



THÈSE

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS UFR des sciences fondamentales et appliquées Laboratoire de neurosciences expérimentales et cliniques - LNEC (Poitiers) (Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

> École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges) Secteur de recherche : Neurosciences

> > Cotutelle : Université libanaise

Présentée par : Nissrine Ballout

Étude de la neuroinflammation suite à la lésion et la transplantation corticale

Directeur(s) de Thèse : Afsaneh Gaillard, Kazem Zibara

Soutenue le 22 janvier 2016 devant le jury

<u>Jury :</u>

Président	Mohamed Jaber	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	Isabelle Loubinoux	Directeur de recherche INSERM, Université de Toulouse III
Rapporteur	Martine Migaud	Chargé de recherche INRA, Université de Tours
Membre	Afsaneh Gaillard	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Kazem Zibara	Professeur, Université libanaise
Membre	André Herbelin	Directeur de recherche INSERM, CHU de Poitiers
Membre	Bassam Badran	Professeur, Université libanaise

Pour citer cette thèse :

Nissrine Ballout. Étude de la neuroinflammation suite à la lésion et la transplantation corticale [En ligne]. Thèse Neurosciences. Poitiers : Université de Poitiers, 2016. Disponible sur l'Intranet de l'Université de Poitiers <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par L'Université de Poitiers Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées (Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006) Ecole Doctorale : Biosanté n°524 Et

L'Université Libanaise Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Nissrine BALLOUT Le 22 Janvier 2016

Etude de la neuroinflammation suite à la lésion et la transplantation corticale

Directeur de thèse : Afsaneh GAILLARD Co-directeur de la thèse : Kazem ZIBARA

Membre du Jury	
Mme. Isabelle Loubinoux, DR, U-825, Université Toulouse III	Rapporteur
Mme. Martine Migaud, CR-HDR, INRA, Université de Tours	Rapporteur
M. Andre Herbelin, DR, U-1082, CHU de Poitiers	Examinateur
M. Bassam Badran, PU, ER019, Université Libanaise	Examinateur
M. Mohamed Jaber, PU-PH, U-1084, Université de Poitiers	Examinateur
M. Kazem Zibara, PU, ER045, Université Libanaise	Co-directeur de thèse
Mme. Afsaneh Gaillard, PU, LNEC U-1084, Universite de Poitiers	Directrice de thèse





THESE EN COTUTELLE Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université de Poitiers

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Biosanté n°524

Et

L'Université Libanaise

Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Nissrine BALLOUT

Le 22 Janvier 2016

Etude de la neuroinflammation suite

à la lésion et la transplantation corticale

Directeur de thèse : Afsaneh GAILLARD Co-directeur de la thèse : Kazem ZIBARA

Membre du Jury

Mme. Isabelle Loubinoux, DR, U-825, Université Toulouse III	Rapporteur
Mme. Martine Migaud, CR-HDR, INRA, Université de Tours	Rapporteur
M. Andre Herbelin, DR, U-1082, CHU de Poitiers	Examinateur
M. Bassam Badran, PU, ER019, Université Libanaise	Examinateur
M. Mohamed Jaber, PU-PH, U-1084, Université de Poitiers	Examinateur
M. Kazem Zibara, PU, ER045, Université Libanaise	Co-directeur de thèse
Mme. Afsaneh Gaillard, PU, LNEC U-1084, Universite de Poitiers	Directrice de thèse

