

d'exprimer *in vivo* cette forme de la molécule et que les quantités exprimées continuent de varier selon l'origine anatomique des astrocytes.

D'autre part, la transplantation intracérébrale crée une lésion au site d'implantation, ce qui induit une réaction astrocytaire et une cicatrice gliale (Abrous et al. 1988) pouvant influencer la croissance de fibres nerveuses à l'intérieur de la greffe, via l'expression de molécules inhibitrices de la croissance axonale, comme la cytotactine/ténascine (Faissner and Kruse 1990) ou des protéoglycanes chondroïtine-sulfate ou kératane-sulfate (Cole and McCabe 1991), qui sont ré-exprimées par les astrocytes réactifs (McKeon et al. 1991; McKeon et al. 1995). Il sera intéressant de savoir dans quelle mesure les astrocytes co-greffés expriment des molécules promotrices qui pourraient contrebalancer l'action inhibitrice potentielle de celles qui sont synthétisées par les astrocytes réactifs de l'hôte.

Par ailleurs le traumatisme causé par la greffe peut induire une libération d'interleukine-1 (IL-1) par les macrophages et la microglie (Wang et al. 1994). Or, on sait que les astrocytes corticaux expriment le récepteur de l'interleukine-1 et on a rapporté que son activation induit la libération du facteur de croissance neuronale (NGF) (Carman-Krzan and Pahor 1994), dont le récepteur spécifique, le Trk A, est exprimé par les neurones 5-HT (Sobreviela et al. 1994). Les astrocytes corticaux co-greffés pourraient favoriser par ce biais la pousse des fibres 5-HT. Il reste à voir si les astrocytes striataux ou mésencéphaliques présentent des propriétés similaires ou différentes à ce niveau.

Plusieurs facteurs trophiques exprimés par les astrocytes sont susceptibles d'être impliqués dans la stimulation de la croissance axonale (Henderson 1996) et notamment des fibres 5-HT dans les co-greffes. Parmi ceux-ci, on compte des membres de la famille des neurotrophines (NT) comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), NT-3 et NT-4/5. Ainsi, l'administration chronique de BDNF ou de NT-3 dans la substance noire, couplée à l'injection de 6-OHDA dans le striatum de rats adultes augmente le métabolisme de la 5-HT striatale (Altar et al. 1994; Martin-Iverson et al. 1994). L'administration de ces facteurs trophiques augmente la densité et la distribution des fibres 5-HT de l'hôte adulte à l'intérieur d'un transplant homotypique de moelle épinière fœtale (Bregman and McAtee 1995) et leur présence y maintient l'innervation 5-HT (Bernstein-Goral and Bregman 1995). D'autre part, l'infusion de BDNF dans le néocortex de rats adultes augmente la densité des axones 5-HT autour du site d'administration

(Mamounas et al. 1995) et protège partiellement les fibres 5-HT de la dégénérescence induite par l'administration de p-chloroamphétamine (PCA) (Mamounas et al. 1995a). D'ailleurs, certains neurones situés dans les noyaux du raphé dorsal et médian expriment l'ARNm du récepteur spécifique du BDNF, le trkB (Merlio et al. 1992), et ceux dont la nature 5-HT a été caractérisée par leurs propriétés électrophysiologiques répondent à une administration chronique de BDNF dans le raphé dorsal (Celada et al. 1996). Cependant, le BDNF est exprimé aussi bien dans la substance noire et le striatum que dans le cortex cérébral (Seroogy and Gall 1993; Hyman et al. 1994; Schmidt-Kastner et al. 1996). Il reste donc à voir si des différences d'expression de ce facteur trophique entre les populations d'astrocytes co-greffés pourraient expliquer les effets différents de ceux-ci sur l'innervation 5-HT des greffes.

Conclusions

La transplantation intracérébrale de tissu nerveux fœtal dans le cerveau adulte s'avère l'un des moyens les plus utiles pour étudier la capacité des neurones adultes de modifier leurs connexions. En effet, ces neurones peuvent difficilement être transplantés eux-mêmes ou mis en culture. Plusieurs des études ayant pour objet la régénération nerveuse centrale portent d'ailleurs plutôt sur l'examen de neurones fœtaux ou néonataux en culture. La présente approche a permis de démontrer un effet des astrocytes sur la croissance axonale de neurones adultes. En effet, nous avons pu mettre en évidence un effet promoteur des astrocytes corticaux et striataux sur la croissance intra-greffe des axones 5-HT d'animaux adultes. Cette approche par co-implantation pourrait ainsi servir à l'identification des facteurs régulant la plasticité anatomique des axones 5-HT, en comparant ou en bloquant, par exemple, l'expression de protéines ou d'ARNm dans les cultures d'astrocytes et en examinant les effets de ceux-ci dans les co-greffes.

La co-implantation d'astrocytes en culture avec du tissu nerveux fœtal pourrait aussi être une approche à développer en vue de favoriser l'intégration des greffes dans le cerveau receveur et d'améliorer ainsi la restauration fonctionnelle après atteinte traumatique ou dégénérative du système nerveux.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Drs M. Geffard et D. Weissman, qui ont fourni respectivement les anticorps dirigés contre la 5-HT et contre la TpOH, et le Dr P. Crine, qui a mis à leur disposition les ressources de son laboratoire pour la culture d'astrocytes. Cette étude a été subventionnée par le Conseil de recherches médicales du Canada (CRM, MT 10982). P. P. a été supporté par des bourses provenant du Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC, subvention de Centre FCAR) et de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal. O. B. a été supporté par un programme d'échange France-Québec (Ministères des Affaires étrangères de France et des Relations internationales du Québec) et G. D. par le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ, chercheur-boursier).

RÉFÉRENCES

- Abrous N, Guy J, Vigny A, Calas A, Le Moal M, Herman JP (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
- Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, Jones BE, Jackson C, Wiegand SJ, Lindsay RM, Hyman C (1994) Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions. *J Neurochem* 63: 1021-32
- Azmitia EC, Dolan K, Whitaker-Azmitia PM (1990) S-100 β but not NGF, EGF, insulin or calmoduline is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Res* 516: 354-356
- Azmitia EC, Perlow MJ, Brennan MJ, Lauder JM (1981) Fetal raphe and hippocampal transplants into adult and aged C57BL/6N mice: A preliminary immunocytochemical study. *Brain Res Bull* 7: 703-710
- Baron-Van Evercooren A, Gansmüller A, Clerin E, Gumpel M (1991) Hoechst 33342 a suitable fluorescent marker for Schwann cells after transplantation in the mouse spinal cord. *Neurosci Lett* 131: 241-244
- Beaulieu C (1994) Estimation of the number and size of GABA-containing neurons in the cerebral cortex. *Neurosci Protocols* 94-080-02-01-11: 1-11
- Bernstein-Goral H, Bregman BS (1995) Withdrawal of transient serotonergic projections from non-target transplants is regulated by the availability of neurotrophic factors. *Soc Neurosci Abstr* 21: 1057

- Björklund A, Stenevi U (1979) Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 59: 62-100
- Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH (1983) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation. *Acta Physiol Scand [Suppl]* 522: 1-7
- Björklund A, Wiklund L, Descarries L (1981) Regeneration and plasticity of central serotonergic neurons: a review. *J Physiol Paris* 77: 247-255
- Breese GR, Traylor TD (1971) Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol* 42: 88-99
- Bregman BS (1987) Spinal cord transplants permit the growth of serotonergic axons across the site of neonatal spinal cord transection. *Dev Brain Res* 34: 265-279
- Bregman BS, McAtee M (1995) Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord lesions and transplants in adult rats. *Soc Neurosci Abstr* 21: 1056
- Brodkey JA, Gates MA, Laywell ED, Steindler DA (1993) The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules. *Exp Neurol* 123: 251-270
- Carman-Krzan M, Pahor V (1994) Interleukin-1 receptor identified on rat cortical astrocytes as possible mediators of IL-1 induced NGF secretion. *Soc Neurosci Abstr* 20: 41
- Celada P, Siuciak JA, Tran TM, Altar CA, Tepper JM (1996) Local infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor modifies the firing pattern of dorsal raphe serotonergic neurons. *Brain Res* 712: 293-298
- Cole GJ, McCabe CF (1991) Identification of a developmentally regulated keratan sulphate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth. *Neuron* 7: 1007-1018
- Denis-Donini S, Glowinski J, Prochiantz A (1984) Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurons. *Nature* 307: 641-643
- Doucet G, Descarries L (1993) Quantification of monoamine innervations by light microscopic autoradiography following tritiated monoamine uptake in brain slices. *Neurosci Protocols* 93-050-09-01-15: 1-15
- Doucet G, Murata Y, Brundin P, Bosler O, Mons N, Geffard M, Ouimet CC, Björklund A (1989) Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol* 106: 1-19

- Faissner A, Kruse J (1990) J1/Tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron* 5: 627-637
- Fallon JR (1985a) Neurite guidance by non-neuronal cells in culture: preferential outgrowth of peripheral neurites on glial as compared to non glial cell surfaces. *J Neurosci* 5: 3169-3177
- Fallon JR (1985b) Preferential outgrowth of central nervous system neurites on astrocytes and schwann cells as compared with nonglial cells in vitro. *J Cell Biol* 100: 198-207
- Fawcett J (1994) Astrocytes and axon regeneration in the central nervous system. *J Neurol* 241: S25-S28
- Geffard M, Tuffet S, Peuble L, Patel S (1988) Production of antisera to serotonin and their metabolites and their use in immunocytochemistry. In: Osborne NN, Hamon M (ed) *Neuronal Serotonin*. Wiley, London, pp 1-23
- Hansson E (1990) Regional heterogeneity among astrocytes in the central nervous system. *Neurochem Int* 16: 237-245
- Henderson CE (1996) Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* 6: 64-70
- Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM (1994) Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci* 14: 335-47
- Jacomy H, Bosler O (1996) Intrinsic organization and monoaminergic innervation of the suprachiasmatic nucleus transplanted to adult rats. A light- and electron-microscopic study. *J Neurocytol* 25: 659-673
- Labandeira-Garcia JL, Wictorin K, Cunningham ET, Björklund A (1991) Development of intrastriatal striatal grafts and their afferent innervation from the host. *Neuroscience* 42: 407-426
- Liesi P, Dahl D, Vaheri A (1983) Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J Cell Biol* 96: 920-924
- Liu J, Lauder JM (1992a) Serotonine promotes region-specific glial influences on cultured serotonine and dopamine neurons. *Glia* 5: 306-317
- Liu JP, Lauder JM (1992b) S-100 β and insulin-like growth factor-II differentially regulate growth of developping serotonine and dopamine neurons in vitro. *J Neurosci Res* 33: 248-256

- Lu SY, Shipley MT, Norman AB, Sanberg PR (1991) Striatal, ventral mesencephalic and cortical transplant into the intact rat striatum-A neuroanatomical study. *Exp Neurol* 113: 109-130
- Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA, Altar CA (1995) Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci* 15: 7929-7939
- Martin-Iverson MT, Todd KG, Altar CA (1994) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors - interactions with amphetamine. *J Neurosci* 14: 1262-1270
- Martini R (1994) Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23: 1-28
- McCarthy K, DeVellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85: 890-902
- McKeon RJ, Hoke A, Silver J (1995) Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 136: 32-43
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, 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
- Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H (1992) Molecular cloning of rat *trkC* and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the *trk* family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51: 513-532
- Mounir A, Chkirate M, Vallée A, Pierret P, Geffard M, Doucet G (1994) Host serotonin axons innervate intrastriatal ventral mesencephalic grafts after implantation in newborn rat. *Eur J Neurosci* 6: 1307-1315
- Mrini A, Moukhles H, Bosler O, Jacomy H, Doucet G (1995) Efficient immunodetection of protein antigens in glutaraldehyde-fixed brain tissue. *J Histochem Cytochem* 43: 1285-1291
- Neugebauer KM, Tomaselli KJ, Lilien J, Reichard LF (1988) N-cadherin, N-CAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J Cell Biol* 107: 1177-1187

- Noble M, Albrechtsen M, Moller C, Lyles J, Bock E, Goridis C, Watanabe M, Rutishauser U (1985) Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature* 316: 725-728
- Noble M, Fok-Seang J, Cohen J (1984) Glia are a unique substrate for the in vitro growth of central nervous system neurons. *J Neurosci* 4: 1892-1903
- Nothias F, Peschanski M (1990) Homotypic fetal transplants into an experimental model of spinal cord neurodegeneration. *J Comp Neurol* 301: 520-34
- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the developing and adult mouse brain. *Neuroscience* 15: 313-26
- Pierret P, Quenneville N, Vandaele S, Abbaszadeh R, Lanctôt C, Crine P, Doucet G (1997a) Trophic and tropic effect of striatal astrocytes on co-grafted mesencephalic dopamine neurons. En révision pour *J Neurosci Res*
- Pierret P, Vallée A, Bosler O, Dorais M, Moukhles H, Abbaszadeh R, Lepage Y, Doucet G (1997b) Serotonin axons in the neostriatum show a higher affinity for striatal than for ventral mesencephalic transplants: a quantitative study in adult and immature recipient rats. Soumis à *Exp Neurol*
- Price J, Hynes RO (1985) Astrocytes in culture synthesize and secrete a variant form of fibronectin. *J Neurosci* 5: 2205-2211
- Richter-Landsberg C, Heinrich M (1995) S-100 immunoreactivity in rat brain glial cultures is associated with both astrocytes and oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 42: 657-665
- Rutishauser U, Landmesser L (1996) Polysialic acid in the vertebrate nervous system - A promoter of plasticity in cell-cell interaction. *Trends Neurosci* 19: 422-427
- Schmidt-Kastner R, Wetmore C, Olson L (1996) Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. *Neuroscience* 74: 161-183
- Schwarz SC, Kupsch AR, Banati R, Oertel WH (1996) Cellular immune reactions in brain transplantation - Effects of graft pooling and immunosuppression in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsons disease. *Glia* 17: 103-120

- Seroogy KB, Gall CM (1993) Expression of neurotrophins by midbrain dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 124: 119-128
- Shea TB, Beermann ML, Nixon RA (1992) Sequential effects of astroglial-derived factors on neurite outgrowth - Initiation by protease inhibitors and potentiation by extracellular matrix components. *J Neurosci Res* 31: 309-317
- Sobreviela T, Clary DO, Reichardt LF, Brandabur MM, Kordower JH, Mufson EJ (1994) TRK A-immunoreactive profiles in the central nervous system - colocalization with neurons containing p75 nerve growth factor receptor, choline acetyltransferase, and serotonin. *J Comp Neurol* 350: 587-611
- Soghomonian J-J, Descarries L, Watkins KC (1989) Serotonin innervation in adult rat neostriatum. II. Ultrastructural features: A radioautographic and immunocytochemical study. *Brain Res* 481: 67-86
- Soghomonian JJ, Doucet G, Descarries L (1987) Serotonin innervation in adult rat neostriatum. I. Quantified regional distribution. *Brain Res* 425: 85-100
- Thomas WE (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Rev* 17: 61-74
- Vogel H, Butcher EC, Picker LJ (1992) H-CAM expression in the human nervous system: evidence for a role in diverse glial interactions. *J Neurocytol* 21: 363-373
- Wang J, Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Oldfield EH (1994) Intrastriatal implantation of interleukin-1. Reduction of parkinsonism in rats by enhancing neuronal sprouting from residual dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the midbrain. *J Neurosurg* 80: 484-90
- Weissmann D, Belin MF, Aguera M, Meunier C, Maitre M, Cash CD, Ehret M, Mandel P, Pujol JF (1987) Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience* 23: 291-304
- Wiklund L, Björklund A (1980) Mechanisms of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence histochemical observations. *Brain Res* 191: 129-160
- Zhou FC, Bledsoe S, Murphy J (1991) Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. *Brain Res* 556: 108-116

Légendes des figures

Figure 1: Greffe de tissu mésencéphalique ventral fœtal (**A**) et co-greffes du même tissu enrichies en astrocytes mis en culture à partir du mésencéphale (**B**), du striatum (**C**) et du cortex cérébral néonataux (**D**), telles que visualisées en fonds noir après traitement immunohistochimique pour la 5-HT. Les astérisques marquent des faisceaux de la capsule interne de l'hôte, qui permettent de distinguer facilement les tissus de la greffe et du néostriatum receveur. Les flèches en A et C montrent des exemples d'axones 5-HT immunoréactifs . Barre d'échelle: 100 μ m.

Figure 2: Autoradiographie après capture de [3 H]5-HT de coupes semi-fines d'une greffe simple de tissu mésencéphalique ventral fœtal (**A**), et de co-greffes mésencéphaliques comprenant soit des astrocytes du striatum (**B**) ou des astrocytes du cortex cérébral (**C**). Ces photos montrent presque uniquement le tissu greffé, sauf dans le bas de C, qui inclut une petite portion du néostriatum de l'hôte. Les astérisques en A et C indiquent des faisceaux de la capsule interne de l'hôte. Les varicosités 5-HT marquées apparaissent sous la forme de petits agrégats de grains d'argent (flèche en A). Barre d'échelle: 15 μ m.





Chapitre 4:

**RÔLE DES ASTROCYTES CO-GREFFÉS SUR LA SURVIE ET LE DÉVELOPPEMENT
DES NEURONES À DOPAMINE**

**Trophic and tropic effects of striatal astrocytes on co-grafted
mesencephalic dopamine neurons**

by

Philippe Pierret, Nancy Quenneville, Sylvie Vandaele, Roya Abbaszadeh,
Christian Lanctôt, Philippe Crine, Guy Doucet

Journal of Neuroscience Research, 51, pp. 23-41, 1998

**TROPHIC AND TROPIC EFFECTS OF STRIATAL ASTROCYTES ON CO-
GRAFTED MESENCEPHALIC DOPAMINE NEURONS AND THEIR
AXONS**

P. PIERRET, N. QUENNEVILLE, S. VANDAELE, R. ABBASZADEH,
C. LANCTÔT*, P. CRINE* and G. DOUCET

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

*Département de biochimie, same address.

Running Title: Adding astrocytes to dopaminergic grafts

Correspondence: Dr. Guy Doucet, Département de pathologie, as above.

Telephone: (514) 343-6255; Telefax: (514) 343-5755;

E-mail: doucetg@ere.umontreal.ca

Abbreviations: DA: dopamine; TH: tyrosine hydroxylase

Abstract

Astrocytes from the ventral mesencephalon and from the striatum respectively promote the dendritic and axonal arborization of dopamine (DA) neurons *in vitro*. To test this response *in vivo*, astrocytes in primary cultures from the neonatal cerebral cortex, ventral mesencephalon or striatum were co-implanted with fetal ventral mesencephalic tissue into the intact or DA-denervated striatum of adult rats and these co-grafts were examined after 3-6 months by tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry (intact recipients), or after 5-6 months by *in vitro* [³H]DA uptake-autoradiography (DA-denervated recipients). In contrast with single ventral mesencephalic grafts, all types of co-grafts displayed a rather uniform distribution of TH-immunoreactive perikarya. The average size of TH-immunoreactive cell bodies was not significantly different in co-grafts containing cortical or mesencephalic astrocytes and in single ventral mesencephalic grafts, but it was significantly larger in co-grafts containing striatal astrocytes. Nevertheless, the number of [³H]DA-labeled terminals in the DA-lesioned host striatum was clearly smaller with co-grafts of striatal astrocytes than with single mesencephalic grafts or with co-grafts containing cortical astrocytes. On the other hand, the co-grafts of striatal astrocytes contained much higher numbers of [³H]DA-labeled terminals than the other types of grafts or co-grafts. Thus, while co-grafted astrocytes in general influence the distribution of DA neurons within the graft, astrocytes from the neonatal striatum have a trophic effect on DA perikarya and a tropic effect on DA axons, keeping the latter within the graft.

Key Terms: Neural Transplantation, Primary Culture, Parkinson's Disease

INTRODUCTION

Parkinson's disease results from a progressive loss of DA neurons in the substantia nigra. One current approach for the treatment of this disease is the transplantation of fetal ventral mesencephalic tissue, which contains the DA neurons (Lindvall, 1992). Several attempts have been made to improve the efficiency of such grafts (e.g. see Collier and Springer, 1994), and important efforts are being devoted to the identification of growth factors supporting survival, differentiation or regeneration of DA neurons (Hefti, 1994). Co-culture experiments have shown that mesencephalic astrocytes support the survival of mesencephalic DA neurons *in vitro*, presumably through the expression of as yet unidentified trophic factors (e.g. O'Malley et al., 1992).

Astrocytes display a regional heterogeneity in their morphological (Wilkin et al., 1990) and pharmacological phenotypes (Hansson, 1990) reflecting their multiple functions in the central nervous system. Notably, ventral mesencephalic and striatal astrocytes differentially affect the development of the dendritic and axonal arborizations of DA neurons (Denis-Donini et al., 1984). Conditioned media from mesencephalic or striatal primary astrocytes also have different effects on the morphology of DA neurons, suggesting the involvement of diffusible factors (Rousselet et al., 1988).

To test whether astrocytes from any brain region may exert, *in vivo*, some effects on the development of transplanted midbrain DA neurons, we implanted fetal ventral mesencephalic tissue, with or without astrocytes cultured from the neonatal cerebral cortex, ventral mesencephalon or striatum, into the intact striatum of adult rats. We used intact recipients in order to avoid inducing a trophic effect by a prior 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion (Doucet et al., 1990). Our findings indicate that, in this

condition, only striatal astrocytes have a trophic effect on co-grafted DA neurons, as assessed by an increase in the average size of the tyrosine hydroxylase- (TH) immunoreactive perikarya and their dendritic arborization.

We then prepared similar transplants in 6-OHDA-lesioned recipients, to see whether this trophic effect on DA neurons would produce a more profuse graft-derived DA reinnervation of the DA-denervated striatum. These grafts were examined by autoradiography following the *in vitro* uptake of [³H]DA in fresh brain slices (Doucet and Descarries, 1993). The results showed that co-grafts with striatal astrocytes in fact produce less DA innervation in the host DA-lesioned striatum, presumably by keeping DA axons within the graft.

Partial, preliminary reports of the present data have been published in abstract form (Pierret et al., 1995; Vandaele and Pierret, 1995).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of astrocytes in primary culture.

Purified type 1 astrocytes (>98%) were prepared from the cerebral cortex, the striatum or the ventral mesencephalon of newborn rats by methods described previously (McCarthy and DeVellis, 1980). Briefly, the nervous tissue was dissected out from postnatal day 1 rats, the meningeal tissue was stripped off and cells were dissociated for 15-30 min at 37°C in Hanks' Balanced Salted Solution (HBSS, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) containing 0.25% trypsin (Gibco-BRL) and 0.1% DNase (DN 25, Gibco-BRL), stirring continuously at low speed. Cells were passed through a sterile nylon mesh (pore diameter: 72 µm) to remove undissociated clumps, and trypsin was neutralized by adding an equal volume of minimal essential medium (MEM; Gibco-BRL) supplemented with 10% horse serum (Gibco-BRL). The

cell suspension was collected in a sterile tube and centrifuged for 20 min at 700 g. The pellets were resuspended in culture medium (MEM supplemented with 33 mM glucose, 4 mM glutamine, 26 mM sodium bicarbonate, 1 IU/ml penicillin/streptomycin and 10% horse serum), counted in a hemacytometer and seeded into plastic petri dishes (100 mm², Corning) at a density of ~13 000/cm². The cultures were freed of oligodendrocytes and pre-oligodendrocytes by shaking the dishes before each culture medium change (3 times per week). Neurons could not survive in this culture conditions.

Cell culture immunocytochemistry.

Cell cultures were washed twice with culture medium without serum at 37 °C and fixed in 2% paraformaldehyde in sodium phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), for 30 min. After two washes in PBS, they were incubated for 10 min in 0.1 M glycine in PBS for 5 min at room temperature and washed in PBS. The cells were permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS for 5 min and washed for 1h at room temperature. All antibodies were diluted in PBS containing 0.1% gelatin (Fisher), and 0.4% normal goat serum (NGS, Jackson) was added to primary antibodies solutions. All incubation steps were carried out in the culture dish, lasted 2 hours each, except for the avidin-rhodamin step (30 min), and were followed by six 5-min washes. Fixed cells were first incubated at 4 °C with one of the following antibodies: mouse monoclonal anti- α_2/δ subunit of calcium channels (mAb 3007 ascites, 1/50 (Robitaille et al., 1996; Vandaele et al., 1987), rabbit polyclonal anti-NCAM (1/100, (Rieger et al., 1985; Vandaele and Rieger, 1994)), mouse monoclonal anti-NCAM-PSA (1/500; (Rougon et al., 1986)), rabbit polyclonal anti-GFAP (1/100; Sigma), mouse monoclonal anti-oligodendrocyte (no permeabilization, GD3 and Rmab, hybridoma supernatant, neat (McLaurin and Yong, 1995)), mouse monoclonal anti-NSE (1/100; Dako), mouse monoclonal anti-vimentin (1/100; IgG1, clone V9, Boehringer). They were then washed and incubated

with either an FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (1/50; Jackson) or a biotinylated donkey anti-rabbit IgG (1/700; Jackson). The latter was then revealed with lissamine-rhodamine streptavidine (1/60; Jackson). After six additional washes, the dishes were mounted in Mowiol 4-88 mounting medium containing 5 mM paraphenylenediamine. Immunofluorescence was examined with a Zeiss epifluorescence photomicroscope equipped with fluorescein and rhodamine fluorescence filters and for phase-contrast optics. Control experiments without the primary or secondary antibodies showed no significant staining.

Animals.

The animals were used in accordance with the guidelines of the Animal Care Committee of the Université de Montréal (Protocol 94051).

Both intact and 6-hydroxydopamine- (6-OHDA-) lesioned adult female rats (200-250 g) were used as recipients for the transplantation experiments. A total of 25 single ventral mesencephalic grafts, 13 cortical astrocyte co-grafts, 9 ventral mesencephalic astrocyte co-grafts and 34 striatal astrocyte co-grafts that had been made in intact recipients were processed for TH immunocytochemistry. Among these, respectively 8, 5, 3 and 14 were large enough to be included in the quantitative analyses on the distribution and size of DA perikarya (overall success rate of 40%). For the quantification of DA axon terminals, 10 single ventral mesencephalic grafts, 11 striatal astrocyte co-grafts and 5 cortical astrocyte co-grafts were made in 6-OHDA-lesioned animals. Among these, respectively 6, 3 and 2 could be used for analysis (overall success rate of the 6-OHDA lesion, plus grafting and autoradiographic processing: 42%).

The lesions were performed under sodium pentobarbital anesthesia (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada; diluted with saline to 8 mg/ml, 60 mg/kg), by injecting the drug (6-OHDA-HCl, Sigma, 3

mg/ml in 0.2 mg/ml ascorbate-saline) in the ascending DA pathways, at the following coordinates: 2 μ l at 4 mm posterior to bregma, 0.8 mm to the right and 8 mm below dura with the tooth bar at 3.4 mm; and 2.5 μ l at 4.4 mm posterior to bregma, 1.2 mm to the right and 7.8 mm below dura with the tooth bar at -2.3 mm (see Doucet et al., 1990). Transplantation was done 2 weeks later. The success of the lesion was evaluated by the distribution of the TH-immunostained (post-embedding) or [3 H]DA-radiolabeled axon terminals in the striatum. The animals included in this study had complete lesions: labeled terminals ([3 H]DA or TH immunolabeled) were present only as a halo around the graft, while the neostriatal areas distal from the graft, and the ventral striatum, were almost devoid of such labeling. Rats showing successful lesions according to amphetamine-induced rotometer tests had previously shown similar patterns of labeling, or even higher numbers of remaining DA terminals in the ventral striatum (see Doucet et al., 1990).

Transplantation procedure.

Confluent cell cultures (20-22 d) were incubated for labeling in a H \ddot{o} chst fluorescent vital dye solution (10 μ g/ml; bis-benzimide-trihydrochloride; Sigma, St-Louis, MO) (Baron-Van Evercooren et al., 1991) at 37°C for two hours, then rinsed three times in MEM, removed from the dish with trypsin/EDTA without Ca $^{2+}$ and Mg $^{2+}$ (Gibco-BRL) and suspended in MEM supplemented with 10% horse serum. After centrifugation (10 min, 700g), the pellets were resuspended in the implantation medium (MEM supplemented with 0.22 g/l sodium bicarbonate and 25 mM HEPES; Gibco-BRL) and centrifuged again, prior to mixing with fetal ventral mesencephalic tissue.

Ventral mesencephalic tissue was obtained from E14 rat fetuses. Half of the tissue pieces were kept for single grafts made following the procedure of Björklund et al. (1983). The other pieces were chemically (implantation

medium containing trypsin 1mg/ml, 20 min at 35°C) and mechanically dissociated, and the resulting cell aggregate suspension, containing approximately 3×10^6 viable cells was mixed with cultured astrocytes ($\sim 2 \times 10^6$ astrocytes). The control ventral mesencephalic tissue suspension, as well as the mixtures of astrocytes and ventral mesencephalic tissue, were centrifuged (3 min, 700g) and the pellets were each resuspended in a standard volume (40 μ l) of implantation medium. Two 1.5 μ l injections of the respective suspensions were made into the right striatum of naive or unilaterally 6-OHDA-lesioned adult rats, at the following coordinates: 1 mm anterior to bregma, 3 mm to the right and respectively 5 and 4.1 mm below dura, with the tooth bar at 0. The skin was sutured and, when awake, the rats were returned to their cage.