BALLOUT Nissrine

Poitiers, France

Née le 26 octobre 1989

Tel: 06 10 33 52 59

Mail: <u>nissrine.ballout@univ-poitiers.fr</u>

FORMATION

Depuis	Doctorat en Neurosciences en cotutelle entre l'Université de
Octobre 2012 :	Poitiers, INSERM U1084 « Laboratoire de Neurosciences
	Expérimentales et Cliniques », et l'Université Libanaise, Plateforme
	de Recherche et d'Analyse en Sciences et l'Environnement.
2011-2012 :	Master 2 Recherche en Immunologie, spécialité Immunothérapie,
	Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Université
	Libanaise. (Mention bien)
2007-2010 :	Licence en Biologie, Faculté des Sciences-section I, Université
	Libanaise.
2007:	Baccalaureat Libanais en Sciences de la vie et de la terre,
	Collège Saint-Elie Btina, Beyrouth.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Depuis	Doctorat en cotutelle entre l'Unité INSERM U1084 « Laboratoire
Octobre 2012 :	de Neurosciences Expérimentales et Cliniques » en France et la
	Platforme de Recherche et d'Analyse en Sciences et
	l'Environnement au Liban. Dirigé par Pr. Afsaneh GAILLARD et
	Pr. Kazem ZIBARA respectivement, portant sur l'« Etude de
	l'inflammation après la lésion et la transplantation corticale ».
2013-2015 :	Enseignant vacataire à la faculté de Sciences Fondamentales et
	Appliquées, Université de Poitiers :
	• CM Neuroadaptations (4 heures, Master 2)
	• TD et TP Neuroanatomie Fonctionnelle (70 heures, 3ème
	année Licence)
	 année Licence) TD Neuropharmacologie : bases cellulaires et moléculaires

• TD Neurosciences (64 heures, 3ème année Licence)

- **Depuis 2013 : Encadrement des Stagiaires** en L3, M1 et M2 au sein du Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques en France.
- Février-JuilletStage de recherche pour l'obtention du Master de Recherche en2012 :Immunologie spécialité Immunothérapie intitulé « *l'Evaluation de*
constructions vaccinales innovantes dans un modèle de souris SCID
humanisées», sous la direction de Dr. Soulaima CHAMAT,
laboratoire d'immunologie, Faculté de santé publique section II,
Université Libanaise.
- Juin-JuilletStage au laboratoire, Medex LAB for Medical Analysis, Haret2009 :Hreik, Liban.

COMPETENCES

Biologie cellulaire :	Culture de lignées cellulaires. Microscopie confocale à balayage laser FV1000 (Olympus, France) et microscope Zeiss Axio Imager.M2 Apotome, étude morphologique cellulaire, traitement d'image.
Biochimie :	ImmunoHistoChimie, ELISA, ELISPOT, ImmunoFluorescence Indirecte.
Biologie moléculaire :	PCR, hybridation in situ, clonage.
Expérimenta- tion animale :	Neuroanatomie du rongeur, perfusion, prélèvement de tissus (de l'embryon à l'adulte). Stéréotaxie chez la souris, techniques de coupes (vibratome, microtome, cryostat).

LANGUES

Trilingue Anglais, Français et Arabe (parlé, lu et écrit)

PUBLICATIONS EN COURS

Ballout N.*, Frappé I*., Péron S., Jaber M., Zibara K., Gaillard A. Development and maturation of cortical embryonic neurons grafted into the damaged adult motor cortex. (soumis)

Ballout N., Rochelle T., Brot S., Francheteau M., Gombert JM., Herbelin A., Zibara K., Gaillard A. Neuroinflammation after cortical lesion and transplantation with or without delay. (en preparation)

Ballout N.*, Droguerre M.*, Frangeul L., Nicolas C. Saha B., Gaillard A. Mobilization of endogenous neural stem cells following cortical lesion and transplantation. *Co-auteurs (en soumission)

Péron S., Droguerre M., Debarbieux F., **Ballout N.**, Benoit-Marand M., Francheteau M., Brot S., Weber P., Rougon G., Jaber M., Gaillard A. A delay between lesion and transplantation enhances graft integration and ameliorates repair and recovery. (soumis)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Ballout N., Saliba H., Kakhi Z., Bouharoun-Tayoun H., Heurtault B., Fournel S., Chamat S. Evaluation de Constructions Vaccinales Innovantes dans un Modèle de Souris NOD-SCID-Gamma(null) Humanisées. Bio-Beirut II: Cellular and Molecular Biology Meeting, Liban – Novembre 2012.

Ballout N., Saha B., Péron S., Jaber M., Gaillard, A. Subventricular zone proliferation and migration of endogenous neuroblasts following cortical lesion. Première Journée Scientifique de la SFR Tours-Poitiers, Tours – Juin 2013.

Ballout N., Saha B., Péron S., Jaber M., Gaillard, A. Subventricular zone proliferation and migration of endogenous neuroblasts following cortical lesion. 6^{em} Journée Recherche Tours-Poitiers, Poitiers – Novembre 2013, Abstract P064 : 96.

Ballout N., Frappe I., Peron S., Jaber M., Zibara K., Gaillard A. Development and maturation of cortical embryonic neurons and their axonal projections following their grafting into the damaged adult motor cortex. 3^{eme} Journée Scientifique EDST, Liban – Juin 2013.

Ballout N., Frappe I., Peron S., Jaber M., Zibara K., Gaillard A. Development and maturation of cortical embryonic neurons and their axonal projections following their grafting into the damaged adult motor cortex. Bio-Beirut III: Immunology & Stem cells research, Liban – Novembre 2013.

Ballout N., Frappe I., Peron S., Jaber M., Zibara K., Gaillard A. Development and maturation of cortical embryonic neurons into the damaged adult motor cortex. Congrès LAAS, Liban – Mars 2014.

Ballout N., Frappe I., Peron S., Jaber M., Zibara K., Gaillard A. Development and maturation of cortical embryonic neurons and their axonal projections following their

grafting into the damaged adult motor cortex. 2^{ème} Journée Scientifique de la SFR Tours-Poitiers, Poitiers – Juin 2014, Abstract P2.

Ballout N., Frappe I., Peron S., Jaber M., Zibara K., Gaillard A. Development and maturation of cortical embryonic neurons and their axonal projections following their grafting into the damaged adult motor cortex. 9ème congrès FENS, Milan – Juillet 2014, Abstract A034: 140.

Ballout N., Rochelle T., Brot S., Francheteau M., Gombert JM., Jaber M., Herbelin A., Zibara K., Gaillard A. Study of Neuroinflammation after cortical lesion and transplantation with or without delay. Première journée recherche Tours-Poitiers-Limoges, Tours – Decembre 2014, Abstract P11 : 35.

Ballout N., Rochelle T., Brot S., Francheteau M., Gombert JM., Jaber M., Herbelin A., Zibara K., Gaillard A. Study of Neuroinflammation after cortical lesion and transplantation with or without delay. 12^e colloque de la société des Neurosciences, Montpellier – Mai 2015, Abstract P1.080.

Ballout N., Rochelle T., Brot S., Francheteau M., Gombert JM., Jaber M., Herbelin A., Zibara K., Gaillard A. Study of Neuroinflammation after cortical lesion and transplantation with or without delay. 3ème Journée Scientifique de la SFR Tours-Poitiers, Tours – Juin 2015, Abstract P4.

DIVERS

Adhérente à la Société des Neurosciences, France (depuis 2013).

Organisatrice de la Semaine du Cerveau, Espace Mendes France, Poitiers (2013-2014).

Trésorière de l'association des doctorants en sciences à l'Université de Poitiers « **PictaSciences** » (2013-2014).

Vice-Secrétaire de l'association Franco-Libanaise à Poitiers « **Picta'Cèdres** » (2013-2014).

Coordinatrice du Journal/Data club au sein du laboratoire LNEC-U1084 (depuis 2014).

Diplôme en premiers soins, Croix Rouge Libanais (2010).

Maîtrise des logiciels de bureautiques, ImageJ, Statview, Prism.

«L'idéal de la vie n'est pas l'espoir de devenir parfait, C'est la volonté d'être toujours meilleur» **Ralph Waldo Emerson**

REMERCIEMENTS

En préambule de cette thèse, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères au Seigneur pour la grâce que nul ne peut mesurer.

Je tiens tout d'abord à exprimer tous mes remerciements aux Docteurs Isabelle Loubinoux et Martine Migaud d'avoir évalué cette thèse en tant que rapporteurs et au Docteur André Herbelin et Professeur Bassam Badran d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Je tiens à remercier le Professeur **Mohamed Jaber**. Je vous serais toujours *reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, et de m'avoir fait* confiance. *Merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions*. Merci pour les conseils stimulants que j'ai eu la chance de recevoir de votre part et aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon Jury de soutenance.