Graft immunohistochemistry

Three to six months later (plus one single graft at 11 months), the rats were perfusion-fixed with 3.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium-phosphate buffer (PB), after a prior rinse of the vasculature with a small volume (~ 20 ml) of PBS. Each session of perfusion included rats with every type of graft or co-graft. A thick coronal brain slab including the striatum was further fixed during 1h in the same fixative, rinsed in PBS and cut serially into 4 series of 50 μ m-thick sections, on a vibrating microtome. In order to visualize DA neurons, every fourth section was immunostained, in free-floating condition, with a polyclonal antiserum against TH (1:200; Pel-Freez, Rogers, AR). To visualize astrocytes in the graft and in the host brain, another series of sections was processed with a polyclonal antiserum against glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:2000; Dakopatts, Denmark). The immunoreactivity was revealed with a biotinylated anti-rabbit IgG goat antiserum (1:100; Sigma) and with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC Kit; Vector, Burlingame, CA). The peroxidase activity was revealed with 3,3'-

diaminobenzidine (DAB, 0.05%; Sigma) in the presence of 0.005% hydrogen peroxide, 0.01% NiSO₄, 0.01% CoCl₂ and 0.01% (NH₄)₂SO₄. The sections were dehydrated with ethanol, cleared in toluene and mounted in DPX (Electron Microscopy Sciences).

Visualization of the co-grafted astrocytes.

In several cases (rats perfused after 3-4 months, since this tracer is gradually lost by the cells (Baron-Van Evercooren et al., 1992)), another series of sections was mounted directly on glass slides, to visualize the distribution of H \ddot{o} chst-labeled astrocytes. H \ddot{o} chst fluorescence appeared blue with an excitation filter wavelength of 365 nm and a barrier filter wavelength of 420 nm. Photomicrographs were obtained on a Carl Zeiss Axiophot, using Kodak Ektachrome EPH, 1600 ASA.

Assessment of graft size

The size of the grafts and co-grafts was assessed quantitatively by measuring and summing their area in the sections immunostained for TH (in every one out of 4 serial sections across the graft), using an image analysis system (see below) at low magnification.

Assessment of DA perikarya number and distribution within the grafts.

In order to obtain an indication of the number of DA neurons in each type of graft, DA perikarya were counted manually by a blinded investigator directly on the screen of the image analysis system at a magnification of 160X (see below), in the sections immunostained for TH (intact recipients). The sum of the immunostained perikarya in all sections where the graft was present represented an index of the total number of DA neurons within the graft. No stereological correction was made for cell diameter or section thickness for these relative comparisons between grafts.

In order to obtain a quantitative index of the distribution of DA neurons within the grafts, TH-immunoreactive perikarya were also counted

separately in the core and in the periphery of the grafts. The periphery of the graft was defined as an inner band, 150 μm in width (measured with a scaled overlay), from the graft-host interface. Only sections in which the area of the graft was superior to 15,000 μm^2 were included in this analysis. Comparison of the ratios of the number of DA neurons in the periphery (P) over the total number of DA neurons in the grafts (T) between the different groups of grafts and co-grafts was performed using the Duncan Range Test on the transformed proportions ($\arcsin \sqrt{P/T}$), to stabilize the variances (Sokal and Rohlf, 1995).

Measurement of DA perikarya and neurites within the grafts.

The cross-sectional area of TH-immunopositive perikarya was measured also by a blinded investigator in every fourth serial section covering the whole extent of the grafts, using a computerized image analysis program (Image 1.58, courtesy of W. Rasband, NIH) run on a Macintosh computer connected via a videocamera (Panasonic WV-BD400) to a light microscope equipped with a 16X PlanApo objective lens (Leica, Heerbrugg, Switzerland). Overall, more than 13 000 TH-immunoreactive perikarya were measured (Table 1).

Since the data set had a hierarchical structure (neurons within a given section, or in any section within a given animal, were more likely to be similar than neurons in different sections or animals), a multilevel statistical analysis was used to compare the size and the number of the DA perikarya, as well as the sectional area of the grafts, between the different types of grafts and co-grafts (Goldstein, 1989). These multilevel analyses allowed explanatory variables (type of graft) to be defined at any level of the hierarchy and the residual variance to be explicitly modeled at each level.

The sectional area covered by DA neurites in the grafts was measured by image analysis in the same sections, after gray scale selection of the TH-

immunostained elements in the core of the graft, excluding the peripheral regions (150 μm -wide band at the periphery of the graft) to avoid any "contamination" from the host. Since the size distribution of labeled elements was bimodal, exclusion of all feature elements larger than 50 μm^2 specifically and efficiently excluded perikarya from the measurements. The area of the remaining elements was then summed up, and the ratio was calculated of this total area of labeled neurites over the area of the sampling fields, in the core of the graft, to serve as an index of the number of DA neurites within the grafts.

These ratios were analyzed statistically with an ANOVA and post-hoc Fisher's test.

Assessment of DA axonal outgrowth from the grafts by [^3H]DA uptake and autoradiography.

Five to six months after grafting in 6-OHDA-lesioned animals, DA axon terminals, or varicosities, were labeled *in vitro* by incubating 200 μm -thick slices of the fresh brain in the presence of [^3H]DA ([7,8- ^3H]dopamine, 40-60 Ci/mmol, Amersham), an inhibitor of monoamine oxidase (pargyline, Aldrich, 0.1 mM) and an inhibitor of monoamine uptake by 5-HT terminals (citalopram hydrobromide, Pfizer, 1 μM), according to a published procedure (Doucet et al., 1990; Doucet and Descarries, 1993; Doucet et al., 1988; Doucet et al., 1986). At the end of incubation, the slices were fixed by immersion in sodium phosphate buffered (0.1M, pH7.4) 3.5% glutaraldehyde, and then by osmium vapors, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in epoxy resin (Epon 812). Four micrometer-thick sections of the whole slices were obtained on a PolycutTM microtome (Reichert-Jung), flattened onto glass slides and autoradiographed by dipping into a liquified nuclear emulsion (Ilford, K-5). These autoradiographs were developed in D-19, 7 days later (see Doucet and Descarries, 1993, for details).

Post-embedding immunohistochemistry of grafts examined by autoradiography.

In order to visualize by TH immunohistochemistry the same grafts prepared for autoradiography, adjacent 200 μm -thick slices of fresh brain cut on a vibrating microtome, were fixed directly by immersion in 3.5% glutaraldehyde, as above. The osmium fixation step was omitted and the slices were dehydrated, embedded in epoxy resin, cut into 4 μm -thick sections, flattened onto gelatinized glass slides and dried at 60 °C, for post-embedding immunolabelling.

The protocol for post-embedding immunohistochemistry was adapted from a published procedure (Beaulieu, 1994). The semi-thin sections were treated during 30-45 min with absolute ethanol saturated with sodium hydroxyde, for resin etching. The sections were then rehydrated and permeated by incubation during 10 min in 0.05 M Tris buffer containing 0.0001% pronase E. All subsequent steps after rinsing were achieved in a wet chamber, at room temperature, except for the incubation step with the primary antiserum (4°C).

Sections were rinsed with Tris buffer containing 40% Triton X-100 during 10 min. They were first exposed to a solution of 12% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide and 40% Triton X-100 in Tris buffer during 60 min at room temperature. Then, they were incubated overnight with the polyclonal antibody against TH (1:500; Pel-Freez) in Tris buffer containing 2% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide and 40% Triton X-100. After extensive rinsing, the sections were incubated with a biotinylated anti-rabbit antiserum (1:100; Vector) (1h) and, after rinsing, with an avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain, ABC kit, Vector, 1:50) (2h). Finally, they were rinsed in Tris buffer and in 0.2 M potassium phosphate buffer, and reacted in a DAB solution (0.05%)

containing 0.01% NiSO₄, 0.01% CoCl₂, 0.01% (NH₄)₂SO₄ and 0.005% H₂O₂. These sections were dehydrated with ethanol, cleared in toluene and mounted in DPX (Electron Microscopy Sciences).

RESULTS

Characterization of the astrocyte cultures.

Vimentin and GFAP immunocytochemical staining was used to examine astrocyte cultures at 1 and 3 weeks after plating (Fig. 1). One week-old cells showed a strong vimentin immunoreactivity, but were negative for GFAP. At 3 weeks, the cells were negative for vimentin but showed a strong GFAP immunoreactivity. The comparison between GFAP immunofluorescence and phase-contrast images indicated that at least 95% of the cultured cells were astrocytes.

(place Figure 1 approximately here)

To identify the nature of other cell types present in the cultures, oligodendrocytes at the progenitor or pre-oligodendrocyte stages were immunolabeled using anti GD3 or Rmab antibodies, respectively.

Only few oligodendrocytes (less than 0.1%) at either stage were detected in the plates, when the cells were seeded at a density of ~13 000/cm² and submitted to vigorous shaking before each change of culture medium. Such cultures were used for the co-grafting experiments described below. When seeded at a density higher than 37 500 cells/cm², numerous oligodendrocytes were found, and the plates were not used for transplantation. The absence of oligodendrocytes in the cultures was also monitored with control plates that were labeled with antibodies anti-NCAM and anti- α_2/δ subunit of calcium channels (see below). As oligodendrocytes express these markers as well as astrocytes but display a very different morphology (Fig. 2), it was possible to assess the absence of oligodendrocytes in the cultures used for co-grafting.

(place Figure 2 approximately here)

To verify that neurons were not mixed with astrocytes, control cell cultures were labeled with anti-NSE (neuron-specific enolase) antibodies. No staining was ever found in any culture, whatever the stage examined.

Morphological differences between striatal and cortical astrocytes in culture

The following experiments were performed only on cortical and striatal astrocyte cultures, since mesencephalic astrocytes were kept for the co-grafting experiments, because of the low yield of astrocytes taken from the small tissue pieces of fetal ventral midbrain. To ensure the reproducibility of these experiments, the cultures were prepared in parallel with the ones used for co-grafting, with similar seeding density and using the same batch of serum.

Both striatal and cortical cultures contained large and small astrocytes; large cells being 3-6 times larger than small ones. However, cortical astrocyte cultures typically contained a higher proportion of large cells than the striatal ones, which contained mostly small, polygonal cells (compare Fig. 3A,C,E with Fig. 3B,D,F). The cultures were examined by immunofluorescence, using antibodies against NCAM, NCAM-PSA and the α_2/δ subunit of voltage-dependent calcium channels. The reasons why such markers were used are the following : NCAM molecules are important markers of astrocyte physiological state, such as cell migration ability, and may be essential molecules for neuron-glia interactions (Yazaki et al., 1995). The calcium channel α_2 -subunit belongs to L-type calcium channels that have been found to be expressed in astrocytes in certain conditions, such as dbcAMP containing culture medium (MacVicar, 1984) or with certain serum batches (Barres et al., 1989). These markers were thus used to better characterize the phenotype of the astrocyte cultures. In particular, the fact that calcium channel α_2 -subunit was constantly expressed was a good

indicator of the reproducibility of the cultures and of the phenotypic features of the transplanted astrocytes. Large and small astrocytes were immunolabeled with these markers in both types of cultures. However, differences in the labelling patterns were observed. On small cells, NCAM and NCAM-PSA immunostainings consisted of small, intense spots over a more uniform, diffuse staining (Fig. 3B,D), whereas only the spots were present on large cells (Fig. 3A,C). Intense NCAM staining was also found at the periphery of the cells, in regions of cell-to-cell contacts (Fig. 3A,B), where NCAM-PSA labeling was absent (Fig. 3C,D). The calcium channel α_2/δ subunit staining was similar on both large and small cells, and was mostly prominent around the nucleus of the cultured astrocytes, apparently associated with the endoplasmic reticulum.

(place Figure 3 approximately here)

The difference found between striatal and cortical astrocyte cultures is therefore in the relative numbers of large and small cells. In this sense, it is morphological, but as the two types of cells show differences in NCAM and NCAM-PSA expression and localization, the global expression of these markers is likely to be significant functionally.

Distribution and morphology of co-grafted astrocytes.

The distribution of H \ddot{o} chst fluorescence was examined only in rats perfused 3-4 months after grafting. Indeed, this tracer was reported to be undetectable after long survival times (>120 d), due to cell division (Baron-Van Evercooren et al., 1992). In the present experiments, it showed that, although many labeled cells were in the ipsilateral striatum of the host, at a distance from the graft, most of the co-grafted astrocytes remained within the graft (Fig. 4).

(place Figure 4 approximately here)

On the other hand, immunostaining of GFAP, the protein constituting the intermediate filaments of mature astrocytes, did not show any obvious difference between grafts and co-grafts in either the number, distribution nor morphology of the astrocytes, at any time examined after transplantation (Fig. 5).

(place Figure 5 approximately here)

Size of the grafts and number of DA neurons

The total sectional area (A; the sum of areas in every fourth section) of the co-grafts with striatal astrocytes was significantly smaller ($52 \pm 26 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; $p < 0.005$, Multilevel Analysis) than that of single grafts ($150 \pm 139 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), co-grafts containing mesencephalic astrocytes ($162 \pm 13 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) and co-grafts with cortical astrocytes ($84 \pm 92 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) pooled together.

The number of DA neurons (n), also counted in every fourth section, was also smaller in co-grafts with striatal astrocytes (312 ± 216 ; $p < 0.005$, Multilevel Analysis) than in single grafts (575 ± 449), co-grafts with mesencephalic astrocytes (631 ± 19) and co-grafts with cortical astrocytes (476 ± 266) pooled together.

The ratio of the number of DA neurons over the sectional area (n/A) was nevertheless 3.8×10^{-3} for single grafts, 6.0×10^{-3} for co-grafts with striatal astrocytes, 3.9×10^{-3} for co-grafts with ventral mesencephalic astrocytes, and 5.7×10^{-3} for co-grafts with cortical astrocytes (no statistically significant difference). Therefore, the relative survival of DA neurons was at least comparable in co-grafts containing striatal astrocytes to the one in other types of grafts.

Distribution of DA neurons within the grafts.

In single ventral mesencephalic grafts, DA neuronal cell bodies were typically concentrated at the graft-host interface, as previously reported repeatedly (e.g. Doucet et al., 1989). In contrast, the distribution of DA

neurons appeared more uniform between the core and periphery in the three types of co-grafts (Fig. 6). Indeed, the mean proportion of DA neurons located at the periphery of the grafts was 75% for single mesencephalic grafts, compared with 65, 60 and 50% for striatal, cortical and mesencephalic astrocyte co-grafts, respectively. Using a confidence interval of 0.01, there was a statistically significant difference in this ratio between single mesencephalic grafts and mesencephalic astrocyte co-grafts (Duncan Range Test on $\text{Arcsin } \sqrt{P/T}$). The differences between control grafts and striatal or cortical astrocyte co-grafts were also significantly different when using the less stringent confidence interval of 0.05. The differences between co-grafts were not statistically significant.

(place Figure 6 approximately here)

Trophic effect of striatal astrocytes on nigral DA neurons.

The average area of TH-immunoreactive cell bodies in the mesencephalic and cortical astrocyte co-grafts was smaller than that in single mesencephalic grafts, but these differences were not significant (Table 1). In contrast, the TH-immunostained perikarya in striatal astrocyte co-grafts were, on average, significantly larger than those in the control, single mesencephalic grafts (Table 1); the difference in area being 15% (23% in volume).

The residual variance indicated that most of the variation which was not explained by the experimental model (single grafts versus different types of co-grafts) was at the level of the neurons (respectively 11 and 15% of the total variation for pooled grafts and striatal astrocyte co-grafts). Interestingly, this variation was significantly greater in striatal astrocyte co-grafts than among all other types of grafts and co-grafts pooled together (Table 1), suggesting that there was a variable effect of striatal astrocytes on subpopulations of grafted mesencephalic DA neurons.

The measurement of TH-immunolabeled neurites within the core of the grafts (excluding a 150 μm -wide inner band at the graft periphery) indicated that $5 \pm 7\%$ of the area was occupied by DA neurites in single grafts, compared with $6 \pm 2\%$ in co-grafts enriched with ventral mesencephalic astrocytes, $11 \pm 7\%$ in co-grafts with cortical astrocytes and $17 \pm 9\%$ in co-grafts with striatal astrocytes, the latter percentage being significantly different from single grafts ($p < 0.01$; Factorial ANOVA). There were therefore more TH-immunoreactive neurites in the core of co-grafts containing striatal astrocytes.

(place Table 1 approximately here)

DA axonal outgrowth from the grafts.

Representative examples of grafts in 6-OHDA-lesioned recipients processed for [^3H]DA uptake/autoradiography and for TH post-embedding immunohistochemistry are illustrated in Figures 7-9. Labeled DA terminals, in autoradiographs, were represented by small silver grain aggregates, over a diffuse background of single silver grains (Figs. 7-9C,D). Typically, as previously demonstrated (Doucet et al., 1990; Doucet et al., 1989a; Doucet and Descarries, 1993), the DA cell bodies and dendrites were not labeled with this technique (Figs 7-9C). Both the TH post-embedding immunohistochemistry and [^3H]DA autoradiography showed that the outgrowth of DA axons from co-grafts containing striatal astrocytes was drastically reduced compared to single grafts and to co-grafts containing cortical astrocytes (Figs. 7-9B,D). On the other hand, co-grafts containing striatal astrocytes contained a high number of DA terminals, as shown by the presence of many silver grain clusters within the grafts, in clear contrast with single grafts and co-grafts with cortical astrocytes (Figs. 7-9C).

(place Figures 7 - 9 approximately here)

DISCUSSION

These results demonstrate 3 different effects of co-grafted astrocytes on the fetal ventral mesencephalic DA neurons. First, a general effect of all three types of astrocytes on the distribution of DA neurons within the grafts; second, a specific effect of striatal astrocytes on the size of DA neuronal perikarya and on the amount of TH-immunostained neurites (presumably dendrites) within the graft; and third, a specific tropic effect of striatal astrocytes on [³H]DA-labelled axons, limiting their outgrowth from the graft.

State and distribution of co-grafted astrocytes

It is difficult at this point to define the cumulative impact of the culture and transplantation procedures on the state of differentiation of the co-grafted astrocytes. The fact that specific effects of striatal astrocytes onto DA neurons could be revealed indicates that at least some degree of relevant differentiation was obtained, and maintained for at least some time *in vivo*.

In culture, these cells appeared to be mature astrocytes at the time of implantation, since they were expressing GFAP and not vimentin. The immunocytochemical examination of the cultures also showed that they were essentially constituted of astrocytes, provided that they were seeded at low density and appropriately shaken at each medium change. Some authors suggested to use prolonged shaking procedures (12-18h at 260 rpm), after type 1 astroglia in the mixed cultures have reached confluence, to get rid of O-2A progenitor cells (Levison and McCarthy, 1991). In the present study, the astrocytes were seeded at a much lower density and were shaken before each culture medium change, even before they reached confluence. We found that, under these two conditions, the cultures were practically freed of oligodendrocytes. Indeed, the markers used for oligodendrocytes (GD3 and Rmab, (McLaurin and Yong, 1995)) as well as for neurons (neuron-specific enolase) were then essentially negative. Only with higher seeding

densities were some oligodendrocytes found in the cultures, as recognized by the immunostaining with GD3 or Rmab antibodies or, morphologically, after N-CAM or α_2/δ calcium channel subunit immunostaining, .

A regional heterogeneity was already apparent in the cultures, between striatal and cortical astrocytes, in their respective proportions of large and small sizes, which was also reflected in their cellular localization of NCAM and NCAM-PSA. Further examination of these cultures will likely reveal other molecular differences (Hatton et al., 1993), some of which might be relevant for the present observations.

Up to 3-4 months after implantation into the recipient brains, Hoechst fluorescence revealed that the co-grafted astrocytes were still numerous and concentrated within the limits of the graft, although GFAP immunostaining did not show any clear difference between co-grafts and single ventral mesencephalic grafts. It is noteworthy that no glial scar was observed neither, in any of these grafts examined 3-6 months after implantation, at variance with what we found at shorter time points with single ventral mesencephalic grafts (Quenneville et al., 1995), but consistent with previous reports (e.g. (Abrous et al., 1988)). It therefore appears that the co-grafted astrocytes decreased their expression of GFAP. Future experiments will be needed to examine their expression of vimentin, the intermediate filament of immature astrocytes.

Effect of co-grafted astrocytes on the distribution of DA neurons within the grafts

The mechanisms by which co-grafted astrocytes lead to a more uniform distribution of the grafted DA perikarya within the graft are presently unclear. Previous time course analyses of ventral mesencephalic graft development in the host striatum had shown that the accumulation of DA neuronal perikarya at the graft-host interface is a gradual process, DA

neurons being more uniformly distributed within the grafts shortly after implantation (Abrous et al., 1988). It is also known that cell adhesion between astrocytes and neurons is independent of the neuroanatomical origin of the cells (Hatten, 1990). It is therefore plausible that cell adhesion between DA neurons and co-grafted astrocytes of all types hindered the migration of the former toward the graft-host border.

Effects of striatal astrocytes on co-grafted DA neurons

The trophic effect of striatal astrocytes onto grafted DA neurons is also a novel observation. It was manifested by an increase in the size of the perikarya and in the amount of TH-immunostained neurites within the grafts. These immunostained neurites probably represented dendrites, essentially, since they were generally coarser than axons. The latter were indeed very fine and therefore hardly selected with the chosen gray scale adjustments of the image analysis system.

Several previous studies had shown positive effects of striatal tissue on the development of DA neurons. *In vitro* experiments had shown that dissociated striatal tissue enhance DA uptake and synthesis (di Porzio et al., 1980; Prochiantz et al., 1979), and increase neurite outgrowth and branching of DA neurons (Prochiantz et al., 1979). A neurotrophic effect of striatal extracts from parkinsonian patients was also demonstrated on fetal rat DA neurons in culture (Carvey et al., 1993). *In vivo* experiments indicated that co-grafting of embryonic striatum with fetal ventral mesencephalon provides a positive stimulus on DA fiber extension and on DA cell body size (reviewed in Collier and Springer, 1994). The present results indicate that some of these effects could be mediated by the striatal astrocytes.

The present experiments showed no obvious effect of cultured astrocytes on the survival of DA neurons, in contrast with previous reports from experiments *in vitro* with mesencephalic astrocytes (O'Malley et al.,

1992). However, the present transplantation approach was not designed to test this issue, since it was practically impossible, with the presence of cultured astrocytes in some cell suspensions, to really match with precision the amount of fetal ventral mesencephalic tissue implanted in each group of rats. Statistical treatment of the data would have required to multiply the number of transplantation sessions, in order to take into account the variations due to the preparation of the cell suspensions. Therefore, the lower graft size and number of DA neurons that were found for co-grafts containing striatal astrocytes versus other types of grafts, could very likely be attributed simply to technical factors. Indeed, when one examines the ratios of the number of DA neurons in a graft over the size of the graft, co-grafts with striatal and cortical astrocytes contained relatively (although not significantly) more DA neurons than single grafts and co-grafts enriched with ventral mesencephalic astrocytes.

Several known neurotrophic factors are expressed in the striatum and have been reported to exert a positive influence on the development and/or growth of DA neurons, including Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Altar et al., 1994; Hyman et al., 1994), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Othberg et al., 1995; Pietz et al., 1996), Interleukins 2 (Lapchak, 1992) and 6 (Gadient and Otten, 1994), Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Lin et al., 1993; Tomac et al., 1995) and Striatal-Derived Neurotrophic Factor (Dal Toso et al., 1988). Interestingly, a trophic effect of peripheral nerve or Schwann cells, which also express some of these factors (Springer et al., 1994), has been reported on co-grafted mesencephalic DA neurons (Collier and Springer, 1994).

The effect of co-grafted striatal astrocytes on the size of DA cell bodies and dendrites was not accompanied by an increase in graft-derived DA innervation of the previously DA-denervated host neostriatum. On the

contrary, the outgrowth of DA axons was less from grafts containing striatal astrocytes, as revealed with both [^3H]DA uptake/autoradiography and post-embedding TH immunohistochemistry. In fact, it appears that striatal astrocytes exerted some attraction onto DA axons, since the autoradiographs displayed a high number of DA axonal varicosities inside the grafts. It is worth emphasizing that this autoradiographic technique labels only axon terminals, and not perikarya or dendrites (see (Doucet et al., 1990; Doucet et al., 1989a; Doucet and Descarries, 1993). This is exemplified here on autoradiographs of single mesencephalic grafts or co-grafts containing cortical astrocytes, which contained very few silver grain clusters, in spite of the presence of many DA perikarya and dendrites. The rare silver grain clusters present in the latter two types of grafts probably also represented DA axon terminals, since such terminals have indeed been described by electron microscopy in ventral mesencephalic grafts (Bolam et al., 1987). A preferential attraction of DA axons by fetal striatal tissue had also been reported following co-transplantation with fetal ventral mesencephalic tissue into the adult, 6-OHDA-lesioned striatum (Brundin et al., 1986; Yurek et al., 1990). Moreover, *in vitro* experiments had also shown a specific, positive effect of striatal astrocytes on the development of the axonal pole of DA neurons (Denis-Donini et al., 1984; Rousset et al., 1988).

Conclusion

The present results show that the co-implantation of astrocytes cultured from the neonatal striatum influences the development of grafted, mesencephalic DA neurons. Their negative effect on the outgrowth of DA axons into the host striatum precludes the simple use of this approach to improve the treatment of Parkinson's disease by neural transplantation. Nevertheless, a better knowledge of the factors produced by striatal astrocytes that influence either the size of DA perikarya or the sprouting and guidance

of DA axons might in term help to devise clinically meaningful ameliorations to this technique.

The type of co-grafting experiments described here could help, in combination with co-culture studies, to identify the molecule(s) responsible for the two specific effect of striatal astrocytes on DA somata and axons. Indeed, although the regional heterogeneity of astrocytes has been documented for a number of molecules, the number of proteins differing among astrocyte populations is probably relatively small. Therefore, the use of molecular techniques to compare protein expression among cultures of astrocytes with different anatomical origins might give some clues about molecules potentially involved in the effects observed *in vivo*, after transplantation. The expression of candidate molecules could eventually be blocked in the astrocyte cultures, before implantation into the host brain, in order to test their implication in the observed biological effects.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the contributions of Ms. Louise Cournoyer and Ms. Annie Vallée, for their precious technical help, and of Dr. Richard Tanguay for his expert application of the Multilevel statistical analysis. This work was supported by the Canadian Medical Research Council (grant MT-10982). P.P. and N.Q. were supported by studentships from the Groupe de recherche sur le système nerveux central (FCAR grant) and G.D. by a scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec.

References

- Abrous N, Guy J, Vigny A, Calas A, Le Moal M, Herman JP (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.
- Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, Jones BE, Jackson C, Wiegand SJ, Lindsay RM, Hyman C (1994): Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions. *J Neurochem* 63:1021-1032.
- Baron-Van Evercooren A, Clerin-Duhamel E, Lapie P, Gansmüller A, Lachapelle F, Gumpel M (1992): The fate of Schwann cells transplanted in the brain during development. *Dev Neurosci* 14:73-84.
- Baron-Van Evercooren A, Gansmüller A, Clerin E, Gumpel M (1991): Hoechst 33342 a suitable fluorescent marker for Schwann cells after transplantation in the mouse spinal cord. *Neurosci Lett* 131:241-244.
- Barres BA, Chun LLY, Corey DP (1989): Calcium currents in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J Neurosci* 9:3169-3175.
- Beaulieu C (1994): Estimation of the number and size of GABA-containing neurons in the cerebral cortex. *Neurosci Protocols* 94-080-02-01-11:1-11.
- Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH (1983): Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation. *Acta Physiol Scand [Suppl]* 522:1-7.
- Bolam JP, Freund TF, Björklund A, Dunnett SB, Smith AD (1987): Synaptic input and local output of dopaminergic neurons in grafts that functionally reinnervate the host neostriatum. *Exp Brain Res* 68:131-146.

- Brundin P, Isacson O, Gage FH, Björklund A (1986): Intrastratial grafting of dopamine-containing neuronal cell suspensions: effects of mixing with target or non-target cells. *Develop Brain Res* 24:77-84.
- Carvey PM, Ptak LR, Nath ST, Sierens DK, Mufson EJ, Goetz CG, Klawans HL (1993): Striatal extracts from patients with parkinson's disease promote dopamine neuron growth in mesencephalic cultures. *Exp Neurol* 120:149-152.
- Collier TJ, Springer JE (1994): Neural graft augmentation through co-grafting: implantation of cells as sources of survival and growth factors. *Prog Neurobiol* 44:309.
- Dal Toso R, Giorgi O, Soranzo C, Kirschner G, Ferrari G, Favaron M, Benvegnù D, Presti D, Vicini S, Toffano G, Azzone GF, Leon A (1988): Development and survival of neurons in dissociated fetal mesencephalic serum-free cell cultures: I. Effects of cell density and of an adult mammalian striatal-derived neuronotrophic factor (SDNF). *J Neurosci* 8:733-745.
- Denis-Donini S, Glowinski J, Prochiantz A (1984): Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurons. *Nature* 307:641-643.
- di Porzio U, Daguët MC, Glowinski J, Prochiantz A (1980): Effect of striatal cells on in vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurones grown in serum-free conditions. *Nature* 288:370-373.
- Doucet G, Brundin P, Descarries L, Björklund A (1990): Effect of prior dopamine denervation on survival and fiber outgrowth from intrastratial fetal mesencephalic grafts. *Eur J Neurosci* 2:279-290.
- Doucet G, Brundin P, Seth S, Murata Y, Strecker RE, Triarhou LC, Ghetti B, Björklund A (1989a): Degeneration and graft-induced restoration of dopamine innervation in the weaver mouse neostriatum: A quantitative

- radioautographic study of [3H] dopamine uptake. *Exp Brain Res* 77:552-568.
- Doucet G, Descarries L (1993): Quantification of monoamine innervations by light microscopic autoradiography following tritiated monoamine uptake in brain slices. *Neurosci Protocols* 93-050-09-01-15:1-15.
- Doucet G, Descarries L, Audet MA, Garcia S, Berger B (1988): Radioautographic method for quantifying regional monoamine innervations in the rat brain: Application to the cerebral cortex. *Brain Res* 441:233-259.
- Doucet G, Descarries L, Garcia S (1986): Quantification of the dopamine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 19:427-445.
- Doucet G, Murata Y, Brundin P, Bosler O, Mons N, Geffard M, Ouimet CC, Björklund A (1989b): Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol* 106:1-19.
- Gadient RA, Otten U (1994): Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res* 637:10-14.
- Goldstein H (1989): Models for multilevel response variables with an application to growth curves. In D. B (eds): *Multilevel analysis of educational data*. Academic press, New York: pp 108-125.
- Hansson E (1990): Regional heterogeneity among astrocytes in the central nervous system. *Neurochem Int* 16:237-245.
- Hatten ME (1990): Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 13:179-184.
- Hatton JD, Nguyen MH, U HS (1993): Differential migration of astrocytes grafted into the developing rat brain. *Glia* 9:113-119.