Au Professeur Afsaneh Gaillard, je vous remercie pour m'avoir fait confiance malgré mon manque de connaissances en neurosciences en Janvier 2013. Au-delà des remerciements formels que tout doctorant *doit à son encadrant, quoi qu'il en soit, j'ai* beaucoup appris à vos côtés. Je suis très honorée de vous avoir eu pour encadrante tant pour vos qualités scientifiques et les conditions de travail dont vous m'avez fait profiter que pour les qualités humaines avec lesquelles vous m'avez encadrée. Merci d'avoir consacré autant de temps et de patience pour faire de moi celle que je suis aujourd'hui.

Je tiens également à adresser mes remerciements les plus sincères au Professeur **Kazem Zibara** d'avoir dirigé cette thèse. Je vous remercie de m'avoir guidée, encouragée et conseillée tout au long de ces 3 années. J'espère avoir été digne de la confiance que vous m'ayez accordée et que ce travail est finalement à la hauteur de vos espérances.

Je souhaiterai remercier les scientifiques **Jean-Marc Gombert** et **André Herbelin** *de l'équipe IRTOMIT INSERM U*-1082 de *Poitiers avec lesquels j'ai eu la chance de* collaborer.

Pour ces trois belles années passées avec vous, merci à tous les membres du **LNEC**, merci d'avoir rendu cet environnement si familier et chaleureux. Merci pour tous les services rendus, les conseils et les apprentissages de manipulations, et pour toutes les interactions, scientifiques et autres, que nous avons pu avoir ensemble. Grâce à vous toute cette aventure a été riche et m'a beaucoup apportée.

J'adresse aussi mes remerciements à tous ceux qui ont participé directement à ce travail de thèse : **Tristan Rochelle**, d'avoir partagé ton expérience, ton implication, ta gentillesse, tes conseils et nos discussions au laboratoire. **Maureen Francheteau** pour ta bonne humeur, ta disponibilité, ta réactivité et pour ta réponse toujours optimiste « Mosh moshkileh », **Marie-Laure Bonnet** pour ton assistance qui m'a permis de faire cette thèse dans les meilleures conditions. **Sophie Péron**, *tu m'as accompagnée comme un*e grande *sœur, merci de m'avoir tant appris!*

Un grand Merci à mon acolyte de bureau. A ma **Marine**, que serait cette thèse sans toi?....???!!?!!.... Merci pour ton aide si précieuse, tes conseils si enrichissants, ton écoute... ton amitié! Tu as été ma complice de tous les jours!! A **Seb**, j'ai beaucoup appris en travaillant à tes côtés, merci de m'avoir toujours fait confiance en me faisant participer à tes réflexions scientifiques, de m'avoir conseillée, soutenue et critiquée dans mon travail. Merci également pour tes grandes qualités humaines, ton amitié et d'être toujours là pour moi.

A Mejda, Celine, et Emilie sur qui j'ai toujours pu compter! Votre amitié et votre soutien durant ces années ont été si précieux. Cette gentillesse, cet optimisme et cette générosité qui émanent de vous, n'ont rendu ces années que plus belles encore! Merci à Sandie, Audrey, Anais et Audrey pour ces bons moments partagés ensemble et ces parties de fou rire. Merci pour toutes les discussions scientifiques et vos conseils.

Merci à Anne Cantereau pour votre aide en microscopie confocale. J'adresse aussi mes remerciements aux personnes qui m'ont permis de découvrir l'enseignement au cours des vacations effectuées pendant cette thèse, un petit clin d'œil à Laetitia Prestoz et Marianne Benoit-Marand. Merci également à toutes les personnes qui m'ont aidé dans les démarches administratives et dans le soin porté à mes souris à l'animalerie.

Enfin, la recherche ne pourrait avancer sans les soutiens sincères de *l'association pour la spécialisation et l'orientation scientifique*, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre soutien moral et financier.