- Hefti F (1994): Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J Neurobiol* 25:1418-1435.
- Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM (1994): Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci* 14:335-347.
- Lapchak PA (1992): A role for interleukin-2 in the regulation of striatal dopaminergic function. *Neuroreport* 3:165-168.
- Levison SW, McCarthy KD (1991): Astroglia in culture. In Banker G, Goslin K (eds): *Culturing nerve cells*. Cambridge, MA: The MIT Press, pp 309-336.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993): GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130-1132.
- Lindvall O (1992): Neural grafting in Parkinson's disease. *Neuroscience facts* 3:86-87.
- MacVicar BA (1984): Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.
- McCarthy K, DeVellis J (1980): Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.
- McLaurin J, Yong VW (1995): Oligodendrocytes and myelin. *Neurologic Clinics* 13:23-49.
- O'Malley EK, Sieber BA, Black IB, Dreyfus CF (1992): Mesencephalic type-I astrocytes mediate the survival of substantia-nigra dopaminergic neurons in culture. *Brain Res* 582:65-70.

- Othberg A, Odin P, Ballagi A, Ahgren A, Funa K, Lindvall O (1995): Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fetal rat and human dopaminergic neurons in vitro. *Exp Brain Res* 105:111-122.
- Pierret P, Quenneville N, Crine P, Doucet G (1995): Striatal astrocytes co-transplanted with ventral mesencephalic tissue into intact striatum have a trophic effect on grafted dopamine neurons. *Soc Neurosci Abstr* 21:539.
- Pietz K, Odin P, Funa K, Lindvall O (1996): Protective effect of Platelet-Derived Growth Factor against 6-hydroxydopamine-induced lesion of rat dopaminergic neurons in culture. *Neurosci Let* 204:101-104.
- Prochiantz A, di Porzio U, Kato A, Berger B, Glowinski J (1979): In vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons from mouse embryos is enhanced in presence of their striatal target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5387-5391.
- Quenneville N, Pierret P, Doucet G (1995): Astrocytic reaction to the implantation of fetal substantia nigra into the neostriatum of newborn or adult rat. *Soc Neurosci Abstr* 21:316.
- Rieger F, Grumet M, Edelman GM (1985): N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction. *J Cell Biol* 101:285-293.
- Robitaille R, Bourque MJ, Vandaele S (1996): Localization of L-type Ca²⁺ channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 16:148-158.
- Rougon G, Dubois C, Buckley N, Magnani JL, Zollinger W (1986): A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J Cell Biol* 103:2429-2437.
- Rousselet A, Fetler L, Chamak B, Prochiantz A (1988): Rat mesencephalic neurons in culture exhibit different morphological traits in the presence of media conditioned on mesencephalic or striatal astroglia. *Develop Biol* 129:495-504.

- Sokal RR, Rohlf FJ (1995): Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. San Francisco: W.H. Freeman and Co.
- Springer JE, Mu X, Bergmann LW, Trojanowski JQ (1994): Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. *Exp Neurol* 127:167-170.
- Tomac A, Lindqvist E, Lin L, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L (1995): Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by gdnf in vivo. *Nature* 373:335-339.
- Vandaele S, Fosset M, Galizzi JP, Lazdunski M (1987): Monoclonal antibodies that co-immunoprecipitate the 1,4-dihydropyridine and phenylalkylamine components associated with the voltage-dependent calcium channel from skeletal muscle. *Biochemistry* 26:5-9.
- Vandaele S, Pierret P (1995): Expression and subcellular distribution of L-type calcium in glia *in vitro*. *Soc Neurosci Abstr* 21:1578.
- Vandaele SF, Rieger F (1994): Co-localization of 1,4-dihydropyridine α_2/δ subunit and N-CAM during early myogenesis in vitro. *J Cell Sci* 107:1217-1227.
- Wilkin GP, Marriot DR, Cholewinski AJ (1990): Astrocyte heterogeneity. *Trends Neurosci* 13:43-45.
- Yazaki T, Asou H, Arimoto K, Toya S, Uyemura K (1995): Decrease of NCAM expression and astrocyte-neurone interaction in long-term cultured astrocytes. *Neuroreport* 6:1085-1088.
- Yurek DM, Collier TJ, Sladek JRJ (1990): Embryonic mesencephalic and striatal co-grafts: development of grafted dopamine neurons and functional recovery. *Exp Neurol* 109:191-199.

TABLE 1. Multilevel analysis of the size of dopaminergic neuronal perikarya in single grafts and in co-grafts containing cortical, mesencephalic or striatal astrocytes from primary cultures.

Explanatory variables	$\sqrt{\text{Area}} \pm \text{S.E.}$ (μm)	Mean area (μm^2)
Control	13.32 \pm 0.35	(177)
Difference for cortical astrocyte co-grafts [‡]	-1.10 \pm 0.56	(149)
Difference for mesencephalic astrocyte co-grafts [‡]	-0.80 \pm 0.66	(156)
Difference for striatal astrocyte co-grafts [‡]	0.97 \pm 0.44*	(204)
RESIDUAL VARIANCE		
Between rats	0.73 \pm 0.26	
Between sections, within rats	0.92 \pm 0.15	
Between neurons, within sections, within rats		
Pooled single, cortical astrocyte and mesencephalic astrocyte co-grafts	11.23 \pm 0.17	
Striatal astrocyte co-grafts	15.48 \pm 0.12**	
Number of rats	30	
Number of sections	152	
Number of neurons	13 419	

Data from rats perfused 3-6 months after grafting. [‡]Difference from control (single ventral mesencephalic grafts). The difference between the data of single mesencephalic grafts and of co-grafts containing either cortical or mesencephalic astrocytes was not significant ($X^2_{(2)}=4.17$, $P = 0.12$), presumably because the numbers of such co-grafts was small ($n=5$ and 3

grafts, respectively). *There was a significant difference in size between DA cell bodies in the striatal astrocyte co-grafts (n=14 grafts) and those in single ventral mesencephalic grafts (n=8 grafts) ($X^2_{(2)}=4.77$, $P=0.03$). **The residual variance between DA neurons within striatal astrocyte co-grafts was significantly larger than the one between DA neurons within all other types of single grafts and co-grafts pooled together ($P<0.05$). A mean of 5.2 ± 1.7 (S.D) sections per rat were used (one out of 4 serial sections through the grafts was immunostained for TH), i.e. 41 sections from single mesencephalic grafts, 66 sections from co-grafts with striatal astrocytes, 32 sections from co-grafts with cortical astrocytes and 22 sections from co-grafts with mesencephalic astrocytes. A mean of 444 ± 304 neurons were measured in each animal (details for each type of graft in Results).

Figure legends

Figure 1. Astrocytes in culture. Exemplified in this figure are astrocytes from the neonatal rat neocortex immunostained for vimentin (A,C) or GFAP (B,D), one week (A,B) and three weeks after plating (C,D). These results show that astrocytes were expressing GFAP, and not vimentin, and were therefore apparently mature at the time of transplantation. Scale bar (in B): 135 μm .

Figure 2. Oligodendrocytes immunostained for NCAM (A) or the α_2/δ subunit of voltage-dependent calcium channels (B) in cultures seeded at high density and not submitted to regular shaking. Such cells were virtually absent from cultures used for co-grafting. Scale bar (in B): 5 μm .

Figure 3. Immunostaining for NCAM (A,B), NCAM-PSA (C,D) and α_2/δ subunit of voltage-dependent calcium channels (E,F) visualized by indirect fluorescence in cultured astrocytes. A,C,E: In cortical astrocyte cultures, a high incidence of large, spread cells is noticeable (n: cell nucleus). B,D,F: In striatal astrocyte cultures, most cells (asterisks) are small, polygonal and closely apposed to one another. A,B: With NCAM immunostaining, prominent dots of intense fluorescence (small arrows) are seen both on large and small cells. There is also an accumulation of NCAM at zones of cell-to-cell contact (larger arrows). A weaker, diffuse staining is present only on the small polygonal cells (asterisks, in B). C,D: NCAM-PSA immunostaining shows a similar pattern of intensely fluorescent dots (small arrows) on large and small cells and diffuse staining on small cells (asterisks, in D), but there is no accumulation at zones of cell-to-cell contact. E,F: Immunostaining for the α_2/δ subunit of voltage-dependent calcium channels was prominent mostly around the nucleus (n) of both types of astrocytes, a pattern

reminiscent of endoplasmic reticulum-associated structures. Scale bar (in F): 5 μm .

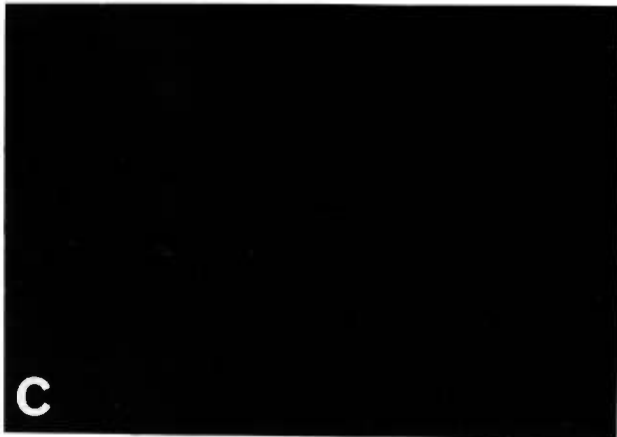
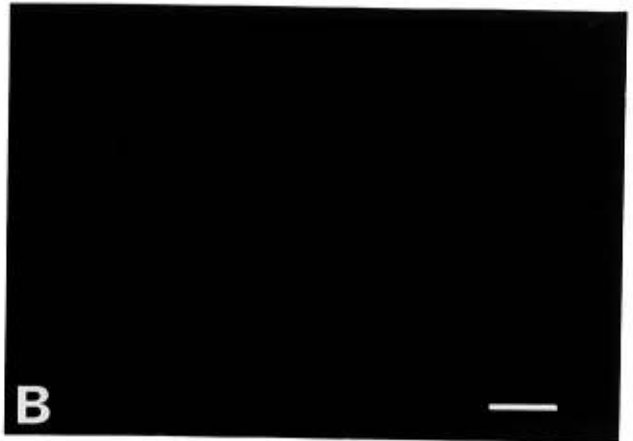
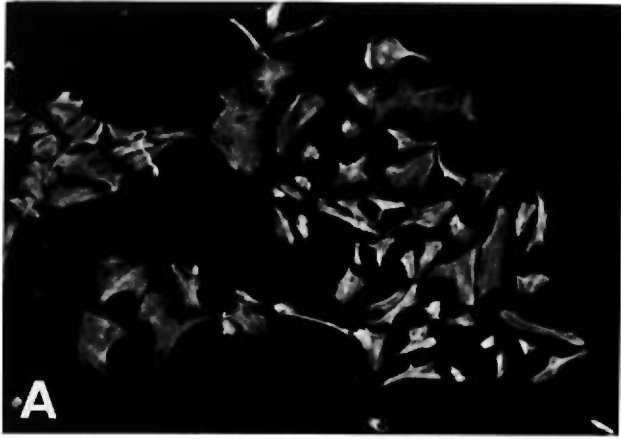
Figure 4. Hoescht-positive astrocytes in co-graft. Confluent astrocyte cultures were labeled with Hoescht fluorescent dye prior to implantation, in order to monitor their survival and migration into the host brain. In the present case, the co-grafted astrocytes had been cultured from the neonatal cerebral cortex. Perfusion of the brain was performed 3 months after implantation. The majority of labeled astrocytes remained within the graft (g), although a substantial number could be seen in the ipsilateral striatum of the host (small arrows). Scale bar = 200 μm .

Figure 5. Grafts of ventral mesencephalic tissue immunostained for GFAP. A) Single graft perfused after 11 months. B) Co-graft containing cultured ventral mesencephalic astrocytes, perfused after 3 months. C) Co-graft with cortical astrocytes, perfused after 6 months. D) Co-graft including striatal astrocytes, perfused after 3 months. No major, consistent difference was observed between the different types of grafts or with different survival times. Occasionally, a few astrocytes, or processes, appeared hypertrophied (arrowheads in A,B). In some cases of co-grafts, the astrocytic processes were oriented dorso-ventrally, as in C, but this was not associated with any particular type of co-graft. Scale bar = 20 μm .

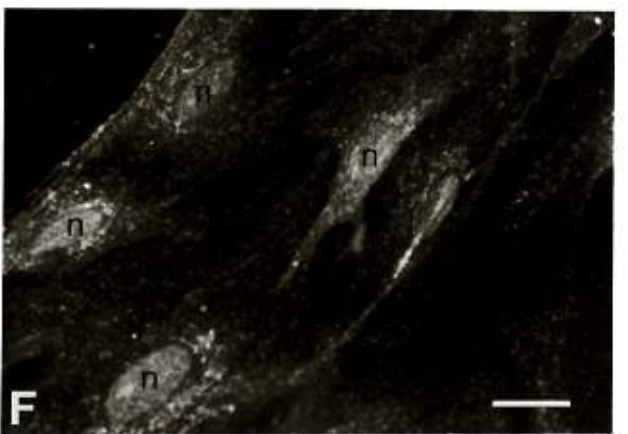
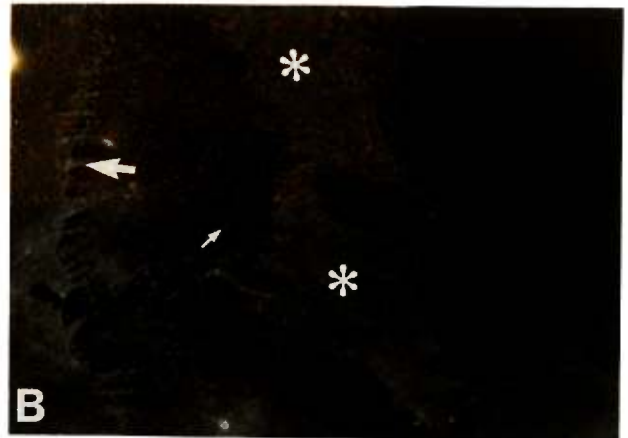
Figure 6. Single ventral mesencephalic graft and co-grafts containing also cultured ventral mesencephalic, cortical or striatal astrocytes following TH-immunostaining, in intact recipient. A: In the single ventral mesencephalic graft, grafted DA neurons were usually accumulated at the periphery of the transplant. B-D: In contrast, DA neurons were more uniformly distributed between the core and periphery of the mesencephalic (B), cortical (C) and striatal astrocyte (D) co-grafts. Scale bar = 200 μm .

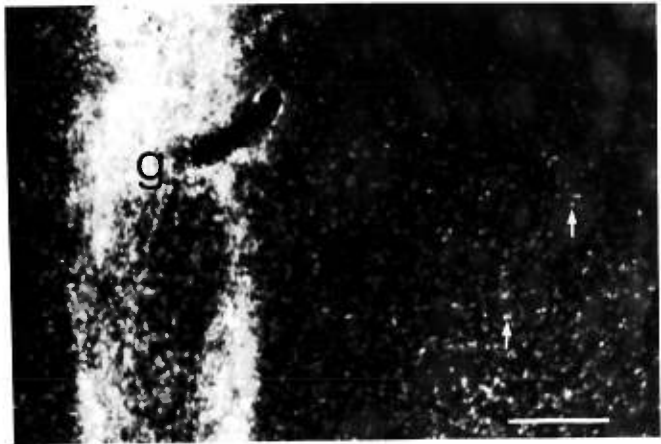
Figure 7-9. Single ventral mesencephalic graft (7) or co-grafts containing cortical (8) or striatal (9) astrocytes, processed for [³H]DA uptake and autoradiography in vitro. In each figure, A and B show TH post-embedding immunocytochemically stained sections, while C and D show radiolabeled DA axon varicosities, or terminals. A and C are centered on the graft or co-grafts themselves, whereas B and D show adjacent areas of the host striatum. Figure 7. Note that this single ventral mesencephalic graft contains several TH-immunostained cell bodies (A) and a high density of TH-immunostained nerve terminals in the adjacent host striatum (B). For orientation, the asterisks in A and B mark the same axon fascicle of the host internal capsule. At higher magnification in the autoradiograph of a nearby section from the same graft, there are very few silver grain clusters inside the graft (C), but a high number, signaling the presence of DA varicosities, in the adjacent host striatum (D). Note that this autoradiographic technique labels only DA axon terminals, to the exclusion of DA cell bodies and dendrites (compare A with C). Figure 8. This small co-graft (A) containing cortical astrocytes also produced a relatively dense TH-immunostained innervation in the adjacent host striatum (B). The arrows in A and B point to the same immunostained fiber. This co-graft, like single grafts, contained few silver grain clusters, or [³H]DA-labeled terminals within its own boundaries (C), while many were present in the adjacent host brain (C and D). The arrows in C and D point to the same group of labeled varicosities. Figure 9. This co-graft containing striatal astrocytes produced relatively few TH-immunostained (B) or [³H]DA-labelled axons in the host brain, despite the fact that it contained a relatively high number of DA neurons (A) (comparable to the single graft in Fig. 7). Conversely, there was a high density of [³H]DA-labelled axons within the graft borders (C). The arrows in A and B point to the same TH-immunostained fiber, and those in C and D, to

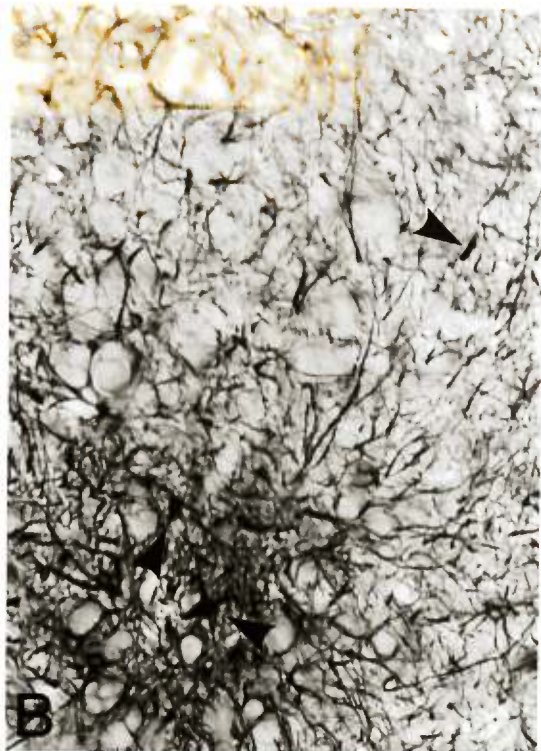
the same [^3H]DA-labelled axons. Scale bars for Figs 7-9: A: 250 μm ; B, C and D (in D): 100 μm .

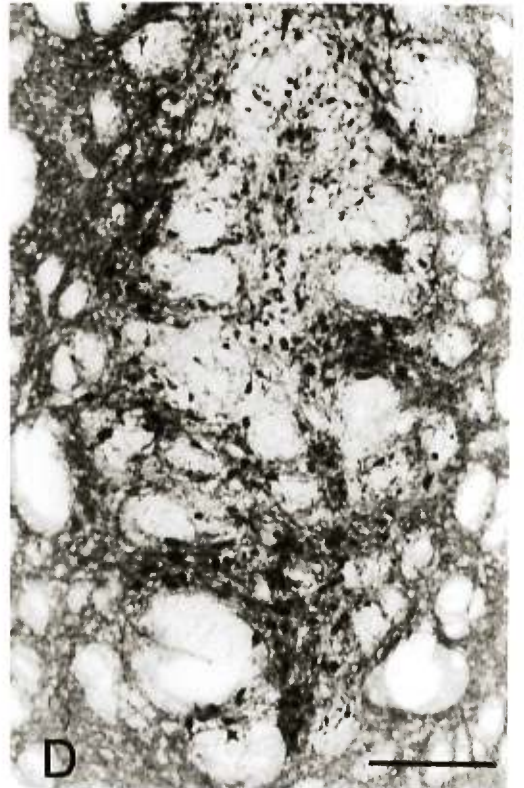
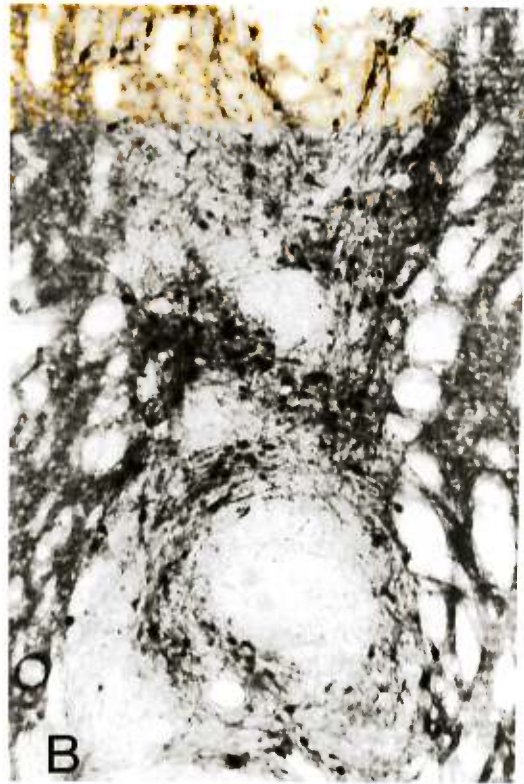
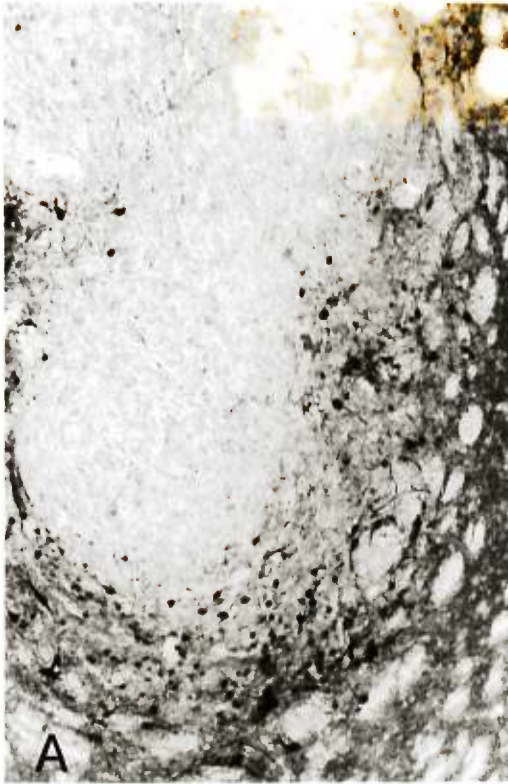


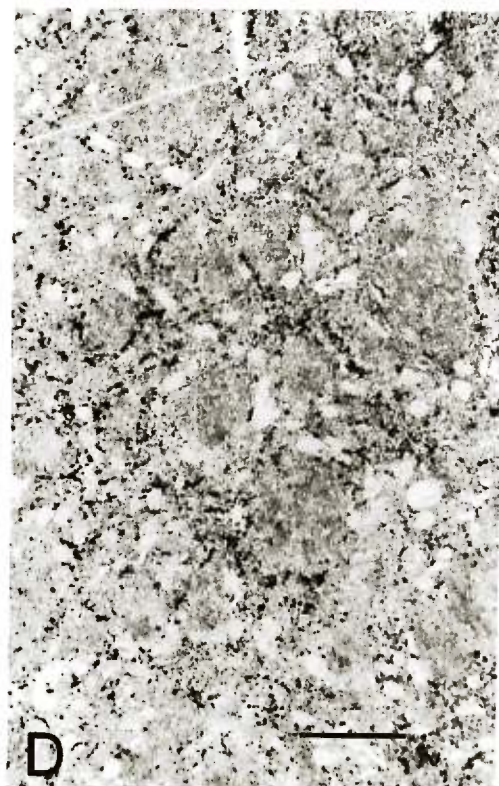
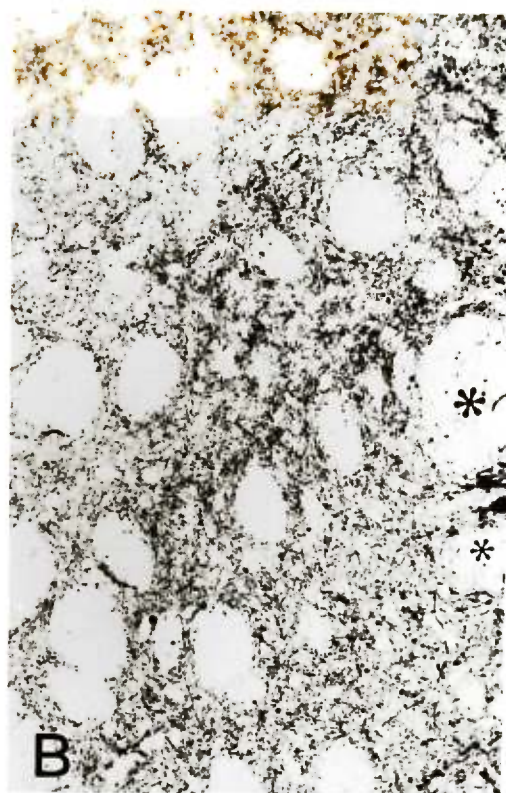




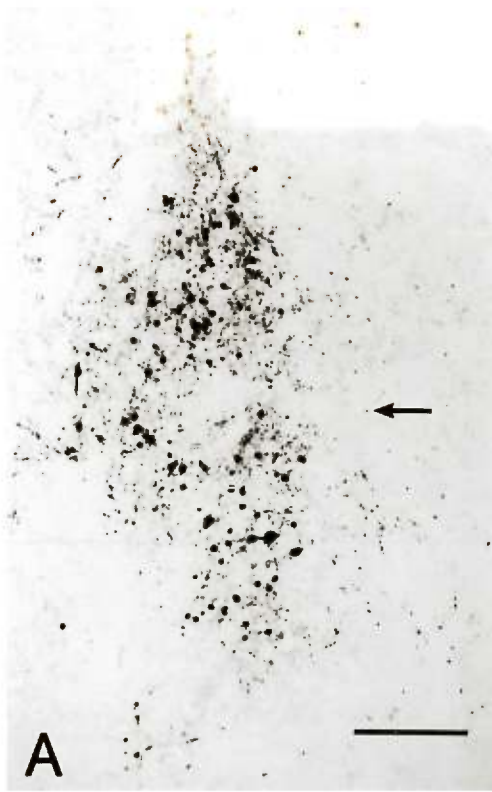












Chapitre 5:
RÉACTION DES ASTROCYTES DE L'HÔTE ET DE LA GREFFE APRÈS
TRANSPLANTATION DE TISSU NERVEUX FŒTAL

**Astrocytic reaction to the implantation of fetal ventral mesencephalic
tissue into the neostriatum of newborn or adult rat**

by

Nancy Quenneville, **Philippe Pierret**, Guy Doucet

Soumis 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 μ l from a 50 μ l cell suspension prepared from 9 to 12 fetuses were injected using a 10 μ 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).

Immunohistochemistry

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 β -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. 1998. Trophic and tropic effects of striatal astrocytes on co-grafted mesencephalic dopamine neurons and their axons. *J. Neurosci. Res.* **51**: 23-40.
60. Pierret, P., Vallée, A., Bosler, O., Dorais, M., Moukhles, H., Abbaszadeh, R., Lepage, Y., and Doucet, G. 1998. Serotonin axons of the neostriatum show a higher affinity for striatal than for ventral mesencephalic transplants: A quantitative study in adult and immature recipient. *Accepted for publication in Exp Neurol.*
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. 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**: 3664-74.
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 μm .

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 μm .

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 μm .

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 μm .

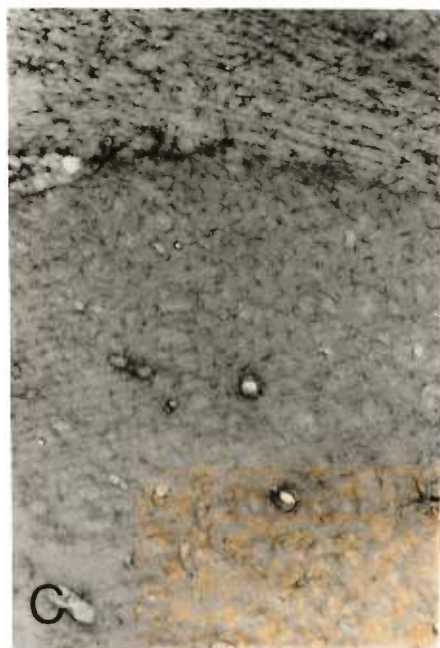
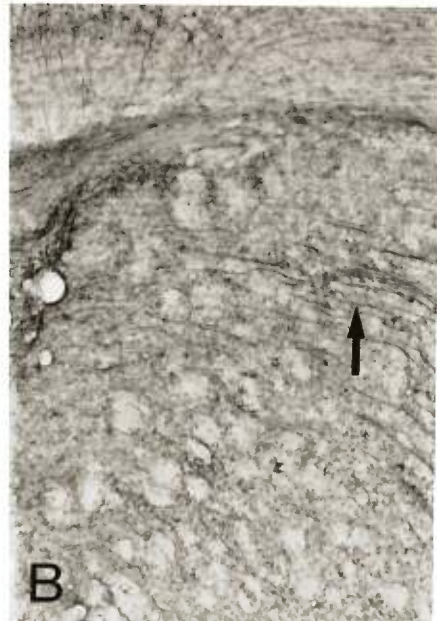
Figure 5: GFAP (**A, C**) and vimentin (**B, D**) immunostaining following implantation of fetal ventral mesencephalic tissue into the striatum of juvenile (P15) rats on PID10 (**A, B**) and PID60 (**C, D**). Arrows in **C, D** delineate the graft. Scale bar: 250 μm .

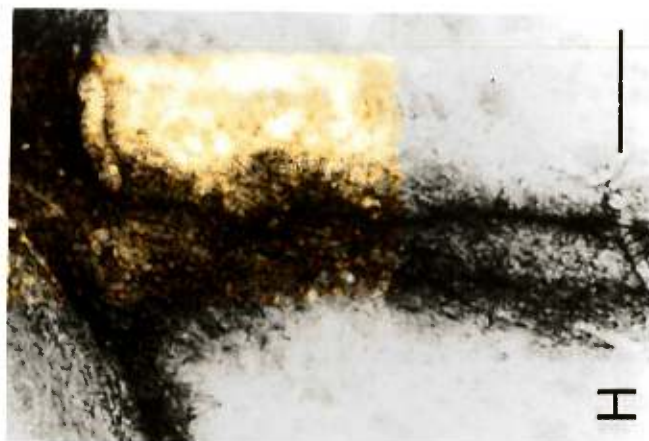
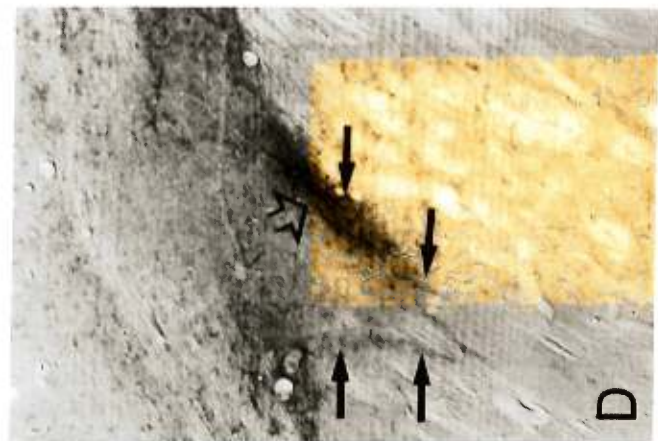
Figure 6: Vimentin immunostaining in the striatum of neonatally (**A-D**) and adult-implanted rats (**E-H**), on PID1 (**A,E**), PID5 (**B,F**), PID10 (**C,G**) and PID60 (**D,H**). Open arrow in **B,D** designate radial glia; the graft is outlined by arrows in **A-D**. Open arrow in **D** points to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

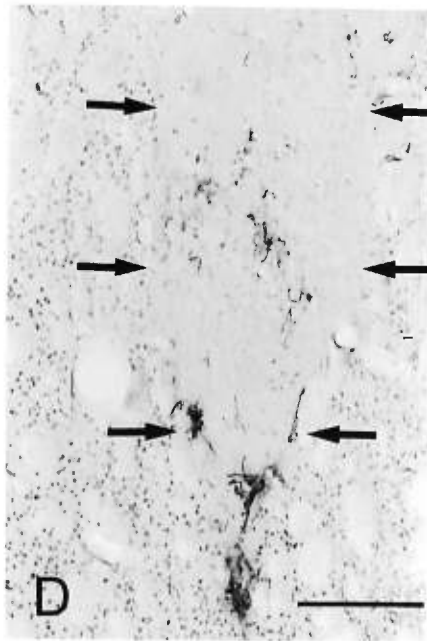
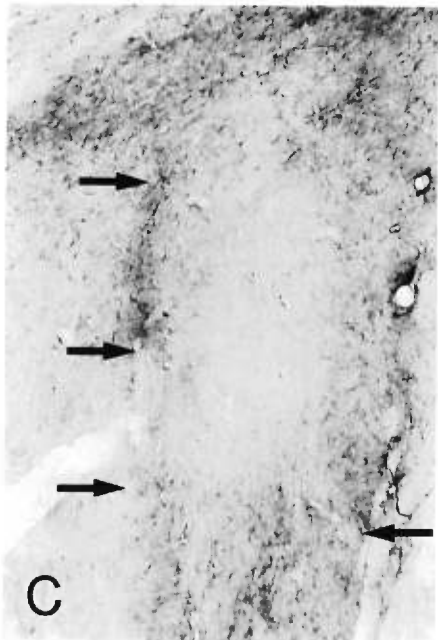
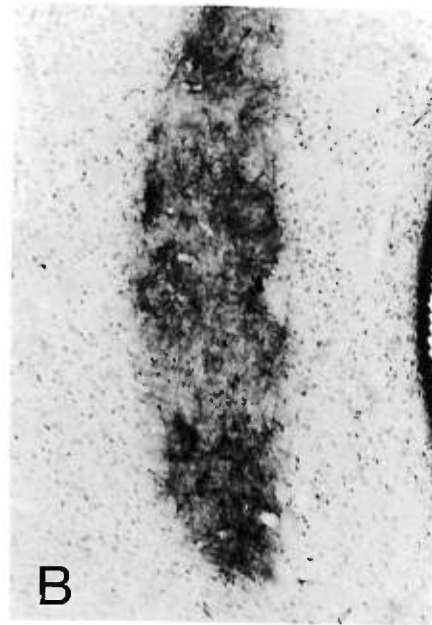
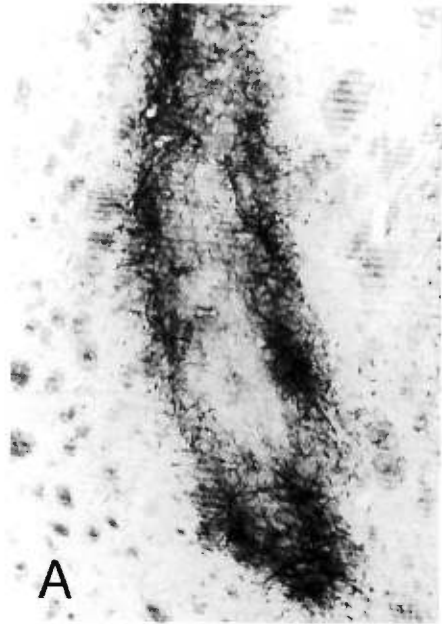
Figure 7: Grafts of fetal striatal tissue in the striatum of adult rats, at PID30. **A**) GFAP-immunostaining (compare with ventral mesencephalic graft, Fig. 3H). There is only a slight increase in density of astrocytes at the host-graft interface (host tissue is on the right). **B**) Vimentin immunostaining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

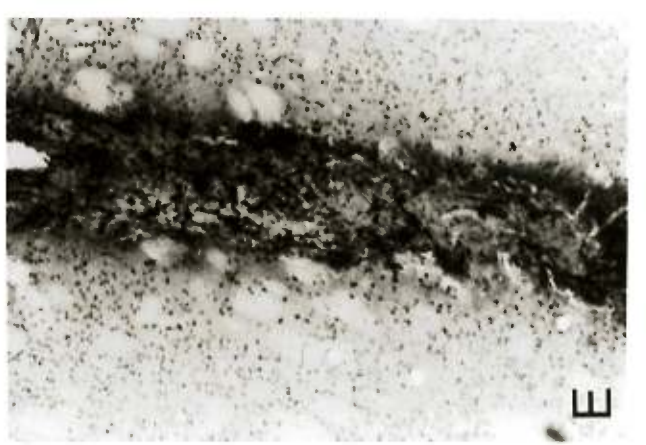
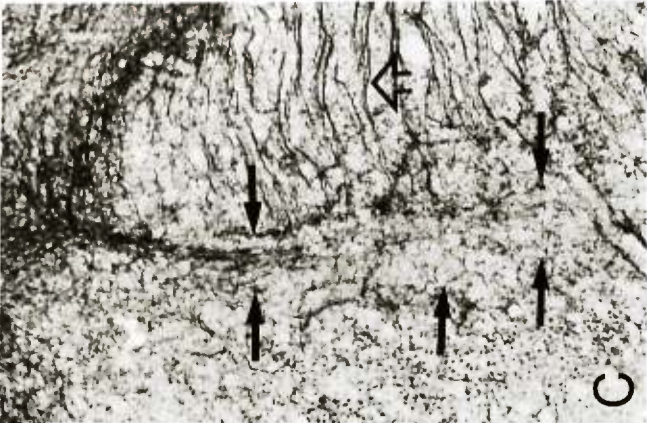
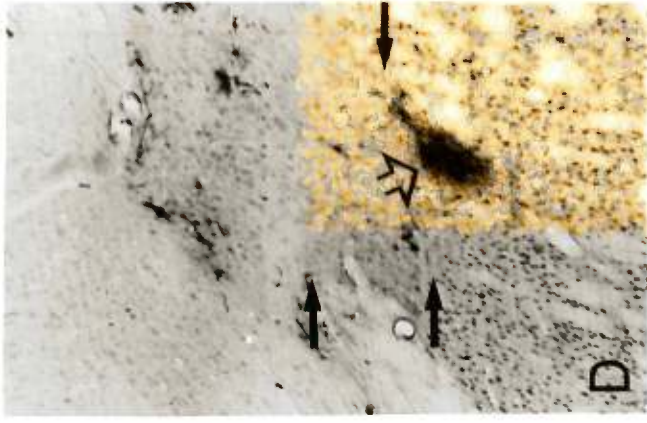
Figure 8: Sham-lesioned striatum (needle tract) immunostained at PLD30. **A** and **B**) GFAP and vimentin staining, respectively, in neonatally-lesioned striatum. **C** and **D**) GFAP and vimentin staining, respectively, in adult-lesioned striatum.

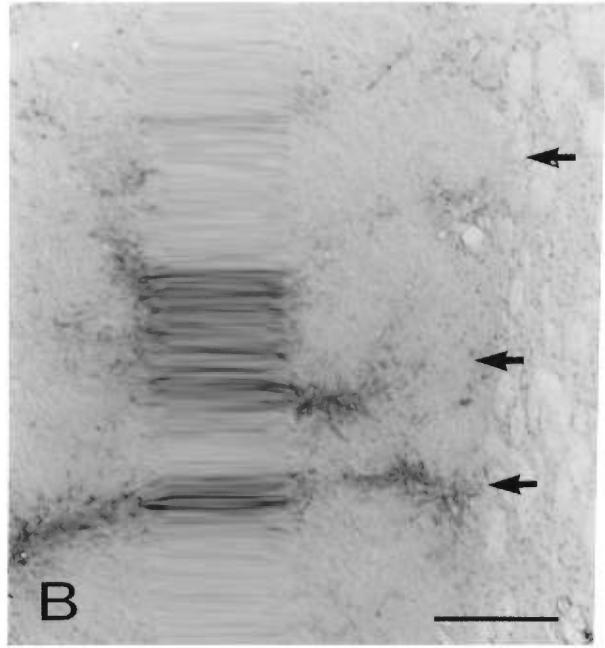
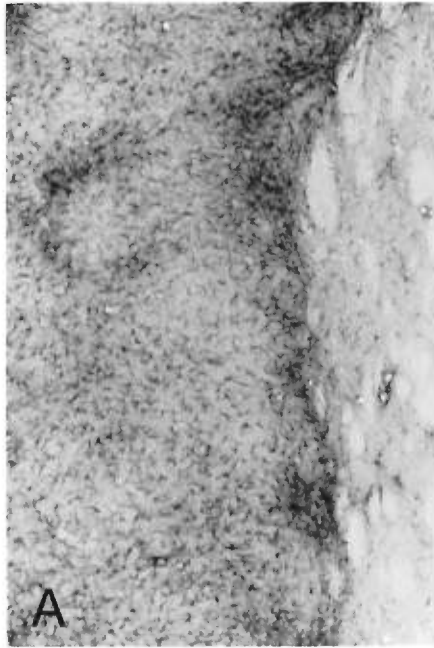














Chapitre 6: DISCUSSION GÉNÉRALE

Le travail présenté ici a été réalisé pour mieux comprendre les conditions et les mécanismes régissant la plasticité anatomique des neurones 5-HT adultes. L'ensemble des résultats met en évidence l'influence de la cible (tissu transplanté), de l'âge de l'hôte, de la formation d'une cicatrice gliale et des caractéristiques régionales de la glie présente dans le greffon. Nous avons en outre constaté des effets trophique et tropique des astrocytes striataux sur les neurones DA de la greffe se traduisant par une augmentation de la taille des corps cellulaires DA et, par une rétention de leur axone.

6.1: Aspects méthodologiques

6.1.1: Immunohistochimie

La présence des astrocytes a été révélée par des anticorps polyclonaux et monoclonaux respectivement dirigés contre deux types de filaments intermédiaires; la GFAP et la vimentine. Dans le SNC, la GFAP se trouve uniquement dans les astrocytes [21, 98]. Le marquage immunohistochimique que nous avons observé était d'ailleurs compatible avec la morphologie et la distribution des astrocytes telles que précédemment décrites [243]. La détection des astrocytes immatures a été effectuée par l'immunohistochimie de la vimentine [66]. L'utilisation de cet anticorps a aussi induit un marquage artéfactuel (voir Chapitre 5) au niveau des noyaux des neurones du striatum. Cet artéfact, variable d'un animal à l'autre, était toutefois facilement distinguable du marquage spécifique de la vimentine. En effet, ce marquage a été retrouvé dans les cellules précédemment décrite comme contenant cette protéine, i.e. la glie radiaire, l'épendyme, les cellules endothéliales et des astrocytes de la matière blanche (voir [97]). Cette protéine des filaments intermédiaires peut aussi être exprimée *in vivo* par les cellules microgliales [134]. Ces dernières peuvent en outre être révélées par immunohistochimie avec le OX-42, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de type 3 du complément (CR3), présent sur la microglie [133]. Des travaux récents ont montré que la microglie exprimant le CR3 apparaît dans les greffes neuronales que 3-4 jours après la transplantation et disparaît au bout de 1-1,5 mois [12, 259]. Nous pouvons donc supposer que les cellules exprimant la vimentine qui étaient présentes dans la greffe dès les premières 24 heures après la transplantation et subsistant après 2 mois étaient des astrocytes immatures. Chez des animaux lésés, des techniques de double marquage utilisant des anticorps dirigés contre la GFAP et contre la

vimentine ont en outre montré que la majorité des cellules immunoréactives à la vimentine autour des sites lésionnels expriment aussi la GFAP [168, 268]. Ceci suggère qu'au moins la majorité des cellules immunopositives à la vimentine étaient des astrocytes. Dans le cadre des expériences à effectuer pour compléter l'article encore en préparation (Chapitre 3), la détection des cellules microgliales dans les cultures d'astrocytes, dans les greffes simples et dans les co-greffes sera néanmoins réalisée à l'aide de l'OX-42 afin de nous assurer de la présence minoritaire de ces cellules.

Les neurones DA inclus dans le tissu mésencéphalique greffé ont été révélés à l'aide d'un anticorps dirigé contre la TH. Le marquage obtenu dans le striatum, le cortex et la substance noire était typiquement celui, bien reconnu, des neurones DA et de leurs projections axonales dans le cerveau de l'hôte (pour revue voir [28, 103]) et dans les greffes mésencéphaliques [30, 56, 88]. En de rares occasions, des neurones immunopositifs à la TH ont été aperçus dans le tissu striatal fœtal greffé, comme précédemment décrit dans le striatum immature [174] et dans les greffes striatales [264].

Pour évaluer la présence des fibres et des neurones 5-HT à l'intérieur des greffes et des co-greffes, nous avons eu recours à l'immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre la 5-HT [123]. Cet anticorps a été largement utilisé dans le laboratoire. Les contrôles négatifs ont été effectués sur des rats après lésion par la 5,7-DHT des neurones 5-HT du raphé. Dans ce cas, son utilisation ne produit plus aucun marquage dans le striatum, le septum et le cortex de l'animal lésé (voir Chapitre 2; Mounir et al. 1994). Les contrôles effectués en pré-enrobage pour vérifier la présence éventuelle de neurones 5-HT dans les greffes ou co-greffes de tissu mésencéphalique fœtal se sont révélés tous négatifs. Dans les cas préparés pour la capture de [³H]5-HT, nous avons utilisé un anticorps polyclonal commercial d'une très grande sensibilité (utilisé au 1/10000) dirigé contre la 5-HT et nous n'avons vu aucun corps cellulaire immunopositif pour la 5-HT dans les tranches de 200 µm d'épaisseur des pôles rostral ou caudal des greffes ou co-greffes, alors que les fibres exprimant la 5-HT étaient détectées dans les régions attendues.

Une caractéristique de l'approche autoradiographique après capture de monoamines tritiées est qu'elle ne détecte pas les corps cellulaires et les dendrites de ces neurones [85]. Ainsi, pour nous assurer de l'absence de neurones 5-HT à l'intérieur des greffes examinées par autoradiographie, nous avons adapté la technique d'immunohistochimie en post-enrobage de Beaulieu et al. [15]. Nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la TpOH

[315] sur les coupes semi-fines des tranches incubées avec le traceur et traitées en post-enrobage. L'immunohistochimie de la TpOH n'a pas, non plus, révélé la présence de corps cellulaire 5-HT à l'intérieur des greffes ou des co-greffes, alors qu'un très grand nombre de corps cellulaires a été immunocoloré dans des coupes similairement traitées du raphé utilisées comme témoins positifs. L'ensemble de ces contrôles (utilisation d'anticorps dirigés contre la 5-HT et contre la TpOH sur un même animal) nous permettent d'affirmer que les fibres 5-HT détectées dans les greffes ou co-greffes provenaient fort probablement de l'hôte plutôt que de neurones 5-HT fœtaux fortuitement prélevés et greffés en même temps que le tissu mésencéphalique. Néanmoins, il est pertinent de noter que la détection immunohistochimique des fibres 5-HT est plus difficile que celle des corps cellulaires. Nous avons donc utilisé la technique d'autoradiographie quantitative après capture de [^3H]5-HT afin d'évaluer plus précisément l'innervation 5-HT des différentes sortes de greffes.

6.1.2: Capture de monoamines tritiées et autoradiographie quantitative

Cette technique, basée sur la capture *in vitro* de monoamines tritiées marque seulement les terminaisons d'axones des neurones monoaminergiques [85]. Celles-ci apparaissent sous la forme de petits agrégats de grains d'argent très facilement reconnaissables par rapport au bruit de fond formé de grains d'argent isolés. Pour le travail présenté dans cette thèse, nous avons utilisé la [^3H]DA (voir Chapitre 4) et la [^3H]5-HT (voir Chapitre 2 et 3). Nous avons bloqué respectivement la dégradation de la [^3H]5-HT par la monoamine oxydase et sa recapture par les terminaisons DA en incubant les tranches en présence de pargyline et de mésylate de benztropine. Cette dernière drogue est aussi connue comme un antagoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques [37] exprimés par les neurones cholinergiques et non cholinergiques du striatum [155]. Toutefois, le mésylate de benztropine n'a aucun effet évident sur le nombre de terminaisons 5-HT marquées dans le néostriatum. En effet, lors de la mise au point de la technique, la benztropine avait été utilisée pour abaisser le bruit de fond diffus dû à la capture à plus faible affinité de 5-HT tritiée par les terminaisons DA. Le nombre d'agrégats de grains d'argent ne fut pas diminué. Par contre, ils furent plus faciles à distinguer du bruit de fond [86, 289]. Enfin, il est important de noter que si les astrocytes ont la capacité de capter la 5-HT, ils ne la stockent pas, la métabolisant rapidement en acide hydroxyindolacétique (5-HIAA) [112]. Ils ne peuvent donc contribuer au

signal autoradiographique observé sous forme de petits agrégats de grains d'argent, typiques des terminaisons ou varicosités axonales [85-87]. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, une des particularité de cette technique est qu'elle ne marque pas les corps cellulaires et les dendrites des neurones 5-HT [85]. Cette technique a donc été couplée à des méthodes d'immunohistochimie en pré- et post-enrobage pour la détection respective de la 5-HT ou de son enzyme de synthèse, la TpOH.

Dans nos conditions de travail, cette technique nous a permis de quantifier de manière optimale le nombre de terminaisons ou varicosités axonales 5-HT présentes dans nos transplants.

6.1.3: Conditions de culture

Afin de minimiser les possibilités que les différents effets observés puissent être dûs à des différences dans les conditions de culture des astrocytes, nous avons utilisé les mêmes milieux de culture, lots de sérum, types de substrat et quantités d'astrocytes ensemencés dans les boîtes de pétri. De plus, afin de nous assurer de la bonne reproductibilité de nos expériences *in vitro*, les cultures ont été examinées en immunocytofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre la N-CAM, contre la forme polysialylée de la N-CAM et contre la sous-unité α_2/δ du canal calcique voltage-dépendant. Des études immunocytochimiques effectuées sur des cultures d'astrocytes du cortex ont montré que l'expression de la N-CAM s'affaiblit avec la durée de culture [324]. La N-CAM est donc un marqueur de l'état de maturation des astrocytes. Des études *in vitro* effectuées sur des astrocytes du cortex ont aussi montré que différents lots d'un même sérum peuvent influencer la synthèse et l'expression de protéines, comme par exemple celles constituant le canal calcique [13]. La sous-unité α_2/δ est une des protéine qui constitue le canal calcique de type L présent sur les astrocytes [110, 164]. L'expression constante de cette sous-unité est donc un bon indice de l'état phénotypique des astrocytes cultivés. L'éventuelle présence d'oligodendrocytes et de leurs précurseurs a aussi été examinée par immunocytochimie à l'aide de deux anticorps; l'un dirigé contre le ganglioside GD-3, composant majeur des glycolipides des oligodendrocytes immatures [130] et l'autre, le R-mAb, dirigé contre les galactocérébrosides présents à la surface des oligodendrocytes [254]. Dans nos conditions de cultures, aucun marquage avec ces deux anticorps n'a été mis en évidence. Par contre, les marquages effectués sur des cultures d'astrocytes à haute

densité ont mis en évidence la présence de nombreux oligodendrocytes. De telles cultures n'ont donc pas été utilisées pour la co-transplantation. Enfin, la "maturité" des astrocytes en culture a été estimée par immunocytochimie de la vimentine et de la GFAP (voir Planche 1, Chapitre 4). À confluence, la comparaison entre le marquage au GFAP et l'image en contraste de phase nous a permis d'estimer à au moins 95% la proportion des cellules présentes dans nos cultures qui étaient des astrocytes.

La microglie réactive peut aussi exprimer le ganglioside GD-3 [96] et la vimentine [134]. Or, dans nos cultures d'astrocytes utilisées pour la co-transplantation, aucun marquage n'a été observé avec le GD-3, tandis que les cellules marquées par la vimentine n'avaient pas la morphologie de cellules microgliales. La présence de microglie dans les cultures d'astrocytes préparées d'après la méthode de McCarthy et al. [209] dépend de 2 facteurs: l'âge des donneurs et la densité d'ensemencement. Ainsi, des cultures d'astrocytes provenant de rat fœtaux (E18) contiennent 19% de cellules microgliales lorsqu'elles parviennent à confluence [177], tandis que celles provenant de rats néonataux, comme dans nos conditions, n'en contiennent qu'entre 2 et 10% [129, 177]. La quantité de microglie est aussi proportionnelle à la densité des astrocytes mis en culture [129]. Par exemple, des études récentes ont montré que des cultures d'astrocytes ensemencées à une densité de 20000 cellules/cm² ne contenaient à confluence qu'entre 1 et 6% de microglie [177]. Nous avons porté une attention particulière à la densité des cultures (~13000 cellules/cm²) et à l'âge des rats donneurs (P1-P2) pour les cultures de cellules gliales utilisées lors des co-transplantations. De ce fait, nous présumons que la quantité de microglie présente dans nos cultures d'astrocytes était semblable. Cependant, pour avoir une idée définitive quant à la proportion exacte de microglie dans nos cultures de cellules gliales, l'immunocytochimie avec l'anticorps monoclonal OX-42, couramment utilisé pour la détection et l'identification de la microglie [133], sera effectuée.

Nos conditions de cultures étaient semblables pour les trois types d'astrocytes mis en culture. L'immunocytochimie à l'aide des différents anticorps que nous avons utilisés nous incite à penser que nos cultures étaient relativement pures et contenaient peu de microglie et d'oligodendrocytes.

6.1.4: Greffes et co-greffes

Afin de comprendre l'influence de l'âge du receveur et de la provenance du tissu greffé sur la croissance des fibres 5-HT, nous avons effectué des greffes intrastriatales de tissu mésencéphalique ou striatal fœtal chez des rats immatures, juvéniles ou adultes. Nous avons montré, d'une part que la capacité des axones 5-HT d'innover les greffes diminue en fonction de l'âge du receveur et, d'autre part, que les fibres 5-HT ont une affinité différente pour le tissu nerveux (mésencéphalique ou striatal) transplanté. Pour expliquer cette différence, nous avons supposé que des facteurs, libérés par les neurones cibles ou par les astrocytes du greffon, puissent influencer la croissance des fibres 5-HT à l'intérieur du greffon. Il est connu que les fibres 5-HT innervant le néostriatum peuvent pousser à l'intérieur des transplants intrastriataux de tissu striatal ou cortical (voir [196]) mais pas dans le tissu mésencéphalique fœtal. Nous avons donc choisi de tester l'influence des astrocytes provenant de ces 3 régions sur le bourgeonnement intragreffé des fibres 5-HT innervant le néostriatum, en effectuant des co-greffes d'astrocytes cultivés avec du tissu mésencéphalique fœtal. Nous avons aussi réalisé des co-greffes d'astrocytes mésencéphaliques avec du tissu striatal fœtal ainsi que des greffes striatales simples, comme témoins. La co-greffe témoin nous a permis de montrer que les astrocytes du mésencéphale n'avaient pas un effet inhibiteur sur la pousse des fibres 5-HT. Nous n'avons pas effectué de transplants intrastriataux d'astrocytes seuls car il est connu que les astrocytes greffés migrent dans le tissu de l'hôte [6, 19, 148]. Nous n'aurions pas pu avoir de greffes bien délimitées dans le tissu de l'hôte. L'examen en immunohistochimie a montré que les greffes simples et les co-greffes de tissu mésencéphalique fœtal incluant des astrocytes du mésencéphale ne présentaient pratiquement pas d'innervation 5-HT. Pour l'autoradiographie quantitative, nous avons donc choisi de quantifier l'innervation 5-HT à l'intérieur de co-greffes de tissu mésencéphalique incluant des astrocytes du striatum ou du cortex cérébral ainsi que dans les greffes simples. Il faudra néanmoins compléter le travail en autoradiographie en augmentant le nombre d'animaux à étudier et en incluant des co-greffes contenant des astrocytes du mésencéphale.

6.2: Influence du tissu transplanté sur la croissance axonale des neurones 5-HT et sur les neurones DA

6.2.1: Relations entre l'origine du tissu transplanté et le degré d'innervation 5-HT des greffons

Nos résultats montrent une innervation 5-HT variable suivant le type de greffe. En effet, les fibres 5-HT provenant de l'hôte adulte ont peu tendance à pénétrer le tissu mésencéphalique, mais innervent profusément le tissu striatal. Ces résultats vont dans le sens de données antérieures montrant que la densité d'innervation des greffes par des fibres 5-HT de l'hôte dépend de l'origine anatomique des transplants [8, 167, 179, 196, 232].

Nous avons en outre démontré des différences d'innervation 5-HT à l'intérieur même des greffes striatales. On sait que la composition d'un transplant striatal est hétérogène, la présence de tissu pallidal et cortical y ayant été décrite [316]. Le tissu véritablement striatal peut être caractérisé par son immunoréactivité contre la DARPP-32 [237]; seules les zones DARPP-32 positives (+) du transplant striatal montrant des caractéristiques morphologiques propres au néostriatum [137, 316, 320]. Ces régions des greffes "striatales" étaient jusqu'à présent connues comme étant préférentiellement innervées par les fibres DA provenant de la substance noire de l'hôte [58, 316].

Notre analyse quantitative nous a permis de démontrer que les fibres 5-HT de l'hôte présentent aussi une plus grande affinité pour les régions DARPP-32 + du transplant striatal par rapport aux régions DARPP-32 négatives (-). La densité d'innervation y est significativement plus dense, quel que soit l'âge du receveur, avec toutefois un contraste moins fort que pour les fibres DA. Nous avons en outre mis en évidence une autre différence significative dans la densité d'innervation des fibres 5-HT entre les régions DARPP-32 + du transplant striatal et le tissu mésencéphalique fœtal, chez les animaux greffés à P15 et à l'âge adulte.

Nous sommes donc en présence d'au moins trois types de tissu greffé (mésencéphalique, striatal et "non-striatal" ou "cortical/pallidal") qui sont différemment innervés par les fibres 5-HT de l'hôte. Pour expliquer ces différences, on peut invoquer plusieurs hypothèses relatives 1) à l'incidence synaptique que les fibres 5-HT établissent normalement dans la cible; 2) aux propriétés différentes de la cicatrice gliale formée par des transplants intrastriataux homo- ou hétérotypiques; 3) à la présence de molécules

inhibitrices de la croissance axonale et 4) à la préférence des fibres 5-HT innervant le néostriatum de l'hôte pour les transplants homotypiques.