Un immense merci à ma famille sans qui rien n'aurait été possible. A mes parents, qui malgré la distance, ont pu être toujours présents à mes côtés. Je vous remercie de m'avoir permis d'atteindre ce niveau, grâce à votre soutien, vos encouragements, votre écoute et vos conseils. A ma mère **Ola**, qui m'a toujours appris que la connaissance et le savoir étaient les meilleurs atouts d'une femme épanouie. A mon père **Mohamed**, qui m'a toujours poussé à persévérer et à croire en moi pour être une femme accomplie : «Vouloir c'est Pouvoir!». Ce sont des règles que vous n'avez cessé de m'enseigner et que j'essaie au mieux d'appliquer; cette thèse a été aussi importante pour vous que pour moi et elle est, sans aucun doute, aussi la vôtre. A mes 2 frères **Alaa** et **Ali**, votre présence à mes côtés a toujours compter sur vous! Merci de m'avoir soutenue et d'avoir partagé cette aventure avec moi. Je vous souhaite un avenir prometteur que vous méritiez, et je serai toujours à vos côtés pour vous aider à aller jusqu'au bout de vos projets. A mes grands-parents Zeinab, Hassan, Ali et Houriye qui m'ont toujours accompagnée dans ce que j'ai entrepris.

Mes remerciements vont aussi à ma grande famille et mes amis qui, avec cette question récurrente : « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse? ». Cette question bien qu'angoissante en période de doutes, m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Merci à Josiane, Diab, Bader, Momo, Ola, Jouhaina, Nawar, Jaber, Marwan, Nicolas, Elie, Jad, Zeina, Fatima, Walaa, Abir, Alia, Hassan, Ahmad, Jad, Loulou, Mayssam, Mahmoud, Ahmad, Mahmoud, Doaa. Merci pour votre soutien, sachez que j'en aurais encore besoin, car la fin de cette thèse, plus qu'un aboutissement, marque le début d'une nouvelle aventure.

A **Dyaa**, dans la vie, il y a des personnes que l'on croise et puis d'autres que l'on rencontre, et moi j'ai eu la chance de te rencontrer. Merci pour ta présence, ton humour, ton soutien quand j'en ai eu besoin et nos innombrables moments avec mes meilleurs souhaits de réussite pour ta vie professionnelle et personnelle.

A Karim, my guardian angel, ma force, merci pour tout ce que tu m'apportes. On se demande parfois si la vie a un sens, et puis on rencontre des gens qui donnent un sens à la vie. Tes leçons de vie et de courage m'ont chaque jour confortée dans mes propres choix, merci de m'enrichir autant, de veiller sur moi et de me rappeler sans cesse que le plus important est d'apprécier le moment présent. Merci pour tes encouragements, ta confiance, ton soutien quotidien, ta patience, ta tolérance et pour tous nos voyages découverte \mathfrak{S}

A ma famille, pour leurs encouragements dans ma vie personnelle et professionnelle et pour me donner confiance en moi chaque jour. Sans vous, je n'en serais pas là.

Résumé

Les lésions du système nerveux central (SNC) entraînent une perte neuronale associée à des déficits fonctionnels importants. En réponse à une lésion, les capacités de repousse axonale et de régénération spontanée des neurones du SNC sont limitées. Nous avons évalué, dans un modèle de lésion corticale chez la souris adulte, le potentiel des greffes de neurones corticaux embryonnaires à réparer les voies corticales lésées. L'efficacité de cette approche thérapeutique dépend (1) du degré de survie des cellules greffées, (2) de la capacité des cellules greffées à se différencier en type neuronal approprié et (3) de la capacité des neurones greffés à restaurer les voies corticales endommagées de façon spécifiques. Nous avons montré que les neurones embryonnaires corticaux d'origine du cortex moteur transplantés immédiatement après la lésion du cortex moteur adulte se différencient en neurones matures exprimant les mêmes neurotransmetteurs et marqueurs de couches corticales que ceux du cortex normal. De plus, les neurones transplantés développent des projections vers les cibles corticales et sous corticales appropriées. Par ailleurs, nous avons étudié l'influence de la neuroinflammation post-lésionnelle sur la survie des neurones transplantés et, l'influence des neurones transplantés sur la neuroinflammation de l'hôte. Nos résultats montrent que, après la lésion corticale, le nombre d'astrocytes, d'oligodendrocytes, de la microglie et des cellules CD45+ est significativement augmentée. De façon intéressante, le fait qu'une partie de la microglie co- exprime TGF-β1, une cytokine anti-inflammatoire, appui l'hypothèse d'une activation microgliale également neuroprotectrice. En utilisant les souris IL-33 KO, nous avons montré pour la première fois, que l'absence d'IL-33 diminue la croissance axonale des neurones transplantés.

Abstract

Central nervous system (CNS) lesions leads to a neuronal loss associated with significant functional deficits. In response to injury, the capacity of spontaneous axonal regrowth and regeneration of neurons in the CNS are limited. We evaluated in a model of cortical lesion in adult mice, the potential of embryonic cortical neurons grafts to repair the

injured cortical pathways. The efficacy of this therapeutic approach depends on (1) the degree of survival of transplanted cells, (2) the ability of the grafted cells to differentiate into neuronal appropriate type and (3) the ability of the transplanted neurons to restore damaged cortical pathways. We have shown that embryonic cortical neurons transplanted immediately after the injury of the adult motor cortex differentiate into mature neurons expressing the same neurotransmitters and markers of cortical layers that are normally expressed by intact cortex. Furthermore, the transplanted neurons develop projections to the appropriate cortical and sub-cortical targets. In addition, we studied the influence of post-traumatic neuroinflammation on the survival of transplanted neurons and the influence of transplanted neurons on host neuroinflammation. Our results show that after cortical lesion, the number of astrocytes, microglia, oligodendrocytes and CD45+ cells was significantly increased. Interestingly, a part of microglia co-expressed TGF- β 1, an anti-inflammatory cytokine, supporting the hypothesis that microglial activation is also neuroprotective. By using, IL-33 KO mice, we have shown for the first time that the absence of IL-33 decreased the axonal outgrowth of transplanted neurons.

SOMMAIRE GENERALE

PRINCIPALES ABREVIATIONS

INDEX DES FIGURES

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION

I. Le cortex cérébral	
A. Généralités sur l'organisation du cortex cérébral	1
1- Les couches corticales	
2- Organisation cellulaire	
B. La corticogenèse	5
1- La neurogenèse	5
2- Les progéniteurs des neurones corticaux	7
3- Spécification des progéniteurs neuronaux	
4- Migration cellulaire	
5- Organisation anatomo-fonctionnelle du cortex moteur	
C. Lésion du cortex moteur	
II. Réparation cérébrale par neurotransplantation	
A. Rappels historiques	
B. Transplantation de neurones embryonnaires corticaux	
1- Chez le nouveau-né	
2- Chez l'adulte	
3- Caractéristiques histologiques des transplants	
4- Facteurs influençant le développement des neurones transplantés	s
5- Particularité de la transplantation des neurones dérivés d souches	les cellules
III. Neuroinflammation	
A. Le concept de la neuroinflammation	
1- Immunité innée	

2- Immunité acquise	
B. Les médiateurs cellulaires de la neuroinflammation	
1- La microglie	44
2- Les astrocytes	50
3- Les oligodendrocytes	53
C. Les médiateurs moléculaires de l'inflammation	
1- Les chimiokines	55
2- Les cytokines	55

RESULTATS EXPERIMENTAUX	
Développement et maturation dans le temps des neurones er	mbryonnaires corticaux
et de leurs projections axonales après transplantation dans	le cortex moteur lésé
adulte	63
Interleukine 33 favorise la croissance axonale des neurones	embryonnaires greffés
dans le cortex moteur	

DISCUSSION	51
------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PRINCIPALES ABREVIATIONS

2-DG: 2-deoxylglucose

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

BHE: barrière hématoencéphalique

BLBP: brain lipid binding protein

Bmp: bone morphogenetic proteins

CCI: controlled cortical impact

CFL: caudal forelimb area

CMH I ou II : complexe majeur

d'histocompatibilité de classe I ou II

CP : plaque corticale

CSPGs : chondroitin sulfate proteoglycans

Ctip2: chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2

Cux1: cut-like homeobox 1

Cux2: cut-like homeobox 2

DAMPS: danger associated molecular patterns

DC: dendritic cells

E: jour embryonnaire

Emx1: empty spiracle homologues 1

Emx2: empty spiracles homeobox 2

ESC: embryonic stem cell

FGF: fibriblast growth factor

FoxG1: forkhead box protein G1

Foxp2: forkhead box protein P2

GABA: acide γ -aminobutyrique

GDNF: glial cell-line derived neurotrophic factor

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GLAST: astrocyte-Specific glutamate transporter