La première hypothèse avait été émise dans les années 80 afin d'expliquer les différences de densité de réinnervation 5-HT dans diverses régions cérébrales, après dénervation excitotoxique par la 5,6- ou la 5,7-DHT. Selon cette hypothèse, la capacité des neurones 5-HT de réinnover une région cérébrale donnée serait liée à la nature des relations intercellulaires (jonctionnelles ou non jonctionnelles) que ces neurones établissent normalement avec les neurones cibles de cette région (voir [36]). La réinnervation 5-HT spontanée de régions cérébrales où les fibres 5-HT forment rarement des relations synaptiques a été décrite après transplantation de l'hypothalamus [167], du cervelet [306] et de l'hippocampe [8]. En ligne avec cette hypothèse, une greffe intrahypothalamique du noyau suprachiasmatique, région présentant normalement une incidence synaptique élevée (45%) [38], est faiblement innervée par les fibres 5-HT de l'hôte adulte [167]. Donc, la faible densité d'innervation des fibres 5-HT trouvée dans les greffes de tissu mésencéphalique pourrait être liée à la forte incidence synaptique de l'innervation 5-HT de la substance noire [218]. Il existe cependant quelques exceptions à cette règle. Par exemple, l'organe sous-commissural, présentant normalement une innervation 5-HT jonctionnelle, est en fait densément réinnervé par les neurones 5-HT du raphé dorsal fœtal implanté dans la partie caudale du troisième ventricule, chez le rat préalablement traité par la 5,7-DHT [308]. Par conséquent, si une relation entre l'incidence synaptique et la densité d'innervation d'un territoire cible est fréquente, elle n'explique pas tous les aspects du processus de réinnervation des transplants par les fibres 5-HT de l'hôte. Des mécanismes plus fondamentaux, au niveau moléculaire, restent à découvrir.

La deuxième hypothèse suppose que la cicatrice gliale, formée par la transplantation homo- ou hétérotypique, puisse être responsable de ces différences d'innervation 5-HT dans les greffes. Ainsi, nos résultats ont montré que l'implantation de tissu striatal dans le néostriatum adulte n'induit pas une cicatrice gliale aussi compacte que les greffes mésencéphaliques. D'autres auteurs avaient rapporté que le tissu striatal transplanté était entouré d'une barrière de cellules gliales immunopositives au GFAP [329], mais celle-ci est quasiment identique à celles que nous avons observée autour des greffes intrastriatales homotypiques et nettement moins

importante que celle observée autour des greffes hétérotypiques. Cette dernière se forme à partir du dixième jour après la transplantation de tissu mésencéphalique et persiste au moins jusqu'au soixantième jour. Cependant, le marquage GFAP que nous avons réalisé sur des greffes mésencéphaliques simples et des co-greffes de 3 mois ou plus n'a pas montré de cicatrice gliale. Cette cicatrice ne semble donc pas permanente, comme l'avait montré Abrous et al. [1]. Nous pourrions néanmoins supposer que cette barrière puisse empêcher les fibres 5-HT de pénétrer dans le greffon mésencéphalique au moment critique, pendant que ce tissu présente des propriétés favorables à la croissance axonale. Il faudrait toutefois que cet effet s'exerce préférentiellement sur les fibres 5-HT car d'autres fibres, comme les axones provenant du cortex frontal de l'hôte adulte ou ceux provenant des neurones DA greffés ont la capacité de traverser la frontière entre les tissus donneurs et receveurs dans un sens ou dans l'autre [88]. De plus, il a été rapporté que l'innervation 5-HT de greffons intracérébraux se forme en moins d'une semaine après la transplantation dans le thalamus préalablement lésé à l'acide kaïnique [231]. Si le potentiel de croissance de ces axones, en l'absence d'une lésion excitotoxique, est aussi rapide dans les greffes intrastriales, les axones 5-HT de l'hôte auraient alors déjà envahi la greffe avant que la cicatrice gliale se soit formée, vers le 10ième jour post-greffe. De plus, nos données quantitatives ont aussi révélé que la densité d'innervation 5-HT des zones DARPP-32 - du greffon striatal est plus faible que celle des zones DARPP-32 + et comparable à celle du greffon mésencéphalique. La cicatrice gliale ne peut donc pas expliquer entièrement les différences dans la densité d'innervation 5-HT des différents types de tissus.

On pourrait aussi imaginer que des molécules, par exemple de la matrice extracellulaire, puissent inhiber la croissance axonale des fibres 5-HT de manière sélective. En effet, il a été montré que la ténascine, molécule de la matrice extracellulaire pouvant inhiber la croissance axonale [46, 100, 101], présente un pattern d'expression uniforme dans des transplants de tissu mésencéphalique fœtal et en mosaïque dans les greffes de tissu striatal [122]. Ce marquage est présent dans la greffe dès le 4ième jour post-greffe et reste détectable après trois semaines. On pourrait donc commencer par étudier l'expression de cette molécule au sein des greffes, et voir par exemple si les zones DARPP-32+ des transplants striataux, préférentiellement

innervées par les fibres 5-HT, seraient moins immunoréactives à la ténascine que les zones DARPP-32- ou que le tissu mésencéphalique fœtal.

Enfin, selon la dernière hypothèse, les fibres 5-HT trouvées dans les différents types de greffes intrastriatales étant présumément des bourgeonnements de celles qui innervent le néostriatum de l'hôte, elles pourraient donc avoir moins d'affinité pour du tissu cérébral provenant d'autres régions, qu'elles soient corticale, pallidale ou mésencéphalique. Les rares fibres mises en évidence dans ces greffes hétérotypiques pourraient ainsi être des collatérales de fibres provenant de neurones 5-HT innervant à la fois ces régions et le néostriatum. Il serait intéressant de voir si l'innervation 5-HT serait plus importante dans des greffes de tissu mésencéphalique implantées dans la substance noire.

L'ensemble de ces considérations concernant l'influence du tissu transplanté indique que les neurones 5-HT, connus pour leur mode de projection diffuse, peuvent présenter en réalité une affinité préférentielle pour certaines régions cibles, notamment les zones DARPP-32 + par rapport aux zones DARPP-32 - et au tissu mésencéphalique. Les hypothèses concernant le niveau tissulaire; nature de l'incidence synaptique des fibres 5-HT ou présence d'une cicatrice gliale, ne peuvent entièrement expliquer cette facilité des fibres 5-HT à innerver certaines régions cibles et pas d'autres. On peut alors supposer que les mécanismes responsables de ces différences dans l'innervation 5-HT impliquent l'existence, à la surface des axones 5-HT innervant le striatum, de récepteurs reconnaissant des molécules d'adhérence cellulaire, matricielles ou des facteurs trophiques exprimés spécifiquement par certaines cellules du tissu greffé.

Cette différence d'affinité des axones 5-HT néostriataux pour différents types de tissus fœtaux nous a incités à tester l'implication des astrocytes de la greffe dans ce phénomène. En effet, les astrocytes peuvent exprimer des molécules ayant une influence sur l'élongation ou le guidage des axones [46, 278, 310] ainsi que des facteurs trophiques [260]. En outre, il est reconnu que certaines caractéristiques phénotypiques des astrocytes s'expriment selon une spécificité régionale [143].

Notre hypothèse de départ, basée sur les données concernant l'innervation 5-HT des différents types de greffes [196], était que les astrocytes provenant du striatum ou du cortex cérébral pourraient favoriser la pénétration et le maintien des fibres 5-HT dans la greffe, tandis que ceux provenant du mésencéphale n'auraient aucun effet ou pourraient même être

inhibiteurs de la croissance axonale des neurones 5-HT (voir [88, 192]). Dans un premier temps, nous avons voulu voir si l'on pouvait augmenter l'innervation 5-HT du tissu mésencéphalique en lui ajoutant des astrocytes cultivés à partir de différentes régions du cerveau.

Nos résultats préliminaires, en immunohistochimie 5-HT aussi bien qu'en autoradiographie après capture de 5-HT tritiée, montrent que l'addition d'astrocytes du cortex ou du striatum favorise l'innervation 5-HT de la greffe mésencéphalique, alors que celle d'astrocytes provenant du mésencéphale ventral n'a pas d'effet promoteur sur cette innervation. En outre, les astrocytes mésencéphaliques n'ont pas d'effet inhibiteur sur les fibres 5-HT car les co-greffes témoins d'astrocytes du mésencéphale avec du tissu striatal foetal sont aussi bien innervées que les greffes striatales simples.

Comme nous l'avons déjà mentionné au Chapitre 6.1.1., aucune des greffes ou co-greffes examinées en immunohistochimie pour la 5-HT n'a montré de corps cellulaires immunoréactifs à la 5-HT. De plus, les greffes simples et les co-greffes contenant des astrocytes cultivés à partir du mésencéphale ventral, préparées au cours des mêmes sessions chirurgicales, ne présentaient pratiquement pas d'innervation 5-HT. Bien que variable, l'innervation 5-HT des co-greffes contenant des astrocytes du cortex était toujours supérieure, parfois largement, à celle trouvée dans les greffes mésencéphaliques simples ou dans les co-greffes incluant des astrocytes du mésencéphale. Toutefois, la détection des fibres 5-HT en immunohistochimie est difficile à apprécier et à comparer à cause de la finesse de ces éléments et de la variabilité du marquage due à la sensibilité de l'anticorps. Nous avons opté pour la technique d'autoradiographie après capture de [^3H]5-HT afin d'évaluer plus précisément l'innervation 5-HT des co-greffes contenant des astrocytes du striatum ou du cortex par rapport aux greffes simples. Un premier examen nous a permis de constater que les greffes simples de mésencéphale ventral contenaient toutes très peu d'accumulations de grains d'argent typiques de varicosités marquées par capture de [^3H]5-HT, quoique un peu plus que prévu sur la base des résultats immunohistochimiques. En revanche, les agrégats de grains d'argent étaient beaucoup plus nombreux au sein des co-greffes contenant des astrocytes striataux ou corticaux, bien qu'en nombres variables d'un cas à un autre. Cette différence pourrait être due à une plus grande sensibilité de

l'autoradiographie dans la détection des fibres marquées par l'accumulation de [^3H]5-HT.

Ces résultats préliminaires devront être confirmés avec un nombre plus élevé d'animaux. Ces expériences inclueront des co-greffes de tissu mésencéphalique et d'astrocytes du mésencéphale.

Pour comprendre les raisons des différences déjà apparentes dans la densité d'innervation 5-HT entre les co-greffes, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses telles que: 1) l'influence de la microglie présente dans les cultures, 2) une activation différentielle de la microglie résidente selon le tissu greffé et 3) un effet direct des astrocytes co-greffés, sur la croissance des axones 5-HT dans les co-transplants.

On sait que la microglie est capable d'agir sur les astrocytes [18] et sur les neurones [294] par l'intermédiaire de cytokines (pour revue voir [94]). Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné dans le Chapitre 6.1.3., des études ont montré que les cultures d'astrocytes provenant de rats néonataux, ensemencées à une densité de 20000 cellules/cm², ne contenaient à confluence qu'entre 1 et 6% de microglie [177]. Étant donné que nous avons porté une attention particulière à la densité des cultures d'astrocytes (~13000 cellules/cm²) et à l'âge des rats donneurs (P1-P2) pour les cultures de cellules gliales utilisées lors des co-transplantations, nous présumons que la quantité de microglie présente dans nos cultures d'astrocytes était semblable et sans doute faible. En outre, il n'existe présentement aucune donnée montrant que la microglie puisse présenter des phénotypes régionaux dans le SNC. On peut donc penser que la microglie présente dans les cultures n'est pas responsable de la pousse différentielle des fibres 5-HT lorsqu'elles sont co-greffées. S'il y a un effet provenant de la microglie des cultures, il devrait être uniforme pour tous les types de cultures. Il faudra néanmoins réaliser l'immunocytochimie à l'aide du OX-42 sur les différentes cultures afin de nous assurer que la quantité de microglie y était effectivement égale.

Nous avons montré que la formation d'une cicatrice gliale était différente suivant le type de tissu greffé (mésencéphalique versus striatum; voir Chapitre 6.2.1.). Mais, sa présence est aussi dépendante du genre de traumatisme induit (lésion versus greffe). En effet, contrairement aux rats greffés nouveau-nés, la cicatrice gliale persiste chez les rats lésés à la naissance. On pourrait imaginer un même processus quant à la présence et l'activité de la microglie qui seraient différentes suivant le type de tissu greffé. En effet, il semble que la durée de la réaction microgliale dépende de

l'importance de la lésion, de la région où elle est effectuée et des techniques utilisées pour son induction (greffe, lésion mécanique, chimique) [4]. Par exemple, après section du fornix chez le rat adulte, l'immunohistochimie avec l'anticorps OX-42 persiste jusqu'à 12 mois après la lésion [293] alors qu'elle a pratiquement disparu au bout d'un mois et demi seulement lors de greffes de mésencéphale ventral [12]. On peut aussi imaginer que les astrocytes co-greffés puissent exprimer un type de cytokine, le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) qui pourrait augmenter le recrutement des macrophages au niveau du site lésé [176]. Les macrophages, connus pour être une source de cytokines [271], pourraient alors transformer l'environnement non-permissif du tissu mésencéphalique en un environnement permissif [71]. Il faudrait donc d'une part étudier le décours temporel de la microglie dans les co-greffes pour voir si sa présence, comme celle de la cicatrice gliale, ne serait pas liée au type de tissu transplanté et, d'autre part, pour voir si les astrocytes striataux ou corticaux présenteraient des propriétés différentes par rapport aux astrocytes du mésencéphale quant à leur capacité d'exprimer le M-CSF. Toutefois, un effet des cytokines sur la croissance axonale 5-HT n'a pas encore été rapporté.

Des cellules microgliales cultivées à partir du cerveau de rats néonataux et greffées dans la moelle épinière, préalablement lésée, de rats adultes peuvent promouvoir la pousse de fibres nerveuses immunoréactives aux neuro-filaments et au peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) [250]. Cependant, les auteurs ne savent pas si cette pousse est due à un effet direct de la microglie greffée sur les axones ou à un effet indirect par l'intermédiaire des cellules de l'hôte qui s'infiltrent telles les macrophages, les cellules de Schwann ou les cellules endothéliales. Enfin, cette étude a montré que les fibres 5-HT n'étaient pas capables de croître à travers le transplant microglial. On pourrait imaginer que si la microglie n'est pas capable d'agir directement sur les axones 5-HT, elle pourrait agir indirectement via, par exemple, les astrocytes co-greffés. En effet, la production de facteurs trophiques par les astrocytes co-greffés peut être stimulée par des cytokines microgliales ou macrophagiques [236, 271]. Par exemple, des cytokines de type inflammatoire exprimées après une lésion dans le SNC pourraient influencer la production de molécules de la matrice extracellulaire par les astrocytes présents au niveau du site lésé [82]. L'interleukine-1 (IL-1) peut être libérée par les cellules inflammatoires [271]. Or, l'activation du récepteur de IL-1 sur les astrocytes du cortex provoque la

libération de NGF (nerve growth factor) [51, 119] dont le récepteur spécifique, le TrkA, est exprimé par les neurones 5-HT [285]. Il reste à voir si les astrocytes striataux ou corticaux présentent des propriétés similaires ou différentes quant à l'expression du récepteur IL-1 et à leur capacité d'exprimer le NGF.

Si l'on considère que c'est la nature des astrocytes co-greffés qui est principalement responsable des effets observés sur la pousse différentielle des fibres 5-HT, à cause de leur phénotype régional distinct, ceux-ci pourraient agir *in situ* par la production de molécules de la matrice extracellulaire promotrices de l'élongation axonale, telles que la laminine [187], la fibronectine [242] ou dans certains cas la ténascine [138]. Ils pourraient aussi exprimer des molécules d'adhérence cellulaire de la famille des cadhérines [223] ou des immunoglobulines, comme la N-CAM [228]. Nous avons d'ailleurs mis en évidence une expression différente de N-CAM et de N-CAM polysialylée dans des cultures d'astrocytes du striatum et du cortex cérébral. Il serait intéressant de savoir si les astrocytes co-greffés gardent la capacité d'exprimer *in situ* cette famille d'immunoglobulines.

Les astrocytes co-greffés pourraient aussi agir par la libération de facteurs trophiques. Par exemple, les neurotrophines (NT) comme le BDNF ou les NT-3 et NT-4/5 ont un effet promoteur sur la croissance des fibres 5-HT de l'hôte adulte dans un transplant homotypique de moelle épinière fœtale [20, 45]. L'infusion de BDNF dans le néocortex de rats adultes normaux stimule le bourgeonnement axonal des neurones 5-HT [202] en augmentant la densité des axones 5-HT autour du site d'administration et protège partiellement les axones 5-HT des effets de la p-chloroamphétamine (PCA, neurotoxine spécifique des neurones 5-HT) [203]. De plus, le BDNF favorise la survie de la lignée cellulaire RN46A, dérivée des cellules 5-HT du raphé, via le récepteur TrkB [93]. Celui-ci est d'ailleurs exprimé par des neurones situés dans les noyaux du raphé dorsal et médian [216] et le bourgeonnement des axones 5-HT pourrait être induit par son intermédiaire [199]. Enfin, les neurones 5-HT, identifiés par leurs propriétés électrophysiologiques, répondent à une administration chronique de BDNF dans le raphé dorsal par une baisse de leur activité spontanée [54]. Cependant, le BDNF est exprimé aussi bien dans la substance noire que dans le striatum et le cortex cérébral [157, 270, 276]. Or, contrairement aux co-greffes contenant des astrocytes provenant du cortex cérébral ou du striatum, il apparaît, selon nos premiers résultats en immunohistochimie, que les astrocytes du mésencéphale n'ont

pas d'effet, ni promoteur ni inhibiteur sur l'innervation 5-HT des greffes. Ils ne favorisent pas la croissance des axones 5-HT dans le transplant mésencéphalique et n'ont pas non plus d'effet négatif puisque les co-greffes de tissu striatal foetal avec des astrocytes du mésencéphale étaient aussi bien innervées que les greffes simples de striatum. Ces résultats sont conséquents avec des études *in vitro* qui ont montré que, bien que la présence d'astrocytes mésencéphaliques puisse promouvoir, en synergie avec la 5-HT elle-même, la survie des neurones 5-HT, elle n'augmente pas leur croissance neuritique [192]. Toutefois, des différences dans les niveaux d'expression du BDNF parmi les populations d'astrocytes co-greffés, ou encore une séquestration de ce facteur trophique par la forme tronquée du TrkB (voir l'exemple des astrocytes de l'hippocampe exprimant la forme tronquée du TrkB *in vitro* et *in vivo* [262]) des astrocytes du mésencéphale pourraient rendre compte de ces effets différents.

Plusieurs études avaient été réalisées dans le passé impliquant des greffes simples d'astrocytes cultivés. La plupart de ces expériences ont été réalisées pour étudier soit la compensation de déficits comportementaux [171, 172, 195, 304, 325] ou mnésiques [42] induits par des lésions préalables, soit pour analyser la migration ou la survie des astrocytes greffés [6, 148, 149]. Quelques études avec des greffes d'astrocytes immatures dans un site lésé ont montré que les fibres nerveuses étaient capables de régénérer à travers le greffon [323] et que ce type d'implant supprimait la cicatrice gliale généralement induite au site d'injection [281] (voir Chapitres 4.2, 4.3 et 4.4 pour détails). À date, une seule équipe a réalisé des co-greffes d'astrocytes avec du tissu mésencéphalique foetal [177]. L'innervation 5-HT de ces transplants n'a toutefois pas été examinées.

En résumé, nos résultats préliminaires semblent montrer que l'ajout d'astrocytes du striatum ou du cortex cérébral mais non l'ajout d'astrocytes du mésencéphale au tissu mésencéphalique foetal transplanté favorise la pénétration des fibres 5-HT néostriatales dans le greffon. Que cet effet soit dû aux seuls astrocytes co-greffés ou qu'il se fasse par l'intermédiaire de la microglie ou des macrophages présents au niveau du site d'implantation, il faudra montrer en quoi l'addition d'astrocytes du mésencéphale agit différemment de celle du striatum ou du cortex. Pour cela, le laboratoire se propose d'examiner et de comparer le pattern d'expression des ARNm présents dans les trois types de cultures d'astrocytes d'après la technique de

Liang et al. [184]. Le but étant de savoir s'il existerait certaines protéines spécifiques à une population d'astrocytes et pas à une autre.

6.2.2: Effet des astrocytes co-greffés avec le tissu mésencéphalique sur les péricarya DA et leurs prolongements

L'analyse du marquage immunohistochimique et autoradiographique des neurones DA des transplants nous a permis de constater trois effets majeurs des astrocytes co-greffés sur ces neurones: 1) Une distribution plus uniforme des péricarya au sein des 3 types de co-greffes; 2) une augmentation de la taille de leur corps cellulaire et de leur arbre dendritique dans les co-greffes contenant des astrocytes du striatum; et 3) une rétention des axones DA au sein des co-greffes contenant des astrocytes du striatum, au détriment de l'innervation du striatum de l'hôte telle qu'observée avec tous les autres types de greffes et co-greffes.

Dans des transplants de tissu mésencéphalique fœtal réalisés chez des rats adultes, il est habituel de retrouver les neurones DA à la frontière greffe/hôte (voir par exemple [88]). Une distribution plus uniforme a toutefois été décrite lors de l'examen de ces greffes quelques jours après implantation [1], ce qui suggère que les neurones DA migrent vers la périphérie ou qu'il y a dégénérescence des neurones DA au cœur du transplant. Or, toutes les co-greffes présentent une distribution homogène à l'intérieur de la greffe, au moins jusqu'à 6 mois après l'implantation. Nos résultats ont été confirmés par Krobert et al. qui retrouvent le même type de distribution homogène dans des co-greffes de tissu mésencéphalique fœtal contenant des astrocytes cultivés et provenant du striatum [177]. La cause de cette distribution est encore inconnue. On pourrait néanmoins supposer qu'elle soit due à un effet trophique des astrocytes qui retiendrait les neurones dans le corps de la greffe. Mentionnons par exemple que l'adhérence cellulaire entre les neurones et les astrocytes ne montrent pas de spécificité régionale [145]. On pourrait aussi penser à un effet trophique qui empêcherait les neurones DA de mourir.

Des études antérieures ont montré que du tissu striatal fœtal co-transplanté dans le striatum avec du tissu mésencéphalique fœtal, en une seule suspension [49, 62] ou en deux greffes séparées de 1 mm [326], chez le rat adulte préalablement traité à la 6-OHDA, induisait une augmentation de la taille des neurones DA greffés et favorisait leur survie ainsi que la croissance de leur axone. Des études *in vitro* ont aussi montré que l'addition

de tissu striatal dissocié à des cultures de mésencéphale ventral augmentait la synthèse et la capture de la DA [81, 245] et stimulait l'arborisation neuritique des neurones DA [245], contrairement au tissu provenant d'autres régions du système nerveux (comme le cortex occipital) qui ne sont normalement pas densément innervées par les neurones DA [78, 152]. Ce type d'étude *in vitro* a aussi permis de mettre en évidence un effet promoteur des astrocytes du striatum spécifiquement sur l'arborisation axonale des neurones DA [76] et sur la capture de DA [180]. Enfin, des extraits solubles de striatum provenant de rats adultes normaux [302] ou de patients parkinsoniens [52] augmentent le nombre et la taille des neurones DA en culture ainsi que leur réseau neuritique. Ces travaux ont montré un effet du striatum sur le développement nucléaire et neuritique des neurones DA. Nos données permettent ainsi de préciser *in vivo*, que l'effet du tissu striatal sur les neurones DA pourrait être dû, au moins en partie, à ses astrocytes.

Toutes ces observations suggèrent l'existence de facteurs trophiques en provenance de la cible striatale et capables d'agir sur les neurones DA. D'ailleurs, plusieurs facteurs, exprimés par les astrocytes, montrent un effet protecteur ou trophique sur les neurones DA mésencéphaliques *in vitro* et/ou *in vivo*. Parmi ceux-ci, on compte des membres de la famille des neurotrophines comme le BDNF, NT-3 et NT-4/5 [156, 157, 298]. Par exemple, chez des rats lésés par la 6-OHDA, l'infusion de BDNF peut améliorer l'innervation du striatum de l'hôte par les neurones DA d'un transplant mésencéphalique [327] mais, contrairement aux résultats trouvés *in vitro*, n'a pas montré d'effet sur leur survie [265, 327]. Toutefois, chez des rats adultes soumis à une dénervation DA préalable, la co-transplantation intrastriatale de tissu mésencéphalique fœtal et d'astrocytes en culture provenant du striatum et transfectés avec le BDNF recombinant a montré un effet partiel sur la survie des neurones DA par rapport aux co-greffes témoins incluant des astrocytes striataux non transfectés [177].

Le GDNF, appartenant à la superfamille des "transforming growth-factor- β " (TGF- β) [17, 170, 301] et exprimé par une lignée de cellules gliales (B49) [189], apparaît aussi comme un bon candidat au rôle de facteur neurotrophique dérivé de la cible pour les neurones DA, du fait de son expression plus importante dans le striatum [77, 241, 290, 297] que dans la substance noire [267]. Chez des rats ayant subi une axotomie des neurones DA, l'injection de GDNF dans le mésencéphale prévient la perte de ces cellules [17]. L'effet toxique d'une infusion de 6-OHDA sur les neurones DA,

dans la substance noire ou dans le striatum de rats adultes est contrebalancé par l'injection de GDNF ou d'un vecteur adénoviral exprimant le GDNF dans la substance noire [57, 170] ou dans le striatum [22, 258]. Les effets protecteurs sont encore plus probant lorsque le GDNF est injecté dans le striatum [301]. Enfin, l'injection du GDNF dans le striatum d'un rat adulte préalablement traité par la 6-OHDA augmente la survie et la croissance axonale des neurones DA greffés et produit une amélioration plus rapide que la greffe de mésencéphale seule, des déficits comportementaux consécutifs à la destruction de la voie nigrostriée intrinsèque [257].

On pourrait aussi imaginer que la microglie et les macrophages présents au niveau du site lésé [124, 295] puissent libérer des facteurs trophiques capables d'agir sur les neurones DA, soit indirectement via les astrocytes co-greffés (voir [10]) ou directement sur les neurones (voir [266]). Par exemple, des études *in vitro* ont montré que des astrocytes de souris soumis à l'action de l'IL-1 ou de l'interféron-gamma (cytokines libérées par la microglie) étaient capables d'exprimer le GDNF [7]. Toutefois, des expériences réalisées *in vivo* ont montré qu'une lésion mécanique du striatum chez la souris adulte pouvait aussi induire une expression de GDNF par les macrophages [185]. Certaines de ces cytokines peuvent aussi avoir des effets sur les neurones DA. Par exemple, l'IL-1, contenue et libérée progressivement à partir de capsules implantées dans le striatum de rats adultes préalablement soumis à une dénervation DA par la 6-OHDA, favorise la pousse locale de fibres DA provenant de l'aire tegmentaire ventrale [311]. L'IL-6 est aussi capable d'améliorer la survie de neurones DA fœtaux *in vitro* [178]. Enfin, chez le rat adulte, la dégénérescence des neurones DA de la substance noire peut être inhibée par l'action du CNTF [140]. Des études ont montré que les neurones DA exprimaient l'ARNm du récepteur alpha du CNTF [160]. Il reste néanmoins à démontrer que seuls les astrocytes striataux co-greffés sont capables d'agir de manière spécifique sur la microglie et les macrophages. En imaginant que ces dernières ont une action directe sur les neurones DA, il faudrait voir si ceux-ci expriment les récepteurs à IL-1 et IL-6.

Nous avons enfin observé une rétention des axones DA à l'intérieur du tissu mésencéphalique. Cette observation va dans le sens de données antérieures montrant une innervation DA préférentielle du tissu striatal fœtal co-greffé avec du tissu mésencéphalique au détriment du striatum receveur de rats adultes préalablement traités à la 6-OHDA [49, 326]. Le

travail de Krobert et al. a aussi confirmé nos données en montrant que l'ajout, au tissu mésencéphalique fœtal, d'astrocytes provenant du striatum néonatal (P0) et cultivés pendant plusieurs semaines empêchait la croissance des neurites DA hors de la greffe intrastriatale en contraste avec ce qui est observé lors d'une greffe de tissu mésencéphalique seul [177].

Les greffes mésencéphaliques sont présentement à l'essai pour le traitement de la maladie de Parkinson. Cependant, les effets sont encore sous-optimaux, en partie à cause du faible taux de survie des neurones fœtaux greffés. La perspective d'améliorer la survie des neurones DA greffés et la quantité d'innervation qu'ils peuvent produire dans le striatum de l'hôte est ainsi d'un grand intérêt clinique.

Pour tenter d'augmenter l'efficacité des greffes, plusieurs orientations ont été envisagées. L'une d'entre elles est le développement de lignées de cellules d'origine neurale (C6 glioma, AtT-20 neuro-endocrine) ou non neurale (NIH-3T3 fibroblasts, RIN pancreatic cells, SVG-TH), génétiquement modifiées, pour favoriser la survie des neurones DA, augmenter le taux de DA dans le striatum [120] ou améliorer des déficits comportementaux chez des rats adultes traités par la 6-OHDA [304]. De telles lignées ont l'avantage d'être homogènes (les neurones DA ne représentent que 2 à 3% des cellules contenues dans le tissu mésencéphalique fœtal). Cependant, le risque important d'une formation tumorale représente un frein certain pour une utilisation en routine chez l'humain [26].

Une autre approche consiste à améliorer la survie des neurones DA inclus dans la greffe mésencéphalique et leurs projections vers le striatum de l'hôte à l'aide de facteurs trophiques. Un tel facteur trophique pourrait aussi exercer un effet protecteur sur les neurones DA non encore détruits du receveur. La principale difficulté de cette approche est le mode d'administration de ces facteurs trophiques qui ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique. L'injection via une canule intracérébrale est en effet difficilement envisageable chez l'humain en mode chronique. Par exemple, l'infusion intrastriatale répétée du bFGF induit une réaction inflammatoire dans le striatum du rat adulte [208]. Pour pallier à cette difficulté, on a proposé l'utilisation de capsules contenant des facteurs trophiques qui peuvent être libérés graduellement *in situ*. Par exemple, des petites billes de fibrine contenant du GDNF ont été incorporées au tissu mésencéphalique fœtal et greffées dans la chambre antérieure de l'oeil, chez le rat adulte. La

libération progressive du GDNF se produit en même temps que la lyse graduelle du récipient, qui disparaît au bout de 2 semaines. Un mois après la transplantation, le nombre de neurones DA et la densité des fibres DA était plus important dans la greffe ayant été exposé au GDNF que dans la greffe témoin exposée seulement au véhicule (tampon salin) [55]. Cependant, la grosseur des contenants devient rapidement un facteur limitant avec cette approche.

La co-greffe d'astrocytes du striatum avec des neurones DA, pourrait pallier à plusieurs problèmes soulevés ci-haut. En effet, il s'agit de cellules gliales non transformées, ce qui élimine le risque de tumeurs. En outre, ces astrocytes proviennent de la région même du site d'implantation et ils semblent exprimer naturellement un facteur trophique agissant sur les neurones DA co-greffés.

Les résultats présentés dans cette partie montrent que seuls les astrocytes striataux co-greffés avec du tissu mésencéphalique fœtal induisent une augmentation de la taille des péricarya DA, de leur arbre dendritique, et une rétention de leur axone à l'intérieur du greffon. Il faudra néanmoins comprendre par quel(s) mécanisme(s) les astrocytes striataux peuvent agir, seuls ou de concert avec la microglie, sur ces paramètres liés au développement des neurones DA. Cependant, leur impact négatif sur l'innervation DA du striatum de l'hôte préalablement dénervé ne nous permet pas à priori de proposer cette approche pour améliorer la thérapie de la maladie de Parkinson par les techniques de transplantation. En effet, il est connu qu'une meilleure récupération fonctionnelle suite à une greffe de neurones DA est liée à la restauration d'une innervation DA dans le striatum de l'hôte [312].

Seuls les astrocytes striataux ont montré un effet à la fois sur le développement des neurones DA et sur la croissance des fibres 5-HT après co-transplantation. On semble donc retrouver dans ce cas la caractéristique des régions DARPP-32 + des greffes de tissu striatal fœtal qui attirent à la fois les axones DA et les axones 5-HT. S'il est bien reconnu que le GDNF favorise la survie et le développement des neurones DA (voir plus haut), on n'a mentionné aucun effet sur les neurones 5-HT *in vitro* [241]. Malgré qu'on ait rapporté que la quantité de 5-HT striatale est, comme la DA, augmentée chez des rats nouveau-nés soumis à une injection bilatérale de GDNF dans le striatum [16], son effet sur les neurones 5-HT reste controversé (voir [53]). Néanmoins, l'injection de GDNF dans le ventricule latéral augmente le taux

de 5-HT dans l'aire tegmentale ventrale [205]. Le BDNF est connu comme ayant la propriété d'agir aussi bien sur les neurones DA que 5-HT [203, 298], mais il semble être exprimé faiblement dans le striatum adulte [270]. On peut alors évoquer la possibilité que les astrocytes co-greffés puissent sur-exprimer le BDNF. Enfin, il sera intéressant de savoir si la molécule qui agit sur les neurones 5-HT dans le cas des co-greffes enrichies en astrocytes striataux est la même que pour des co-greffes incluant des astrocytes du cortex cérébral. Dans un tel cas, on devra supposer qu'une molécule différente est responsable des effets des astrocytes striataux sur les péricarya DA et que ça ne devrait pas être une molécule comme le BDNF, qui possède les deux potentialités. Ceci illustrerait bien la différence entre une action trophique et un effet trophique.

6.3: Influence de l'âge de l'hôte sur l'innervation 5-HT de greffes intrastriatales

Toutes les greffes, mésencéphaliques comme striatales, sont moins bien innervées par les fibres 5-HT après implantation chez l'hôte adulte que chez l'hôte nouveau-né. De plus, la baisse est dans les mêmes proportions (75-80%) si l'on compare l'adulte au nouveau-né, pour les deux types de greffes.

Il semble que la capacité des neurones 5-HT d'innover le tissu mésencéphalique baisse plus rapidement avec l'âge de l'hôte, étant déjà comparable chez un receveur juvénile (P15) à la densité d'innervation 5-HT trouvée chez le receveur adulte. La diminution observée avec l'âge de l'hôte pour les greffes striatales est plus graduelle. Cette différence entre les deux types de greffes a été remarquée à plusieurs reprises dans nos expériences, bien qu'elle n'ait pu être démontrée statistiquement. Une telle démonstration nécessiterait en effet une analyse quantitative sur un nombre d'animaux beaucoup plus important. Ce point présente malgré tout un intérêt en raison des hypothèses que l'on doit soulever pour expliquer la baisse relativement plus rapide de la capacité des fibres 5-HT de l'hôte à innover du tissu mésencéphalique fœtal implanté dans le striatum. On pourrait par exemple postuler qu'un récepteur de molécules d'adhérence (ou d'un facteur trophique) puisse être régulé à la baisse (ou à la hausse, s'il reconnaît des molécules inhibitrices) avec la maturation de l'innervation 5-HT intrinsèque de la substance noire. Lorsque l'innervation 5-HT serait complétée dans la substance noire normale (entre P14-P21), les fibres 5-HT cesseraient de croître aussi bien dans la greffe intrastriatale de tissu mésencéphalique que

dans leur cible normale. Une régulation à la baisse de tels récepteurs sur des neurones qui ont établi leurs connexions avec leurs cibles, au cours de l'ontogénèse, a été rapportée pour le système visuel [59]. Dans le contexte présent, les fibres 5-HT perdraient leur affinité pour le tissu mésencéphalique mais garderaient leur capacité de pousser dans d'autres tissus cibles comme par exemple le striatum normal ou greffé. Il serait intéressant de voir si une lésion totale de la substance noire pourrait annihiler cette perte apparente d'affinité pour le tissu mésencéphalique greffé. Nos données montrent aussi que les fibres 5-HT subissent une baisse de leur capacité de croissance avec l'âge de l'hôte dans les 3 types de tissu examinés. En relation avec cette observation, des expériences ont montré qu'une infusion intracorticale continue de BDNF provoque chez des rats de 2-3 mois un fort bourgeonnement des fibres 5-HT autour du site d'infusion, alors qu'elle est sans effet chez des rats âgés de plus de 20 mois [204]. Une régulation à la baisse du récepteur TrkB, ou de ses mécanismes de transduction a alors été invoquée pour expliquer ce phénomène chez les rats âgés.

Toutefois, la meilleure innervation 5-HT des greffes réalisées chez le nouveau-né pourrait aussi être liée au développement de la greffe elle-même dans l'environnement du SNC adulte ou nouveau-né. Celle-ci pourrait, en effet, être différente après implantation chez le rat nouveau-né du fait par exemple de la migration plus fréquente de certaines cellules hors de la greffe, ce qui pourrait modifier sa composition et la rendre ainsi plus ou moins attractive pour les axones 5-HT. Les neurones DA par exemple manifestent cette tendance à sortir de la greffe et à infiltrer le tissu striatal de l'hôte après implantation chez le nouveau-né. Cependant, le même phénomène se produit lorsque l'implantation a lieu chez le rat juvénile (P14) [56], alors que la greffe est peu innervée par les neurones 5-HT de l'hôte.

Un autre facteur susceptible d'expliquer ces résultats est celui de la formation d'une cicatrice gliale qui est généralement moins importante chez le nouveau-né que chez l'adulte [193, 282]. Ceci pourrait expliquer la meilleure intégration anatomique des transplants effectués chez le nouveau-né par rapport à ceux réalisés chez l'adulte, notamment en ce qui concerne leur innervation 5-HT. En effet, contrairement à ce qu'il se passe chez l'adulte, chez un receveur nouveau-né la réaction gliale s'estompe graduellement et ne forme pas de cicatrice entre l'hôte et la greffe. Seuls quelques rares amas de cellules immunoréactives à la vimentine et à la

GFAP persistent après 2 mois dans la greffe implantée chez le nouveau-né. Cette absence pourrait faciliter la pénétration des fibres 5-HT dans les transplants mésencéphaliques. Toutefois, l'absence de cicatrice gliale n'explique pas pourquoi les fibres 5-HT innervent aussi préférentiellement les zones DARPP-32 + au dépend des zones DARPP-32 - dans des transplants de tissu striatal réalisés chez des rats à P5. Le lien entre la présence ou l'absence de la cicatrice gliale et la croissance des fibres 5-HT à l'intérieur du greffon reste donc à démontrer.

D'autres différences entre les greffons implantés chez le nouveau-né et chez l'adulte apparaissent de manière précoce et pourraient influencer sur la croissance des axones 5-HT dans la greffe. Nous avons notamment observé que les greffes de tissu mésencéphalique fœtal implantées chez le rat adulte contenaient beaucoup plus de cellules exprimant la vimentine et ce, dès les premières 24 heures post-implantation, que celles implantées chez le nouveau-né. La nature des cellules qui expriment la vimentine dans la greffe n'est pas certaine. En effet, la vimentine peut être exprimée par les astrocytes immatures [66] ou réactifs [50] ainsi que par la microglie réactive [134]. Chez le rat adulte, des études récentes ont montré que la microglie réactive, immunopositive à l'anticorps OX-42, apparaît dans les greffes de tissu mésencéphalique fœtal seulement après le troisième jour post-transplantation et disparaît au bout de 7 semaines [12]. Nous pouvons donc supposer que les cellules immunoréactives à la vimentine présentes dans la greffe en-deçà de 3 jours et au delà de 7 semaines sont des astrocytes "immatures".

En ce qui concerne la vimentine détectée dans le tissu du receveur, des techniques de double marquage utilisant des anticorps dirigés contre la GFAP et contre la vimentine réalisées chez des animaux lésés ont en outre montré que la majorité des cellules immunoréactives à la vimentine autour des sites lésionnels expriment aussi la GFAP [168, 268]. Ceci suggère que la majorité, sinon la totalité, des cellules immunopositives à la vimentine détectées dans le tissu receveur adjacent à la greffe sont des astrocytes.

En résumé, les résultats que nous avons présentés dans ce chapitre suggèrent que les fibres 5-HT perdent plus rapidement après la naissance leur affinité pour le tissu mésencéphalique que pour le tissu striatal greffé. Cette capacité de croissance dans les transplants diminue avec l'âge de l'hôte pour tous les types de greffes, mais on observe à tous les âges une affinité préférentielle des fibres 5-HT pour le tissu DARPP-32 + par rapport au tissu

DARPP-32 - ou au tissu mésencéphalique. La présence ou l'absence de cicatrice gliale n'explique pas entièrement ces différences d'innervation 5-HT dans les 3 types de tissu, malgré une certaine corrélation en fonction de l'âge de l'hôte ou du type de tissu greffé. Les résultats montrent aussi qu'il y a beaucoup moins de cellules exprimant la vimentine dans les greffes de mésencéphale implantées chez les nouveau-nés et dans les greffes de tissu striatal fœtal réalisées chez l'hôte adulte comparativement aux greffes de tissu mésencéphalique fœtal implantées chez le rat adulte. Il est intéressant de noter que le nombre de cellules exprimant la vimentine dans la greffe est inversement corrélé avec l'innervation 5-HT des transplants. Nous avons montré que les fibres 5-HT innervent préférentiellement les zones DARPP-32 +. Il sera intéressant de savoir si le marquage à la vimentine qui semble être distribué en mosaïque dans les greffes de tissu striatal recouvre l'organisation hétérogène (DARPP-32 + et -) des transplants striataux. On pourrait ainsi mettre en évidence un éventuel rôle inhibiteur de ces cellules immunopositives à la vimentine sur la pousse des fibres 5-HT dans les greffes.

Chapitre 7: CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons mis au point un modèle expérimental qui permet d'analyser les conditions déterminant la capacité de croissance de neurones adultes dans le SNC des mammifères. Ce modèle comporte les caractéristiques suivantes: analyse d'une population bien définie de neurones centraux, en l'occurrence les neurones 5-HT innervant les ganglions de la base; étude de la croissance axonale dans la matière grise, par opposition à la matière blanche et étude de la croissance au niveau de l'arborisation terminale des axones, plutôt que de leur régénération sur de longues distances.

En dépit de la complexité de l'interprétation des résultats avec une telle approche *in vivo*, celle-ci nous a permis de mettre en évidence certaines conditions influençant la croissance local des fibres 5-HT innervant le néostriatum.

Les neurones 5-HT, reconnus comme doté d'un mode de projection diffuse et divergent, peuvent en fait présenter une affinité préférentielle pour certaines régions cibles, notamment les zones DARPP-32+ plutôt que les zones DARPP-32- des greffes striatales ou le tissu mésencéphalique. Ces variations de l'innervation 5-HT selon le type de greffe laisse penser qu'il y a dans les cibles greffées une expression de ligands qui seraient reconnus par des récepteurs à la surface de certains des axones 5-HT. Ainsi, ceux innervant normalement le striatum porteraient des récepteurs leur conférant la capacité de reconnaître le tissu striatal et d'y pousser. Il sera intéressant de voir s'il serait effectivement possible de mettre à jour un lien entre de telles molécules et l'affinité des axones 5-HT pour des régions cérébrales particulières. L'approche par co-transplantation d'astrocytes en culture nous permet de croire que ce type de molécule pourrait être exprimé par les astrocytes selon une spécificité régionale cérébrale. Dans un premier temps, leur détection pourrait se faire *in vitro*. Par la suite, il serait possible, le cas échéant, de jouer sur leur régulation avant greffe pour voir si cela affecte le bourgeonnement des fibres 5-HT. Enfin, une fois ces protéines identifiées, la mise en évidence de leur(s) récepteur(s) sur les axones 5-HT pourrait être envisagée.

Nos données montrent une corrélation inverse entre la présence d'une cicatrice gliale et l'innervation 5-HT des greffes. Cependant, son apparition tardive (10 jours après la transplantation) et la distribution hétérogène des fibres 5-HT entre les zones DARPP-32+ et - des greffes striatales ne plaide pas en sa faveur pour un rôle majeur dans les différences d'innervation 5-HT des greffes. Néanmoins, il reste à voir si une réduction de la cicatrice gliale

pourrait augmenter la croissance des axones 5-HT dans des greffes mésencéphaliques implantées chez l'adulte, comme cela a été montré lors d'une lésion dans la moelle épinière [128].

D'après les données présentées dans ce travail, l'expression de la vimentine dans la greffe est corrélée avec une faible innervation 5-HT. Tout indique que les cellules exprimant cette protéine étaient en grande majorité des astrocytes "immatures". Or, ceux-ci sont connus comme favorisant la croissance axonale [107, 280, 283, 323]. Il faudrait donc supposer que dans le présent modèle, ces cellules pourraient s'être développées anormalement et ainsi produire des molécules inhibitrices de la croissance axonale normalement exprimées à un autre stade de leur développement. D'ailleurs, il a récemment été suggéré que certains éléments du cytosquelette glial pourraient réguler l'expression de molécules d'adhérence (CAMs ou SAMs) [106]. Suivant cette dernière hypothèse, dans le cas des co-greffes, l'effet éventuellement inhibiteur des cellules exprimant la vimentine pourrait être contre-balancé, ou le développement même de ces cellules pourrait être altéré, par l'ajout d'astrocytes du cortex ou du striatum mais pas du mésencéphale.

Nous n'avons pas d'indices clairs concernant la présence, l'état ou l'action de la microglie au sein des greffes et des co-greffes. Toutefois, aucune donnée n'a montré que la microglie puisse présenter des phénotypes régionaux dans le SNC. En outre, aucun effet spécifique des cytokines sur la croissance des fibres 5-HT n'a encore été mis en évidence. Enfin, il n'existe présentement aucune évidence nous permettant de croire que telle ou telle population d'astrocytes puisse sur-stimuler la microglie. Donc, nous pouvons penser que les effets sur la croissance des fibres 5-HT et sur le développement des neurones DA que nous avons rapportés seraient dus à l'action des astrocytes co-greffés eux-mêmes.

Le rôle de molécules exprimées par les astrocytes en culture pourrait être testé par la mesure ou par le blocage de leur expression avant la co-implantation dans le cerveau afin de corréliser cette expression avec les effets observés sur la croissance des axones du cerveau adulte. Il serait éventuellement possible d'appliquer ce type d'approche à d'autres populations neuronales du SNC adulte. En ayant une meilleure connaissance des interactions cellulaires et moléculaires qui contrôlent ou affectent la croissance d'axones bien définis, il sera plus aisé d'agir pour favoriser la pousse et la reconnexion des axones avec leur cible. Enfin, cette

approche expérimentale appliquée aux neurones 5-HT permettra peut-être aussi de développer de nouveaux concepts ou de découvrir de nouveaux principes qui pourraient éventuellement être extrapolés et généralisés aux autres types de neurones centraux adultes.

Chapitre 8: BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

1. Abrous, N., Guy, J., Vigny, A., Calas, A., Le Moal, M. and Herman, J. P., Development of intracerebral dopaminergic grafts: A combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences, *J. Comp. Neurol.*, 273 (1988) 26-41.
2. Agid, Y., Javoy-Agid, F. and Ruberg, M., Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. In: C. D. Marsden and S. Fahn (Eds.), *Movement disorders 2*, Butterworths, New York, 1992, pp. 166-230.
3. Aguayo, A. J., Björklund, A., Stenevi, U. and Carlstedt, T., Fetal mesencephalic neurons survive and extend long axons across peripheral nervous system grafts inserted into the adult rat striatum, *Neurosci. Lett.*, 45 (1984) 53-58.
4. Allore, R. J., Li, C. and Richardson, P. M., Infiltration of monocytes from the peripheral circulation to sites of injury in the CNS, *Exp Neurol (sous presse)*, (1997)
5. Andersson, C., Brunso-Bechtold, J. and Tytell, M., Immunocytochemical and ultrastructural characterization of type 1 astrocytes and 0-2A lineage cells in long-term co-cultures, *Brain Res.*, 646 (1994) 100-117.
6. Andersson, C., Tytell, M. and Brunso-Bechtold, J., Transplantation of cultured type 1 astrocyte cell suspensions into young, adult and aged rat cortex: cell migration and survival, *Int J Dev Neurosci.*, 11 (1993) 555-568.
7. Appel, E., Kolman, O., Kazimirsky, G., Blumberg, P. M. and Brodie, C., Regulation of gdnf expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli, *Neuroreport*, 8 (1997) 3309-3312.
8. Azmitia, E. C., Perlow, M. J., Brennan, M. J. and Lauder, J. M., Fetal raphe and hippocampal transplants into adult and aged C57BL/6N mice: A preliminary immunocytochemical study, *Brain Res. Bull.*, 7 (1981) 703-710.
9. Azmitia, E. C. and Whitaker-Azmitia, P. M., Target cell stimulation of dissociated serotonergic neurons in culture, *Neuroscience*, 20 (1987) 47-63.
10. Ban, E. M., Sarlieve, L. L. and Haour, F. G., Interleukin-1 binding sites on astrocytes, *Neuroscience*, 52 (1993) 725-33.
11. Barde, Y. A., Trophic factors and neuronal survival, *Neuron*, 2 (1989) 1525-1534.
12. Barker, R. A., Dunnett, S. B., Faissner, A. and Fawcett, J. W., The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. [Review], *Exp. Neurol.*, 141 (1996) 79-93.
13. Barres, A. B., Chun, L. L. Y. and Corey, D. P., Calcium currents in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitter and permissive effect of serum factor, *J. Neurosci.*, 9 (1989) 3169-3175.
14. Baumgarten, H. G., Lachenmayer, L. and Björklund, A., Chemical lesioning of indoleamine pathways. In: R. D. Myers (Eds.), *Methods in psychobiology*, 3, Academic Press, New York, 1977, pp. 47-98.
15. Beaulieu, C., Estimation of the number and size of GABA-containing neurons in the cerebral cortex, *Neurosci. Protocols*, 94-080-02-01-11 (1994) 1-11.
16. Beck, K. D., Irwin, I., Valverde, J., Brennan, T. J., Langston, J. W. and Hefti, F., Gdnf induces a dystonia-like state in neonatal rats and stimulates dopamine and serotonin synthesis, *Neuron*, 16 (1996) 665-673.
17. Beck, K. D., Valverde, J., Alexi, T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, R. A., Rosenthal, A. and Hefti, F., Mesencephalic dopaminergic neurons protected by gdnf from axotomy-induced degeneration in the adult brain, *Nature*, 373 (1995) 339-341.
18. Benveniste, E. N., Astrocyte- microglie interactions. In: S. Murphy (Eds.), *Astrocytes: pharmacology and function*, Academic Press, San Diego, 1993, pp. 355-383.
19. Bernstein, J. J. and Goldberg, W. J., Rapid migration of grafted cortical astrocytes from suspension grafts placed in host thoracic spinal cord, *Brain Res.*, 491 (1989) 205-211.
20. Bernstein-Goral, H. and Bregman, B. S., Withdrawal of transient serotonergic projections from non-target transplants is regulated by the availability of neurotrophic factors, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21 (1995) 1057.
21. Bignami, A., Eng, L., Dahl, D. and Uyeda, C., Localization of the glial fibrillary acidic protein in the astrocytes by immunofluorescence, *Brain Res.*, 43 (1972) 429-431.

22. Bilang-Bleuel, A., Revah, F., Colin, P., Locquet, I., Robert, J. J., Mallet, J. and Horellou, P., Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of parkinson-disease, *Proc Natl Acad Sci*, 94 (1997) 8818-8823.
23. Bixby, J. L. and Harris, W. A., Molecular mechanisms of axon growth and guidance, *Annu Rev Cell Biol*, 7 (1991) 117-159.
24. Björklund, A., Neural transplantation-an experimental tool with clinical possibilities, *Trends Neurosci.*, 14 (1991) 319-322.
25. Björklund, A., Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanism of graft-induced functional recovery, *Current Opinion Neurobiol.*, 2 (1992) 683-689.
26. Björklund, A., Neurobiology - better cells for brain repair, *Nature*, 362 (1993) 414-415.
27. Björklund, A., Dunnett, S. B., Stenevi, U., Lewis, M. E. and Iversen, S. D., Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing, *Brain Res.*, 199 (1980) 307-333.
28. Björklund, A. and Lindvall, O., Dopamine-containing systems in the CNS. In: A. Björklund and T. Hökfelt (Eds.), *Classical transmitters in the CNS*, 2, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 55-122.
29. Björklund, A., Lindvall, O., Isacson, O., Brundin, P., Wictorin, K., Strecker, R. E., Clarke, D. J. and Dunnett, S. B., Mechanisms of action of intracerebral neural implants: Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum, *Trends Neurosci.*, 10 (1987) 509-516.
30. Björklund, A. and Stenevi, U., Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplant, *Brain Res.*, 177 (1979) 555-560.
31. Björklund, A. and Stenevi, U., Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system, *Physiol Rev*, 59 (1979) 62-100.
32. Björklund, A. and Stenevi, U., Intracerebral neural implants: Neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries, *Annu. Rev. Neurosci.*, 7 (1984) 279-308.
33. Björklund, A. and Stenevi, U., Intracerebral neural grafting: A historical perspective. In: A. Björklund and U. Stenevi (Eds.), *Neural grafting in the mammalian CNS, Fernström Foundation Series 5*, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 3-14.
34. Björklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R. H., Dunnett, S. B. and Gage, F. H., Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions II. Survival and growth cell suspensions implanted in different brain sites, *Acta Physiol Scand [Suppl]*, 522 (1983) 9-18.
35. Björklund, A., Stenevi, U. and Svendgaard, A., Growth of transplanted monoaminergic neurons into the adult hippocampus along the perforant path, *Nature London*, 262 (1976) 787-790.
36. Björklund, A., Wiklund, L. and Descarries, L., Regeneration and plasticity of central serotonergic neurons: a review, *J Physiol Paris*, 77 (1981) 247-255.
37. Bolden, C., Cusack, B. and Richelson, E., Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells., *J Pharmacol & Exp Therap*, 260 (1992) 576-580.
38. Bosler, O., Ultrastructural relationship of serotonin and GABA terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. Evidence for a close interconnection between the two afferent systems, *J. Neurocytol.*, 18 (1989) 105-113.
39. Bosler, O., Vuillon-Cacciuttolo, G. and Saïdi, H., Long-term serotonin reinnervation of the suprachiasmatic nucleus after 5,7-dihydroxytryptamine axotomy in the adult rat, *Neurosci. Lett.*, 143 (1992) 159-163.
40. Boulaich, S., *Réinnervation sérotoninergique de l'hypothalamus par des transplants de raphé embryonnaire. Etude histologique et ultrastructurale dans les noyaux suprachiasmaticque et supraoptique chez le rat adulte*, Thèse de doctorat en Neurosciences, Marseille, Université de la méditerranée (Aix-Marseille II), 1996.

41. Boulaich, S., Daszuta, A., Geffard, M. and Bosler, O., Synaptic connectivity of serotonin graft efferents in the suprachiasmatic and supraoptic nuclei of the hypothalamus, *Exp. Brain Res.*, 101 (1994) 353-364.
42. Bradbury, E. J., Kershaw, T. R., Marchbanks, R. M. and Sinden, J. D., Astrocyte transplants alleviate lesion induced memory deficits independently of cholinergic recovery, *Neuroscience*, 65 (1995) 955-972.
43. Brecknell, J. E., Du, J. S., Muir, E., Fidler, P. S., Hlavin, M. L., Dunnett, S. B. and Fawcett, J. W., Bridge grafts of fibroblast growth factor-4-secreting schwannoma cells promote functional axonal regeneration in the nigrostriatal pathway of the adult rat, *Neuroscience*, 74 (1996) 775-784.
44. Brecknell, J. E., Haque, N. S. K., Du, J. S., Muir, E. M., Fidler, P. S., Hlavin, M. L., Fawcett, J. W. and Dunnett, S. B., Functional and anatomical reconstruction of the 6-hydroxydopamine lesioned nigrostriatal system of the adult rat, *Neuroscience*, 71 (1996) 913-925.
45. Bregman, B. S. and McAtee, M., Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord lesions and transplants in adult rats, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21 (1995) 1057.
46. Brodkey, J. A., Gates, M. A., Laywell, E. D. and Steindler, D. A., The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules, *Exp. Neurol.*, 123 (1993) 251-270.
47. Brundin, P., *Towards a transplantation therapy for parkinson's disease*, Medical cell Research, Lund, University of Lund, 1988.
48. Brundin, P. and Björklund, A., Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain. In: F. J. Seil, E. Herbert and B. M. Carlson (Eds.), *Neural Regeneration, Progr Brain Res 71*, Elsevier, Amsterdam, 1987, pp. 293-308.
49. Brundin, P., Isacson, O., Gage, F. H. and Björklund, A., Intra-striatal grafting of dopamine-containing neuronal cell suspensions: effects of mixing with target or non-target cells, *Develop Brain Res*, 24 (1986) 77-84.
50. Calvo, J. L., Carbonell, A. L. and Boya, J., Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats, *Brain Res.*, 566 (1991) 333-336.
51. Carman-Krzan, M. and Pahor, V., Interleukin-1 receptor identified on rat cortical astrocytes as possible mediators of IL-1 induced NGF secretion, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 20 (1994)
52. Carvey, P. M., Ptak, L. R., Nath, S. T., Sierens, D. K., Mufson, E. J., Goetz, C. G. and Klawans, H. L., Striatal extracts from patients with parkinson's disease promote dopamine neuron growth in mesencephalic cultures, *Exp. Neurol.*, 120 (1993) 149-152.
53. Cass, W. A., Gdnf selectively protects dopamine neurons over serotonin neurons against the neurotoxic effects of methamphetamine, *J. Neurosci.*, 16 (1996) 8132-8139.
54. Celada, P., Siuciak, J. A., Tran, T. M., Altar, C. A. and Tepper, J. M., Local infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor modifies the firing pattern of dorsal raphe serotonergic neurons, *Brain Res.*, 712 (1996) 293-298.
55. Cheng, H., Hoffer, B., Stromberg, I., Russell, D. and Olson, L., The effect of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in fibrin glue on developing dopamine neurons, *Exp. Brain Res.*, 104 (1995) 199-206.
56. Chkirate, M., Vallée, A. and Doucet, G., Host striatal projections into fetal ventral mesencephalic tissue grafted to the striatum of immature or adult rat, *Exp. Brain Res.*, 94 (1993) 357-362.
57. Choi-Lundberg, D. L., Lin, Q., Chang, Y. N., Chiang, Y. L., Hay, C. M., Mohajeri, H., Davidson, B. L. and Bohn, M. C., Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy, *Science*, 275 (1997) 838-841.
58. Clarke, D. J., Dunnett, S. B., Isacson, O., Sirinath-Singhji, D. J. S. and Björklund, A., Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions. I. Ultrastructural evidence of afferent synaptic inputs from the host nigrostriatal pathway, *Neuroscience*, 24 (1988) 791-801.
59. Cohen, J., Nurcombe, V., Jeffrey, P. and Edgar, D., Developmental loss of functional laminin receptors on retinal ganglion cells is regulated by their target tissue, the optic tectum, *Development*, 107 (1989) 381-87.

60. Cole, G. J. and McCabe, C. F., Identification of a developmentally regulated keratan sulphate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth, *Neuron*, 7 (1991) 1007-1018.
61. Condé, H., Organization and physiology of the substantia nigra, *Exp. Brain Res.*, 88 (1992) 233-248.
62. Costantini, L. C. and Snyder-Keller, A., Co-transplantation of fetal lateral ganglionic eminence and ventral mesencephalon can augment function and development of intrastriatal transplants, *Exp. Neurol.*, 145 (1997) 214-227.
63. Cotman, C. W., Nieto-Sampedro, M. and Harris, E. W., Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates., *Physiol Rev*, 61 (1981) 684-784.
64. Coyle, J. T. and Schwarcz, R., The use of excitatory amino acids as selective neurotoxins. In: A. Björklund and T. Hökfelt (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Methods in Chemical Neuroanatomy, Handbook of Chemical Neuroanatomy 1*, Elsevier, Amsterdam, 1983, pp. 508-527.
65. Curzon, G., Serotonin and appetite. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The Neuropharmacology of serotonin, 600*, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 521-531.
66. Dahl, D., Rueger, D. C. and Bignami, A., Vimentin, the 57000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component of immature glia, *Eur J Cell Biol*, 24 (1981) 191-196.
67. Dahlström, A. and Fuxe, K., Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons, *Acta Physiol. Scand.*, 62 (1964) 1-55.
68. Daszuta, A., Marocco, C. and Bosler, O., Serotonin reinnervation of the suprachiasmatic nucleus by intrahypothalamic fetal raphe transplants, with special reference to possible influences of the target, *Eur. J. Neurosci.*, 3 (1991) 1330-1337.
69. Daszuta, A., Strecker, R. E., Brundin, P. and Björklund, A., Serotonin neurons grafted to the adult rat hippocampus. I. Time course of growth as studied by immunohistochemistry and biochemistry, *Brain Res.*, 458 (1988) 1-19.
70. David, S. and Aguayo, A. J., Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats, *Science*, 214 (1981) 931-933.
71. David, S., Bouchard, C., Tsatas, O. and Giftochristos, N., Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system, *Neuron*, 5 (1990) 463-469.
72. Davies, S. J. A., Field, P. M. and Raisman, G., Long fibre growth by axons of embryonic mouse hippocampal neurons microtransplanted into the adult rat fimbria, *Eur. J. Neurosci.*, 5 (1993) 95-106.
73. Davies, S. J. A., Field, P. M. and Raisman, G., Long interfascicular axon growth from embryonic neurons transplanted into adult myelinated tracts, *J. Neurosci.*, 14 (1994) 1596-1612.
74. Davies, S. J. A., Fitch, M. T., Memberg, S. P., Hall, A. K., Raisman, G. and Silver, J., Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system, *Nature*, 390 (1997) 680-683.
75. Deacon, T. W., Pakzaban, P., Burns, L. H., Dinsmore, J. and Isacson, O., Cytoarchitectonic development, axon-glia relationship, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats, *Exp. Neurol.*, 130 (1994) 151-167.
76. Denis-Donini, S., Glowinski, J. and Prochiantz, A., Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurons, *Nature*, 307 (1984) 641-643.
77. Derek, L., Lundberg, C. and Bohn, M. C., Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat, *Develop Brain Res*, 85 (1995) 80-88.
78. Descarries, L., Lemay, B., Doucet, G. and Berger, B., Regional and laminar density of the dopamine innervation in adult rat cerebral cortex, *Neuroscience*, 21 (1987) 807-824.

79. Descarries, L., Soghomonian, J.-J., Garcia, S., Doucet, G. and Bruno, J. P., Ultrastructural analysis of the serotonin hyperinnervation in adult rat neostriatum following neonatal dopamine denervation with 6-hydroxydopamine, *Brain Res.*, 569 (1992) 1-13.
80. Descarries, L. and Umbriaco, D., Ultrastructural basis of monoamine and acetylcholine function in CNS, *Seminars Neurosc.*, 7 (1995) 309-318.
81. di Porzio, U., Daguette, M. C., Glowinski, J. and Prochiantz, A., Effect of striatal cells on in vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurones grown in serum-free conditions, *Nature*, 288 (1980) 370-373.
82. Di Prospero, N. A., Meiners, S., Krauthamer, G. M. and Geller, H. M., Inflammatory cytokines interact to modulate extracellular matrix production by astrocytes, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 22 (1996) 1228.
83. Dimova, R., Vuillet, J. and Seite, R., Study of the rat neostriatum using a combined golgi-electron microscope technique and serial sections, *Neurosc.*, 5 (1980) 1581-1596.
84. Doucet, G., Brundin, P., Descarries, L. and Björklund, A., Effect of prior dopamine denervation on survival and fiber outgrowth from intrastriatal fetal mesencephalic grafts, *Eur. J. Neurosci.*, 2 (1990) 279-290.
85. Doucet, G. and Descarries, L., Quantification of monoamine innervations by light microscopic autoradiography following tritiated monoamine uptake in brain slices, *Neurosci. Protocols*, 93-050-09-01-15 (1993) 1-15.
86. Doucet, G., Descarries, L., Audet, M. A., Garcia, S. and Berger, B., Radioautographic method for quantifying regional monoamine innervations in the rat brain: Application to the cerebral cortex, *Brain Res.*, 441 (1988) 233-259.
87. Doucet, G., Descarries, L. and Garcia, S., Quantification of the dopamine innervation in adult rat neostriatum, *Neuroscience*, 19 (1986) 427-445.
88. Doucet, G., Murata, Y., Brundin, P., Bosler, O., Mons, N., Geffard, M., Ouimet, C. C. and Björklund, A., Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon, *Exp. Neurol.*, 106 (1989) 1-19.
89. Dow, K. E., Guo, M., Kisilevsky, R. and Riopelle, R. J., Regenerative neurite growth modulation associated with astrocyte proteoglycan, *Brain Res. Bull.*, 30 (1993) 461-467.
90. Dunnett, S. B., Transplantation of embryonic dopamine neurons-What we know from rats, *J. Neurol.*, 238 (1991) 65-74.
91. Dunnett, S. B., Björklund, A., Schmidt, R. H., Stenevi, U. and Iversen, D., Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions in different forebrain sites, *Acta Physiol Scand [Suppl]*, 522 (1983) 29-37.
92. Dunnett, S. B., Hernandez, T. D., Summerfield, A., Jones, G. H. and Arbuthnott, G., Graft-derived recovery from 6-OHDA lesion: specificity of ventral mesencephalic graft tissues, *Exp. Brain Res.*, 71 (1988) 411-424.
93. Eaton, M. J. and Whittemore, S. R., Multiple neurotrophic factors control the maturation of serotonergic neurons, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21 (1995)
94. Ebadi, M., Bashir, R. M., Heidrick, M. L., Hamada, F. M., Elrefaey, H., Hamed, A., Helal, G., Baxi, M. D., Cerutis, D. R. and Lassi, N. K., Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair, *Neurochem Int*, 30 (1997) 347-374.
95. Eddleston, M. and Mucke, L., Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease, *Neuroscience*, 54 (1993) 15-36.
96. Ellison, J. A. and De Vellis, J., Amoeboid microglia expressing GD3 ganglioside are concentrated in regions of oligodendrogenesis during development of the rat corpus callosum, *Glia*, 14 (1995) 123-132.
97. Elmquist, J. K., Swanson, J. J., Sakaguchi, D. S., Ross, L. R. and Jacobson, C. D., Developmental distribution of GFAP and vimentin in the brazilian opossum brain, *J. Comp. Neurol.*, 344 (1994) 283-296.
98. Eng, L. F. and Ghirnikar, R. S., GFAP and astrogliosis, *Brain Pathol*, 4 (1994) 229-237.

99. Faissner, A. and Kruse, J., J1/Tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons, *Neuron*, 5 (1990) 627-637.
100. Faissner, A., Scholze, A. and Gotz, B., Tenascin glycoproteins in developing neural tissues: only decoration?, *Perspect Develop Neurobiol*, 2 (1994) 53-66.
101. Faissner, A. and Steindler, D., Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues [Review], *Glia*, 13 (1995) 233-254.
102. Fallon, J. H. and Loughlin, S. E., Substantia nigra. In: G. Paxinos (Eds.), *The rat nervous system*, Sydney, 1985, pp. 353-374.
103. Fallon, J. H. and Loughlin, S. E., Substantia nigra. In: G. Paxinos (Eds.), *The rat nervous system (second edition)*, Sydney, 1995, pp. 215-236.
104. Fallon, J. R., Neurite guidance by non-neuronal cells in culture: preferential outgrowth of peripheral neurites on glial as compared to nonglial cell surfaces, *J. Neurosci.*, 5 (1985) 3169-3177.
105. Fallon, J. R., Preferential outgrowth of central nervous system neurites on astrocytes and schwann cells as compared with nonglial cells in vitro, *J. Cell Biol.*, 100 (1985) 198-207.
106. Fawcett, J., Astrocytes and axon regeneration in the central nervous system, *J. Neurol.*, 241 (1994) S25-S28.
107. Fawcett, J. W., Housden, E., Smith-Thomas, L. and Meyer, R. L., The growth of axons in three dimensional astrocyte cultures, *Dev. Biol.*, 135 (1989) 449-458.
108. Fernaud-Espinosa, I., Nieto-Sampedro, M. and Bovolenta, P., Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue, *Glia*, 8 (1993) 277-91.
109. Filbin, M. T., Myelin-associated glycoprotein: a role in myelination and the inhibition of axonal regeneration?, *Current Opinion Neurobiol.*, 5 (1995) 588-595.
110. Finkbeiner, S. M., Glial calcium, *Glia*, 9 (1993) 83-104.
111. Finklestein, S. P., Apostolides, P. J., Caday, C. G., Prosser, J., Philips, M. F. and Klagsbrun, M., Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds, *Brain Res.*, 460 (1988) 253-259.
112. Fitzgerald, L. W., Kaplinsky, L. and Kimelberg, H. K., Serotonin metabolism by monoamine oxidase in rat primary astrocyte cultures., *J. Neurochem.*, 55 (1990) 2008-14.
113. Foster, G. A., Schultzberg, M., Gage, F. H., Björklund, A., Hökfelt, T., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J., Visser, T. J. and Emson, P. C., Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphé neurones after transplantation to the adult rat central nervous system.
- III. Grafts to the striatum, *Exp. Brain Res.*, 70 (1988) 242-255.
114. Foster, G. A., Schultzberg, M., Gage, F. H., Björklund, A., Hökfelt, T., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J., Visser, T. J. and Emson, P. C., Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphé neurones after transplantation to the adult rat central nervous system. II. Grafts to the hippocampus, *Exp. Brain Res.*, 70 (1988) 225-241.
115. Foster, G. A., Schultzberg, M., Gage, F. H., Björklund, A., Hökfelt, T., Normes, H., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J. and Visser, T. J., Transmitter expression and morphological development of embryonic medullary and mesencephalic raphé neurones after transplantation to the adult rat central nervous system. I. Grafts to the spinal cord, *Exp. Brain Res.*, 60 (1985) 427-444.
116. Frankfurt, M. and Azmitia, E., Regeneration of serotonergic fibres in the rat hypothalamus following unilateral 5,7-dihydroxytryptamine injection, *Brain Res.*, 298 (1984) 273-282.
117. Franklin, R. J., Crang, A. J. and Blakemore, W. F., Transplanted type-1 astrocytes facilitate repair of demyelinating lesions by host oligodendrocytes in adult rat spinal cord, *J. Neurocytol.*, 20 (1991) 420-30.
118. Freund, T. F., Powell, J. F. and Smith, A. D., Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines, *Neuroscience*, 13 (1984) 1189-1215.

119. Friedman, W. J., Thakur, S., Seidman, L. and Rabson, A. B., Regulation of nerve growth factor mRNA by interleukin-1 in rat hippocampal astrocytes is mediated by NFkappaB, *J Biol Chem*, 271 (1996) 31115-20.
120. Gage, F. H., Kawaja, M. D. and Fisher, L. J., Genetically modified cells: applications for intracerebral grafting, *Trends Neurosci.*, 14 (1991) 328-333.
121. Gage, F. H., Stenevi, U., Carlstedt, T., Foster, G., Björklund, A. and Aguayo, A. J., Anatomical and functional consequences of grafting mesencephalic neurons into a peripheral nerve "bridge" connected to the denervated striatum, *Exp. Brain Res.*, 60 (1985) 584-589.
122. Gates, M. A., Laywell, E. D., Fillmore, H. and Steindler, D. A., Astrocytes and extracellular matrix following intracerebral transplantation of embryonic ventral mesencephalon or lateral ganglionic eminence, *Neuroscience*, 74 (1996) 579-597.
123. Geffard, M., Tuffet, S., Peuble, L. and Patel, S., Production of antisera to serotonin and their metabolites and their use in immunocytochemistry. In: N. N. Osborne and M. Hamon (Eds.), *Neuronal Serotonin*, Wiley, London, 1988, pp. 1-23.
124. Gehrman, J., Matsumoto, Y. and Kreutzberg, G. W., Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain [Review], *Brain Res. Rev.*, 20 (1995) 269-287.
125. Geisert Jr, E. E. and Stewart, A. M., Changing interactions between astrocytes and neurons during CNS maturation, *Dev. Biol.*, 143 (1991) 335-345.
126. Gerfen, C. R., The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output system, *Nature*, 311 (1984) 461-464.
127. Gerfen, C. R., The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization, *Trends Neurosci.*, 15 (1992) 133-138.
128. Giménez y Ribotta, M., Rajaofetra, N., Morin-Richaud, C., Alonso, G., Bochelen, D., Sandillon, F., Legrand, A., Mersel, M. and Privat, A., Oxysterol (7 beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction, *J. Neurosci. Res.*, 41 (1995) 79-95.
129. Giulian, D. and Baker, T. J., Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain, *J. Neurosci.*, 6 (1986) 2163-2178.
130. Goldman, J. E., Hirano, M., Yu, R. K. and Seyfried, T. N., GD3 ganglioside is a glycolipid characteristic of immature neuroectodermal cells, *J. Neuroimmunol.*, 7 (1984) 179-192.
131. Gorio, A., Di Giulio, A. M., Germani, E., Bendotti, C., Bertelli, A. and Mantegazza, P., Perinatal morphine treatment inhibits pruning effect and regeneration of serotonergic pathways following neonatal 5,7-HT lesions, *J. Neurosci. Res.*, 34 (1993) 462-71.
132. Gorzalka, B. B., Mendelson, S. D. and Watson, N. V., Serotonin receptor subtypes and sexual behavior. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The Neuropharmacology of serotonin*, 600, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 435-446.
133. Graeber, M. B., Streit, W. J. and Kreutzberg, G. W., Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells, *J. Neurosci. Res.*, 21 (1988) 18-24.
134. Graeber, M. B., Streit, W. J. and Kreutzberg, G. W., The microglial cytoskeleton: Vimentin is localized within activated cells in situ, *J. Neurocytol.*, 17 (1988) 573-580.
135. Graybiel, A. M., The basal ganglia and the initiation of movement, *Rev Neurol*, 146 (1990) 570-574.
136. Graybiel, A. M., Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia, *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 244-254.
137. Graybiel, A. M., Liu, F. C. and Dunnett, S. B., Intra-striatal grafts derived from fetal striatal primordia. I. Phenotypy and modular organization, *J. Neurosci.*, 9 (1989) 3250-3271.
138. Grierson, J. P., Petroski, R. E., Ling, D. S. F. and Geller, H. M., Astrocyte topography and tenascin/cytotactin expression: correlation with the ability to support neuritic outgrowth, *Dev. Brain Res.*, 55 (1990) 11-19.

139. Guenard, V., Aebischer, P. and Bunge, R. P., The astrocyte inhibition of peripheral nerve regeneration is reversed by schwann cells, *Exp. Neurol.*, 126 (1994) 44-60.
140. Hagg, T. and Varon, S., Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia-nigra dopaminergic neurons in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 6315-6319.
141. Halliday, G. M., Li, Y. W., Blumbergs, P. C., Joh, T. H., Cotton, R. G., Howe, P. R., Blessing, W. W. and Geffen, L. B., Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease, *Ann. Neurol.*, 27 (1990) 373-85.
142. Hammond, C. and Tritesch, D., Les cellules gliales. In: Doin (Eds.), *Neurobiologie cellulaire*, Paris, 1990, pp. 61-81.
143. Hansson, E., Regional heterogeneity among astrocytes in the central nervous system, *Neurochem Int*, 16 (1990) 237-245.
144. Hantraye, P., Riche, D., Mazière, M. and Isacson, O., Intrastratial grafting of fetal striatal cross-species cells ameliorates abnormal movements in a primate model of Huntington's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 4187-91.
145. Hatten, M. E., Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain, *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 179-184.
146. Hatten, M. E., Liem, R. K. H., Shelanski, M. L. and Mason, C. A., Astroglia in CNS injury, *Glia*, 4 (1991) 233-243.
147. Hatton, G. I., Pituicytes, glia and control of terminal secretion, *J Exp Biol*, 139 (1988) 67-79.
148. Hatton, J. D., Garcia, R. and U, H. S., Migration of grafted rat astrocytes: dependence on source/target organ, *Glia*, 5 (1992) 251-258.
149. Hatton, J. D., Nguyen, M. H. and HSU, Differential migration of astrocytes grafted into the developing rat brain, *Glia*, 9 (1993) 113-119.
150. Hefti, F., Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases, *J Neurobiol*, 25 (1994) 1418-1435.
151. Heimer, L., Zahm, D. S. and Alheid, G. F., Basal ganglia. In: G. Paxinos (Eds.), *The rat nervous system (second edition)*, Sydney, 1995, pp. 579-628.
152. Hemmendinger, I. M., Garber, B. B., Hoffman, P. C. and Heller, A., Target neuron-specific process formation by embryonic mesencephalic dopamine neurons in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (1981) 1264-1268.
153. Herkenham, M. and Pert, C., Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum, *Nature*, 291 (1981) 415-418.
154. Herman, J. P. and Arous, N. D., Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives, *Prog. Neurobiol.*, 44 (1994) 1-35.
155. Hersch, S. M., Gutekunst, C. A., Rees, H. D., Heilman, C. J. and Levey, A. I., Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies., *J. Neurosci.*, 14 (1994) 3351-63.
156. Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y. A., Juhasz, M., Yancopoulos, G. D., Squinto, S. P. and Lindsay, R. M., BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra, *Nature*, 350 (1991) 230-2.
157. Hyman, C., Juhasz, M., Jackson, C., Wright, P., Ip, N. Y. and Lindsay, R. M., Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon, *J. Neurosci.*, 14 (1994) 335-47.
158. Imai, H., Steindler, D. A. and Kitai, S. T., The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 243 (1986) 363-380.
159. Insel, T. R., Zohar, J., Benkelfat, C. and Murphy, D. L., Serotonin in obsessions, compulsions, and the control of aggressive impulses. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The Neuropharmacology of serotonin*, 600, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 574-586.

160. Ip, N. Y., McClain, J., Barrezueta, N. X., Aldrich, T. H., Pan, L., Li, Y., Wiegand, S. J., Friedman, B., Davis, S. and Yancopoulos, G. D., The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development, *Neuron*, 10 (1993) 89-102.
161. Ip, N. Y., Wiegand, S. J., Morse, J. and Rudge, J. S., Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain, *Eur. J. Neurosci.*, 5 (1993) 25-33.
162. Isacson, O., Brundin, P., Kelly, P. A. T., Gage, F. H. and Björklund, A., Functional replacement by grafted striatal neurons in the ibotenic acid lesioned rat striatum, *Nature*, 311 (1984) 458-460.
163. Isacson, O., Dunnett, S. B. and Björklund, A., Graft-induced behavioural recovery in an animal model of Huntington's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 2728-32.
164. Isom, L. L., De Jongh, K. S. and Caterall, W. A., Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels, *Neuron*, 12 (1994) 1183-1194.
165. Jacobs, B. L. and Azmitia, E. C., Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol Rev*, 72 (1992) 165-229.
166. Jacobs, B. L. and Fornal, C. A., 5-HT and motor control- a hypothesis, *Trends Neurosci.*, 16 (1993) 346-352.
167. Jacomy, H. and Bosler, O., Intrinsic organization and monoaminergic innervation of the suprachiasmatic nucleus transplanted to adult rats. A light- and electron-microscopic study, *J. Neurocytol.*, 25 (1996) 659-673.
168. Janeczko, K., 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 (1993) 139-147.
169. Kalderon, N., Differentiating astroglia in nervous tissue histogenesis/regeneration: studies in a model system of regenerating peripheral nerve, *J. Neurosci. Res.*, 21 (1988) 501-512.
170. Kearns, C. M. and Gash, D. M., Gdnf protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo, *Brain Res.*, 672 (1995) 104-111.
171. Kesslak, J. P., Nieto-Sampedro, M., Globus, J. and Cotman, C. W., Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation, *Exp. Neurol.*, 92 (1986) 377-390.
172. Kesslak, J. P., Walencewicz, A., Calin, L., Nieto-Sampedro, M. and Cotman, C. W., Hippocampal but not astrocyte transplants enhance recovery on a forced choice alternation task after kainate lesions, *Brain Res.*, 454 (1988) 347-354.
173. Kiernan, J. A., Hypotheses concerned with axonal regeneration in the mammalian nervous system, *Biol Rev*, 54 (1979) 155-197.
174. Komori, K., Sakai, M., Karasawa, N., Yamada, K. and Nagatsu, I., Evidence for transient expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the mouse striatum and the effect of colchicine, *Acta Histochem Cytochem*, 24 (1991) 223-231.
175. Kopyov, O. V., Jacques, D., Lieberman, A., Duma, C. M. and Rogers, R. L., Outcome following intrastriatal fetal mesencephalic grafts for parkinsons patients is directly related to the volume of grafted tissue, *Exp. Neurol.*, 146 (1997) 536-545.
176. Kreutzberg, G. W., Microglia: a sensor for pathological events in the CNS, *Trends Neurosci.*, 19 (1996) 312-318.
177. Krobot, K., Lopez-Colberg, I. and Cunningham, L. A., Astrocytes promote or impair the survival and function of embryonic ventral mesencephalon co-grafts: effects of astrocyte age and expression of recombinant brain-derived neurotrophic factor., *Exp. Neurol.*, 145 (1997) 511-523.
178. Kushima, Y., Hama, T. and Hatanaka, H., Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured catecholaminergic neurons in a chemically defined medium from fetal and postnatal rat midbrains, *Neurosci. Res.*, 13 (1992) 267-280.
179. Labandeira-Garcia, J. L., Wictorin, K., Cunningham, E. T. and Björklund, A., Development of intrastriatal striatal grafts and their afferent innervation from the host, *Neuroscience*, 42 (1991) 407-426.

180. Langeveld, C. H., Jongenelen, C. A. M., Schepens, E., Stoof, J. C., Bast, A. and Drukarch, B., Cultured rat striatal and cortical astrocytes protect mesencephalic dopaminergic neurons against hydrogen peroxide toxicity independent of their effect on neuronal development, *Neurosci Lett*, 192 (1995) 13-16.
181. Lavoie, B. and Parent, A., Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey, *J. Comp. Neurol.*, 299 (1990) 1-16.
182. Levinson, S. W. and Goldman, J. E., Astrocyte origins. In: S. Murphy (Eds.), *Astrocytes, pharmacology and function*, Academic Press, Inc, San Diego, 1993, pp. 1-16.
183. Levitt, P. and Rakic, P., Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing Rhesus monkey brain, *J. Comp. Neurol.*, 193 (1980) 815-840.
184. Liang, P. and Pardee, A. B., Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science*, 257 (1992) 967-970.
185. Liberatore, G. T., Wong, J. Y. F., Porritt, M. J., Donnan, G. A. and Howells, D. W., Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (gdnf) mrna following mechanical injury to mouse striatum, *Neuroreport*, 8 (1997) 3097-3101.
186. Lidov, H. G. W. and Molliver, M. E., An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields, *Brain Res. Bull.*, 8 (1982) 389-430.
187. Liesi, P., Dahl, D. and Vaheri, A., Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture, *J. Cell Biol.*, 96 (1983) 920-924.
188. Liesi, P., Kaakkola, S., Dahl, D. and Vaheri, A., Laminin is induced in astrocytes of adult brain by injury, *EMBO Journal*, 3 (1984) 683-686.
189. Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. and Collins, F., GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [see comments], *Science*, 260 (1993) 1130-2.
190. Lindvall, O., Neural grafting in Parkinson's disease, *Neuroscience facts*, 3 (1992) 86-87.
191. Lindvall, O., Widner, H., Rehncrona, S., Brundin, P., Odin, P., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Björklund, A. and Marsden, D., Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants, *Ann. Neurol.*, 31 (1992) 155-165.
192. Liu, J. and Lauder, J. M., Serotonine promotes region-specific glial influences on cultured serotonine and dopamine neurons, *Glia*, 5 (1992) 306-317.
193. Liuzzi, F. L. and Lasek, R. J., Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway, *Science*, 237 (1987) 642-645.
194. Logan, A., Frautschy, S., Gonzalez, A. M., Sporn, M. B. and Baird, A., Enhanced expression of transforming growth factor β 1 in the rat brain after a localised cerebral injury, *Brain Res.*, 587 (1992) 216-225.
195. Lu, S. Y., Pixley, S. K., Emerich, D. F., Lehman, M. N. and Norman, A. B., Effect of fetal striatal and astrocyte transplants into unilateral excitotoxin-lesioned striatum, *J Neural Transplant Plast*, 4 (1993) 279-287.
196. Lu, S. Y., Shipley, M. T., Norman, A. B. and Sanberg, P. R., Striatal, ventral mesencephalic and cortical transplant into the intact rat striatum-A neuroanatomical study, *Exp. Neurol.*, 113 (1991) 109-130.
197. Luine, V. N., Renner, K. J., Frankfurt, M. and Azmitia, E. C., Facilitated sexual behavior reversed and serotonin restored by raphe nuclei transplanted into denervated hypothalamus, *Science*, 226 (1984) 1436-1439.
198. Lund, R. D., Cunningham, T. J. and Lund, J. S., Modified optic projections after unilateral eye removal in young rats, *Brain Behav Evol*, 8 (1973) 51-72.
199. Lyons, W. E., Kaplan, D. R. and Mamounas, L. A., BDNF infusion stimulates activity of TrkB receptors and the sprouting of serotonin axons in the rat brain with a similar dose response, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 22 (1996) 996.

200. Mahalik, T. J., Finger, T. E., Stromberg, I. and Olson, L., Substantia nigra transplants into denervated striatum of the rat: ultrastructure of graft and host interconnections, *J. Comp. Neurol.*, 240 (1985) 60-70.
201. Malhotra, S. K., Shnitka, T. K. and Elbrink, J., Reactive astrocytes- a review, *Cytobios*, 61 (1990) 133-160.
202. Mamounas, L. A., Blue, M. E., Axt, K. J. and Altar, C. A., BDNF promotes the sprouting of neurotoxin-lesioned serotonergic axons in rat brain, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21 (1995)
203. Mamounas, L. A., Blue, M. E., Siuciak, J. A. and Altar, C. A., Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain, *J. Neurosci.*, 15 (1995) 7929-7939.
204. Mamounas, L. A., Lyons, W. E., Blue, M. E. and Altar, C. A., BDNF stimulated sprouting of serotonergic axons is impaired in the aged rat brain, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 22 (1996) 997.
205. Martin, D., Miller, G., Fischer, N., Dix, D., Cullen, T. and Russell, D., Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor - the lateral cerebral ventricle as a site of administration for stimulation of the substantia nigra dopamine system in rats, *Eur. J. Neurosci.*, 8 (1996) 1249-1255.
206. Martini, R., Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves, *J. Neurocytol.*, 23 (1994) 1-28.
207. Maxwell, D. J. and Foster, G. A., Immunoelectron microscopic analysis of the synaptic connectivity of serotonergic neurons grafted to the 5,7-dihydroxytryptamine-lesioned rat spinal cord, *Neuroscience*, 45 (1991) 307-321.
208. Mayer, E., Fawcett, J. W. and Dunnett, S. B., Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons--II. Effects on nigral transplants in vivo, *Neuroscience*, 56 (1993) 389-98.
209. McCarthy, K. and DeVellis, J., Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue., *J. Cell Biol.*, 85 (1980) 890-902.
210. McKeon, R. J., Hoke, A. and Silver, J., Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars, *Exp. Neurol.*, 136 (1995) 32-43.
211. McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S. and Silver, J., 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 (1991) 3398-3411.
212. McKerracher, L. J., Davids, S., Jackson, D., Kottis, V., Dunn, R. J. and Braun, P. E., Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth, *Neuron*, 13 (1994) 805-811.
213. Meltzer, H. Y., Role of serotonin in depression. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The neuropharmacology of serotonin*, 600, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 486-500.
214. Mendez, I., Elisevich, K. and Flumerfelt, B., Dopaminergic innervation of substance P-containing striatal neurons by fetal nigral grafts: an ultrastructural double-labeling immunocytochemical study, *J. Comp. Neurol.*, 308 (1991) 66-78.
215. Mendez, I., Sadi, D. and Hong, M., Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants, *J. Neurosci.*, 16 (1996) 7216-7227.
216. Merlio, J. P., Ernfors, P., Jaber, M. and Persson, H., Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system, *Neuroscience*, 51 (1992) 513-532.
217. Misson, J. P., Michael, A. E., Miyuki, Y. and Verne Jr, S. C., Identification of radial glial within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker, *Dev. Brain Res.*, 44 (1988) 95-108.

218. Moukhles, H., Bosler, O., Bolam, J. P., Vallée, A., Umbriaco, D., Geffard, M. and Doucet, G., Serotonin innervation in the rat substantia nigra: quantitative data at the light and electron microscopic levels, *Neuroscience*, 76 (1997) 1159-1171.
219. Moukhles, H., Geffard, M. and Doucet, G., Ultrastructure of graft- or host- derived 5-HT innervations in ventral mesencephalic grafts implanted into the adult or newborn rat striatum, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 22 (1996) 47.
220. Moukhles, H., Smith, Y., Pierret, P. and Doucet, G., Host projections into intrastriatal ventral mesencephalic transplants: Demonstration of afferents from the globus pallidus but not from the thalamus, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 20 (1994) 471.
221. Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R. and Filbin, M. T., A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration, *Neuron*, 13 (1994) 757-767.
222. Müller, C. M. and Best, J., Ocular dominance plasticity in adult cat cortex after transplantation of cultured astrocytes, *Nature*, 342 (1989) 427-430.
223. Neugebauer, K. M., Tomaselli, K. J., Lilien, J. and Reichard, L. F., N-cadherin, N-CAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro, *J. Cell Biol.*, 107 (1988) 1177-1187.
224. Newman, E. A., Regional specialization of retinal glial membrane, *Nature*, 309 (1984) 155-157.
225. Nieto-Sampedro, M., Manthorpe, M., Barbin, G., Varon, S. and Cotman, C. W., Injury-induced neurotrophic activity in adult rat brain: correlation with survival of delayed implants in the wound cavity, *J. Neurosci.*, 3 (1983) 2219-2229.
226. Nikkhah, G., Cunningham, M. G., Cenci, M. A., McKay, R. D. and Bjorklund, A., Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions .1. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway, *J of Neurosci*, 15 (1995) 3548-3561.
227. Nikkhah, G., Olsson, M., Eberhard, J., Bentlage, C., Cunningham, M. G. and Bjorklund, A., A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat parkinson model: a detailed account of the methodology, *Neuroscience*, 63 (1994) 57-72.
228. Noble, M., Albrechtsen, M., Moller, C., Lyles, J., Bock, E., Goridis, C., Watanabe, M. and Rutishauser, U., Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro, *Nature*, 316 (1985) 725-728.
229. Noble, M., Fok-Seang, J. and Cohen, J., Glia are a unique substrate for the in vitro growth of central nervous system neurons, *J. Neurosci.*, 4 (1984) 1892-1903.
230. Norton, W. T., Aquino, D. A., Hozumi, I., Chiu, F. C. and Brosnan, C. F., Quantitative aspects of reactive gliosis: a review, *Neurochem Res*, 17 (1992) 877-885.
231. Nothias, F., Onteniente, B., Geffard, M. and Peschanski, M., Dissimilar responses of adult thalamic monoaminergic and somatosensory afferent fibers to implantation of thalamic fetal cells, *Neuroscience*, 37 (1990) 353-66.
232. Nothias, F. and Peschanski, M., Homotypic fetal transplants into an experimental model of spinal cord neurodegeneration, *J. Comp. Neurol.*, 301 (1990) 520-34.
233. O'Hearn, E., Battaglia, G., De Souza, E. B., Kuhar, M. J. and Molliver, M. E., Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: Immunocytochemical evidence for neurotoxicity, *J Neurosc*, 8 (1988) 2788-2803.
234. Oderfeld-Nowak, B., Bacia, A., Gradkowska, M., Fusco, M., Vantini, G., Leon, A. and Aløe, L., In vivo activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules, *Neurochem Int*, 21 (1992) 455-461.
235. Olanow, C. W., Kordower, J. H. and Freeman, T. B., Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease, *Trends Neurosci.*, 19 (1996) 102-109.
236. Otero, G. C. and Merrill, J. E., Cytokine receptors on glial cells, *Glia*, 11 (1994) 117-128.
237. Ouimet, C. C., Miller, P. E., Hemmings, H. C. J., Wallaas, S. I. and Greengard, P., DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'- monophosphate-regulated phosphoprotein

enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization, *J. Neurosci.*, 4 (1984) 111-124.

238. Papasozomenos, S. C., Glial fibrillary acidic (GFA) protein-containing cells in the human pineal gland, *J Neuropathol & Exp Neurol*, 42 (1983) 391-408.

239. Parent, A., Descarries, L. and Beaudet, A., Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]5-hydroxytryptamine., *Neuroscience*, 6 (1981) 115-138.

240. Peroutka, S. J., Molecular biology of serotonin (5-HT) receptors [Review], *Synapse*, 18 (1994) 241-260.

241. Poulsen, K. T., Armanini, M. P., Klein, R. D., Hynes, M. A., Phillips, H. S. and Rosenthal, A., TGF β -2 and TGF β -3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons, *Neuron*, 13 (1994) 1245-1252.

242. Price, J. and Hynes, R. O., Astrocytes en culture synthesize and secrete a variant form of fibronectin, *J. Neurosci.*, 5 (1985) 2205-2211.

243. Privat, A., Gimenez-Ribotta, M. and Ridet, J. L., Morphology of astrocytes. In: H. Kettenmann and B. R. Ransom (Eds.), *Neuroglia*, Oxford University Press, New York, 1995, pp. 3-23.

244. Privat, A., Mansour, H., Rajaofetra, N. and Geffard, M., Intraspinal transplants of serotonergic neurons in the adult rat, *Brain Res. Bull.*, 22 (1989) 123-129.

245. Prochiantz, A., di Porzio, U., Kato, A., Berger, B. and Glowinski, J., In vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons from mouse embryos is enhanced in presence of their striatal target cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979) 5387-5391.

246. Prochiantz, A. and Mallat, M., Astrocyte diversity. In: R. C. S. (Eds.), *Advances in neuroimmunology*, 540, Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 1988, pp. 52-63.

247. Pundt, L. L., Kondoh, T., Conrad, J. A. and Low, W. C., Transplantation of human fetal striatum into a rodent model of Huntingtons disease ameliorates locomotor deficits, *Neurosci. Res.*, 24 (1996) 415-420.

248. Pundt, L. L., Kondoh, T., Conrad, J. A. and Low, W. C., Transplantation of human striatal tissue into a rodent model of huntingtons disease - phenotypic expression of transplanted neurons and host-to-graft innervation, *Brain Res. Bull.*, 39 (1996) 23-32.

249. Purves, D., *Body and Brain. A trophic theory of neural conections*, Harvard University Press, Cambridge, MA, 1988,

250. Rabchevsky, A. G. and Streit, W. J., Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth, *J. Neurosci. Res.*, 47 (1997) 34-48.

251. Raff, M. C., Abnet, E. R., Cohen, J., Lindsay, R. and Noble, M., Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics, *J. Neurosci.*, 3 (1983) 1289-1300.

252. Rajaofetra, N., König, N., Poulat, P., Marlier, L., Sandillon, F., Drian, M. J., Geffard, M. and Privat, A., Fate of B1-B2 and B3 rhombencephalic cells transplanted into the transected spinal cord of adult rats: Light and electron microscopic studies, *Exp. Neurol.*, 117 (1992) 59-70.

253. Rakic, P., Neuron-glia interaction during brain development, *Trends Neurosci.*, 4 (1981) 184-187.

254. Ranscht, B., Clapshaw, P. A., Price, J., Noble, M. and Seifert, W., Development of oligodendrocytes and Schwann cells studies with a monoclonal antibody against galactocerebroside, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 (1982) 2709-2713.

255. Richardson, B. P., Serotonin and nociception. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The Neuropharmacology of serotonin*, 600, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 511-520.

256. Roessmann, U., Velasco, M. E., Sindely, S. D. and Gambetti, P., Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study, *Brain Res.*, 200 (1980) 13-21.

257. Rosenblad, C., Martinez-Serrano, A. and Björklund, A., Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts, *Neuroscience*, 75 (1996) 979-985.

258. Rosenblad, C., Martinez-Serrano, A. and Björklund, A., Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of parkinsons-disease, *Neuroscience*, 82 (1998) 129-137.

259. Rostain-Grigattieri, S., Floresguevara, R., Peschanski, M. and Cadusseau, J., Glial and endothelial cell response to a fetal transplant of purified neurons, *Neuroscience*, 79 (1997) 723-734.

260. Rudge, J. S., Astrocytes-derived neurotrophic factors. In: S. Murphy (Eds.), *Astrocytes: pharmacology and function*, Academic Press, San Diego, 1993, pp. 267-305.

261. Rudge, J. S., Alderson, R. F., Pasnikowski, E., McClain, J., Ip, N. Y. and Lindsay, R. M., Expression of ciliary neurotrophic factor and the neurotrophins-nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophine 3-in cultured rat hippocampal astrocytes, *Eur. J. Neurosci.*, 4 (1992) 459-471.

262. Rudge, J. S., Li, Y. P., Pasnikowski, E. M., Mattsson, K., Pan, L., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., Lindsay, R. M. and Ip, N. Y., Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes, *Eur. J. Neurosci.*, 6 (1994) 693-705.

263. Saidi, H. and Bosler, O., Serotonin reinnervation of the rat organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) after 5,7-dihydroxytryptamine deafferentation, *Brain Res.*, 530 (1990) 151-155.

264. Sanberg, P. R., Zubrycki, E., Ragozzino, M. E., Giordano, M. and Shipley, M. T., Tyrosine hydroxylase-positive fibers and neurons in transplanted striatal tissue in rats with quinolinic acid lesions of the striatum, *Brain Res. Bull.*, 25 (1990) 889-894.

265. Sauer, H., Fischer, W., Nikkhah, G., Wiegand, S. J., Brundin, P., Lindsay, R. M. and Björklund, A., Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts, *Brain Res.*, 626 (1993) 37-44.

266. Sawada, M., Itoh, Y., Suzumura, A. and Marunouchi, T., Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells, *Neurosci. Lett.*, 160 (1993) 131-134.

267. Schaar, D. G., Sieber, B. A., Dreyfus, C. F. and Black, I. B., Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain, *Exp. Neurol.*, 124 (1993) 368-71.

268. Schiffer, D., Giordana, M. T., Migheli, A., Giaccone, G., Pezzota, S. and Mauro, A., Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain, *Brain Res.*, 374 (1986) 110-118.

269. Schmechel, D. E. and Rakic, P., A golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes, *Anat Embryol (Berl)*, 156 (1979) 115-152.

270. Schmidt-Kastner, R., Wetmore, C. and Olson, L., Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex, *Neuroscience*, 74 (1996) 161-183.

271. Schöbitz, B., De Kloet, E. R. and Holsboer, F., Gene expression and function of interleukin 1, interleukine 6 and tumor necrosis factor in the brain, *Progress in Neurobiol.*, 44 (1994) 397-432.

272. Schwab, M., Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS, *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 452-456.

273. Schwab, M. E., Myelin-associated inhibitors of neurite growth, *Exp. Neurol.*, 109 (1990) 2-5.

274. Schwab, M. E., Molecules inhibiting neurite growth: a minireview, *Neurochem Res*, 21 (1996) 755-761.

275. Schwartz, J. P. and Nishiyama, N., Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury, *Brain Res. Bull.*, 35 (1994) 403-7.

276. Seroogy, K. B. and Gall, C. M., Expression of neurotrophins by midbrain dopaminergic neurons, *Exp. Neurol.*, 124 (1993) 119-128.

277. Shahar, A., de Vellis, J., Vernadakis, A. and Haber, B. (Eds.), *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*, Alan R. Liss, New York, 1989, 371 pp.
278. Shea, T. B., Beermann, M. L. and Nixon, R. A., Sequential effects of astroglial-derived factors on neurite outgrowth - Initiation by protease inhibitors and potentiation by extracellular matrix components, *J. Neurosci. Res.*, 31 (1992) 309-317.
279. Small, R. K., Watkins, B. A., Munro, P. M. and Liu, D., Functional properties of retinal Muller cells following transplantation to the anterior eye chamber, *Glia*, 7 (1993) 158-69.
280. Smith, G. M., Jacobberger, J. W. and Miller, R. H., Modulation of adhesion molecule expression on rat cortical astrocytes during maturation, *J. Neurochem.*, 60 (1993) 1453-1466.
281. Smith, G. M. and Miller, R. H., Immature type-1 astrocytes suppress glial scar formation, are motile and interact with blood vessels, *Brain Res.*, 543 (1991) 111-122.
282. Smith, G. M., Miller, R. H. and Silver, J., Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation, *J. Comp. Neurol.*, 251 (1986) 23-43.
283. Smith, G. M., Rutishauser, U., Silver, J. and Miller, R. H., Maturation of astrocytes in vitro alters the extent and molecular basis of neurite outgrowth, *Dev. Biol.*, 138 (1990) 377-390.
284. Smits, A., Odin, P., Duang, W. M., Brundin, P., Widner, H., Heldin, C. H., Lindvall, O. and Funa, K., Expression of platelet-derived growth factor in and around intrastriatal embryonic mesencephalic grafts, *Cell Transplant*, 2 (1993) 151-162.
285. Sobreviela, T., Clary, D. O., Reichardt, L. F., Brandabur, M. M., Kordower, J. H. and Mufson, E. J., TRK A-immunoreactive profiles in the central nervous system - colocalization with neurons containing p75 nerve growth factor receptor, choline acetyltransferase, and serotonin [Review], *J. Comp. Neurol.*, 350 (1994) 587-611.
286. Soghomonian, J.-J., Descarries, L. and Watkins, K. C., Serotonin innervation in adult rat neostriatum. II. Ultrastructural features: A radioautographic and immunocytochemical study, *Brain Res.*, 481 (1989) 67-86.
287. Sotelo, C., Transplantation de neurones embryonnaires dans le cervelet de souris, *Médecine / Sciences*, 4 (1988) 507-514.
288. Sotelo, C. and Alvarado-Mallart, R., Reconstruction of defective cerebellar circuitry in adult pcd mutant mice by Purkinje cell replacement through transplantation of solid embryonic implants, *Neuroscience*, 20 (1987) 1-22.
289. Soucy, J.-P., Lafaille, F., Lemoine, P., Mrini, A. and Descarries, L., Validation of the transporter ligand cyanoimipramine as a marker of serotonin innervation density in brain, *The Journal of Nuclear Medicine*, 35 (1994) 1822-1830.
290. Springer, J. E., Mu, X., Bergmann, L. W. and Trojanowski, J. Q., Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue, *Exp. Neurol.*, 127 (1994) 167-70.
291. Stachowiak, M. K., Bruno, J. P., Snyder, A. M., Stricker, E. M. and Zigmond, M. J., Apparent sprouting of striatal serotonergic terminals after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats, *Brain Res.*, 291 (1984) 164-167.
292. Steinbusch, H. W. M., Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In: A. Björklund, T. Hökfelt and M. J. Kuhar (Eds.), *Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, part II, Handbook of chemical neuroanatomy 3*, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 68-125.
293. Stichel, C. C. and Muller, H. W., Extensive and long-lasting changes of glial cells following transection of the postcommissural fornix in the adult rat., *Glia*, 10 (1994) 89-100.
294. Streit, W. J., Microglial-neuronal interactions, *J. Chem. Neuroanat.*, 6 (1993) 261-266.
295. Streit, W. J., Graeber, M. B. and Kreutzberg, G. W., Functional plasticity of microglia: A review, *Glia*, 1 (1988) 301-307.
296. Strömberg, I., Almqvist, P., Bygdeman, M., Finger, T. E., Gerhardt, G., Granholm, A.-C., Mahalik, T. J., Seiger, Å., Olson, L. and Hoffer, B., Human fetal

mesencephalic tissue grafted to dopamine-denervated striatum of athymic rats: Light- and electron-microscopical histochemistry and in vivo chronoamperometric studies, *J. Neurosci.*, 9 (1989) 614-624.

297. Strömberg, I., Bjorklund, L., Johansson, M., Tomac, A., Collins, F., Olson, L., Hoffer, B. and Humpel, C., Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo, *Exp. Neurol.*, 124 (1993) 401-12.

298. Studer, L., Spenger, C., Seiler, R. W., Othberg, A., Lindvall, O. and Odin, P., Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor on neuronal structure of dopaminergic neurons in dissociated cultures of human fetal mesencephalon, *Exp. Brain Res.*, 108 (1996) 328-336.

299. Takeuchi, Y., Sawada, T., Blunt, S., Jenner, P. and Marsden, C. D., Transplantation of embryonic mesencephalic and medullary raphe neurons to the neostriatum of rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions, *Brain Res.*, 592 (1992) 129-134.

300. Taylor, D. P., Serotonin agents in anxiety. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The Neuropharmacology of serotonin*, 600, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 545-557.

301. Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L., Ogren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J. and Olson, L., Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by gdnf in vivo, *Nature*, 373 (1995) 335-339.

302. Tomozawa, Y. and Appel, S. H., Soluble striatal extracts enhance development of mesencephalic dopaminergic neurons in vitro, *Brain Res.*, 399 (1986) 111-124.

303. Törk, I., Anatomy of the serotonergic system. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The Neuropharmacology of serotonin*, 600, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 9-35.

304. Tornatore, C., Baker-Cairns, B., Yadid, G., Hamilton, R., Meyers, K., Atwood, W., Cummins, A., Tanner, V. and Major, E., Expression of tyrosine hydroxylase in an immortalized human fetal astrocyte cell line; in vitro characterization and engraftment into the rodent striatum., *Cell Transplant.*, 5 (1996) 145-163.

305. Triarhou, L. C., Brundin, P., Doucet, G., Norton, J., Björklund, A. and Ghetti, B., Intrastratial implants of mesencephalic cell suspensions in weaver mutant mice: Ultrastructural relationships of dopaminergic dendrites and axons issued from the graft, *Exp. Brain Res.*, 79 (1990) 3-17.

306. Triarhou, L. C., Low, W. C. and Ghetti, B., Serotonin fiber innervation of cerebellar cell suspensions intraparenchymally grafted to the cerebellum of pcd mutant mice, *Neurochem res.*, 17 (1992) 475-482.

307. Trimmer, P. A. and Wunderlich, R. E., Changes in astroglial scar formation in rat optic nerve as a function of development, *J. Comp. Neurol.*, 296 (1990) 359-378.

308. Ueda, S., Ihara, N., Tanabe, T. and Sanao, Y., Reinnervation of serotonin fibers in the denervated rat subcommissural organ by fetal raphe transplants. An immunohistochemical study, *Brain Res.*, 444 (1988) 361-365.

309. van der Kooy, D. and Hattori, T., Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: A fluorescent retrograde double study in the rat, *Brain Res.*, 186 (1980) 1-7.

310. Vogel, H., Butcher, E. C. and Picker, L. J., H-CAM expression in the human nervous system: evidence for a role in diverse glial interactions, *J. Neurocytol.*, 21 (1992) 363-373.

311. Wang, J., Bankiewicz, K. S., Plunkett, R. J. and Oldfield, E. H., Intrastratial implantation of interleukin-1. Reduction of parkinsonism in rats by enhancing neuronal sprouting from residual dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the midbrain, *J Neurosurg.*, 80 (1994) 484-90.

312. Wang, Y., Wang, S. D., Lin, S. Z. and Liu, J. C., Restoration of dopamine overflow and clearance from the 6-hydroxydopamine lesioned rat striatum reinnervated by

fetal mesencephalic grafts, *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 270 (1994) 814-21.

313. Wauquier, A. and Dugovic, C., Serotonin and sleep-wakefulness. In: P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka (Eds.), *The Neuropharmacology of serotonin*, 600, Annals of the new york academie of sciences, New York, 1990, pp. 447-459.

314. Wehrle-Haller, B. and Chiquet, M., Dual function of tenascin: simultaneous promotion of neurite growth and inhibition of glial migration, *J. Cell. Sci.*, 106 (1993) 567-610.

315. Weissmann, D., Belin, M. F., Aguera, M., Meunier, C., Maitre, M., Cash, C. D., Ehret, M., Mandel, P. and Pujol, J. F., Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain, *Neuroscience*, 23 (1987) 291-304.

316. Wictorin, K., Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants, *Prog. Neurobiol.*, 38 (1992) 611-639.

317. Wictorin, K. and Björklund, A., Axon outgrowth from grafts of human embryonic spinal cord in the lesioned adult rat spinal cord, *Neuroreport*, 3 (1992) 1045-1048.

318. Wictorin, K., Brundin, P., Gustavii, B., Lindvall, O. and Björklund, A., Reformation of long axon pathway in adult rat CNS by human forebrain neuroblast, *Nature*, 347 (1990) 556-558.

319. Wictorin, K., Brundin, P., Sauer, H. and Björklund, A., Long distanced directed axonal growth from human dopaminergic mesencephalic neuroblasts implanted along the nigrostriatal pathway in 6-hydroxydopamine lesioned adult rat, *J. Comp. Neurol.*, 323 (1992) 475-494.

320. Wictorin, K., Ouimet, C. C. and Björklund, A., Intrinsic organization and connectivity of intrastriatal striatal transplants in rats as revealed by DARPP-32 immunohistochemistry: specificity of connections with the lesioned host brain, *Eur. J. Neurosci.*, 1 (1989) 690-701.

321. Wiklund, L. and Møllgard, K., Neurotoxic destruction of the serotonergic innervation of the rat subcommissural organ is followed by reinnervation through collateral sprouting of non-monoaminergic neurons, *J. Neurocytol.*, 9 (1979) 469-480.

322. Wilkin, G. P., Marriot, D. R. and Cholewinski, A. J., Astrocyte heterogeneity, *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 43-45.

323. Wunderlich, G., Stichel, C. C., Schroeder, W. O. and Muller, H. W., Transplants of immature astrocytes promote axonal regeneration in the adult rat brain, *Glia*, 10 (1994) 49-58.

324. Yazaki, T., Asou, H., Arimoto, K., Toya, S. and Uyemura, K., Decrease of NCAM expression and astrocyte-neurone interaction in long-term cultured astrocyte., *Neuroreport*, 6 (1995) 1085-1088.

325. Yoshimoto, Y., Lin, Q., Collier, T. J., Frim, D. M., Breakefield, X. O. and Bohn, M. C., Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease, *Brain Res.*, 691 (1995) 25-36.

326. Yurek, D. M., Collier, T. J. and Sladek, J. R. J., Embryonic mesencephalic and striatal co-grafts: development of grafted dopamine neurons and functional recovery, *Exp. Neurol.*, 109 (1990) 191-199.

327. Yurek, D. M., Lu, W., Hipkens, S. and Wiegand, S. J., BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons, *Exp. Neurol.*, 137 (1996) 105-118.

328. Zhou, F. C. and Azmitia, E. C., Induced homotypic collateral sprouting of serotonergic fibers in the hippocampus. II. An immunocytochemistry study, *Brain Res.*, 373 (1986) 337-348.

329. Zhou, F. C., Buchwald, N., Hull, C. and Towle, A., Neuronal and glial elements of fetal neostriatal grafts in the adult neostriatum, *Neuroscience*, 30 (1989) 19-31.

330. Zigmond, M. J., Abercrombie, E. D., Berger, T. W., Grace, A. A. and Stricker, E. M., Compensations after lesion of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications, *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 290-295.

331. Zigmond, M. J. and Stricker, E., Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications, *Int. Rev. Neurobiol.*, 31 (1989) 1-79.

Annexe 1: Contribution des différents auteurs aux articles présentés dans la thèse.

Article 1: ("Host serotonin axons innervate intrastriatal ventral mesencephalic grafts after implantation in newborn rats" par: Abderhamane Mounir, Myriem Chkirate, Annie Vallée, Philippe Pierret, Michel Geffard, Guy Doucet. Publié dans *European Journal of Neuroscience*, 6, pp. 1307-1315, 1994)

M. Chkirate (MSc) a commencé ce travail. A. Mounir (MSc) en a réalisé la majeure partie avec l'aide d'A. Vallée. M. Geffard a fourni l'anticorps dirigé contre la 5-HT. P. Pierret a complété le travail immunohistochimique. G. Doucet a dirigé le projet et participé à l'expérimentation ainsi qu'à la rédaction de l'article.

Article 2: ("Serotonin axons of the neostriatum show a higher affinity for striatal than for ventral mesencephalic transplants: a quantitative study in adult and immature recipient rats", par: Philippe Pierret, Annie Vallée, Olivier Bosler, Marc Dorais, Hakima Moukhles, Roya Abbaszadeh, Yves Lepage, Guy Doucet. Accepté pour publication dans *Experimental Neurology*, 1998):

P. Pierret est le principal responsable et exécutant du projet. Les transplantations ont été réalisées avec l'aide de G. Doucet et H. Moukhles. Après mise au point de la technique d'immunohistochimie en post-enrobage, R. Abbaszadeh a contribué à l'obtention de ces résultats. A. Vallée a apporté son aide technique lors de l'autoradiographie. La validation statistique a été effectuée par M. Dorais et Y. Lepage. G. Doucet a participé à l'analyse des résultats. L'article a été rédigé en collaboration avec G. Doucet et O. Bosler.

Manuscrit 3: (Effet promoteur de la co-transplantation d'astrocytes corticaux ou striataux sur l'innervation de greffes de tissu mésencéphalique ventral par les neurones sérotoninergiques de l'hôte, par: Philippe Pierret, Annie Vallée, Olivier Bosler, Roya Abbaszadeh, Anne-Marie Davis, Guy Doucet.)

P. Pierret est le principal responsable et exécutant du projet. Les cultures d'astrocytes et les transplantations ont été effectuées avec l'aide de

G. Doucet. Après mise au point de la technique d'immunohistochimie en pré- et en post-enrobage, A. M. Davis et R. Abbaszadeh ont contribué à l'obtention de ces résultats. A. Vallée a apporté son aide technique lors de l'autoradiographie. L'article en français a été rédigé en collaboration avec G. Doucet et O. Bosler.

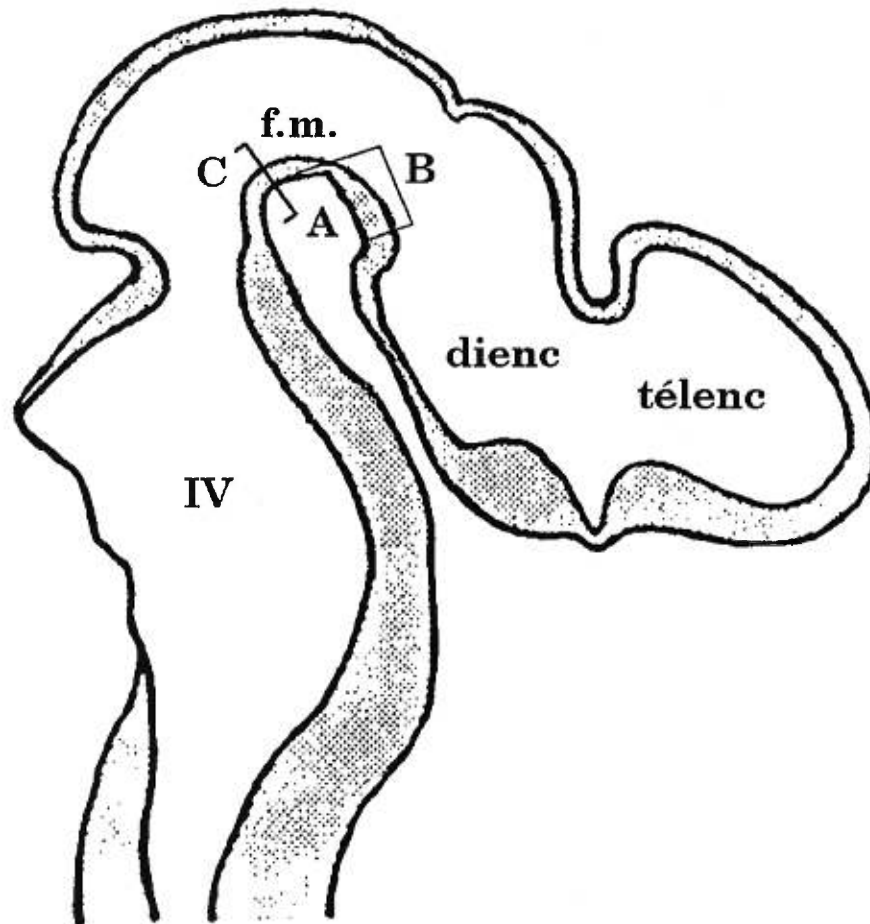
Article 4: ("Trophic and tropic effects of striatal astrocytes on co-grafted mesencephalic dopamine neurons", par: Philippe Pierret, Nancy Quenneville, Sylvie Vandaele, Roya Abbaszadeh, Christian Lanctôt, Philippe Crine, Guy Doucet. Publié dans *Journal of Neuroscience Research*, 51, pp 23-40, 1998)

P. Pierret est le principal responsable et exécutant du projet. Les transplantations ont été réalisées avec l'aide de N. Quenneville. Après mise au point de la technique d'immunohistochimie en post-enrobage, R. Abbaszadeh a contribué à l'obtention de ces résultats. S. Vandaele a effectué l'immunocytochimie et la caractérisation des cultures d'astrocytes avec l'aide de P. Pierret. C. Lanctôt a initié P. Pierret à la culture d'astrocyte dans le laboratoire de P. Crine. G. Doucet a dirigé le projet et participé à l'expérimentation ainsi qu'à la rédaction de l'article.

Article 5: ("Astrocytic reaction to the implantation of fetal ventral mesencephalic tissue into the neostriatum of newborn or adult rat", par: Nancy Quenneville, Philippe Pierret, Guy Doucet. Soumis à *Experimental Neurology*, 1998)

N. Quenneville est la principale responsable et exécutante du projet. Elle a effectué la majeure partie de l'expérimentation (greffes et sacrifices des rats, immunohistochimie), l'analyse des résultats et la rédaction de l'article. Le Dr G. Doucet a dirigé le projet et participé à l'expérimentation ainsi qu'à la rédaction de l'article. P. Pierret a agi en tant qu'assistant lors des séances de transplantation et des perfusions. Il a également contribué à l'analyse des résultats et à la correction de l'article.

Annexe 2: Schéma montrant le prélèvement de la partie 2/3 rostrale du mésencéphale ventral chez le fœtus de 14 jours du rat.



Légendes: A) région du mésencéphale ventral, B) Zone du mésencéphale ventral prélevé, C) Partie caudale du mésencéphale ventral où sont localisés les neurones 5-HT. Abréviations: IV: 4ième ventricule, f. m.: flexure mésencéphalique, dienc: diencéphale, télenc: télencéphale, (d'après (1, 2)).

1. Jacobs, B. L., and Azmitia, E. C. 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* **72**: 165-229.

2. Lauder, J. M. 1990. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. Pages 297-314 in P. M. Whitaker-Azmitia and S. J. Peroutka, Eds., *The Neuropharmacology of Serotonin*, Vol. 600. Annals of the New York academy of Sciences, New York.