HL: hindlimb

hNSCs: human neuronal stem cells

IL: Interleukine

IL-1RAcP: IL-1 receptor accessory protein

IP : progéniteurs intermédiaires

IPSCs : induced pluripotent stem cells

IZ : zone intermédiaire

JLT: jaw, lips and tongue area

Lhx2 : LIM homeobox protein 2

LPS: lipopolysaccharide

MAG: myelin-associated glycoprotein

MZ : marginal zone

NE : neuroepithelial cells

NGF: nerve growth factor

NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique

NO: nitric oxide

NT3: neurotrophine 3

OMgp: oligodendrocyte-myelin glycoprotein

OPC: oligodendrocytes progenitor cells

PAMPS: pathogen-associated molecular patterns

Pax6: paired box protein 6

PP : pré-plaque

PRR: pattern recognition receptors

RFL: rostral forelimb area

RG: radial glia

ROS: reactive oxygen species

Satb2: special AT-Rich sequencebinding protein 2

SCI: spinal cord injury

Shh: sonic hedgehog

SNC : système nerveux central

SP : sous-plaque

Svet1: subventricular-expressed transcript 1

SVZ : subventricular zone

TBI: traumatic brain injury

Tbr2: T-box brain 2

TFs: transcription factors

TNF- α : tumor necrosis factor- α

VEGF: vascular endothelial growth factor

V-FEF: vibrissae motor-frontal eye field

VZ : ventricular zone

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Organisation laminaire du cortex.
Figure 2: Les principales voies de migration des neurones corticaux au cours de développement cortical et la génération temporelle des neurones de projection à partir d progéniteurs situés dans la VZ et SVZ
Figure 3: La génération, la migration et la différenciation des cellules neurales dans l néocortex
Figure 4: Profils des marqueurs spécifiques des neurones de chaque couche corticale 1
Figure 5: Représentation somatotopique des muscles contrôlant différentes parties de corps14
Figure 6: Représentation schématique des principales éfferences du cortex moteur 1'
Figure 7: Reconstruction anatomique des voies lésées après transplantation du fragmen du cortex moteur embryonnaire dans le cortex moteur lésé chez la souris adulte
Figure 8: Activation de la microglie en présence d'un corps étranger 4'
Figure 9: Hétérogénéité phénotypique microgliale après activation
Figure 10: Caractéristiques de l'activation des astrocytes
AVANT-PROPOS

Les pathologies du système nerveux central, qu'elles soient d'origine traumatique, vasculaire ou dégénérative, sont souvent associées à des déficits fonctionnels qui peuvent être irréversibles en fonction du degré ou de l'emplacement des lésions cérébrales.

Durant ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes de réparation cérébrale dans un modèle de lésion corticale chez la souris adulte. Nous avons évalué le potentiel de stratégies de remplacement cellulaire par la transplantation de neurones corticaux embryonnaires et plus particulièrement, le profil inflammatoire observé suite à la lésion et la transplantation corticale.

La première partie de ce manuscrit présente donc une description générale de l'organisation du cortex. Puis, une révision des données obtenues dans le domaine de la transplantation de neurones corticaux sera présentée. Enfin, nous détaillerons la réaction inflammatoire ainsi que ses médiateurs dans le système nerveux central.

Les résultats sont présentés sous la forme de deux articles : « Développement et maturation dans le temps des neurones embryonnaires corticaux et de leurs projections axonales après transplantation dans le cortex moteur lésé adulte » et « Interleukine 33 favorise la croissance axonale des neurones embryonnaires greffés dans le cortex moteur ». Le manuscrit se termine par une discussion générale et les perspectives d'avenir de ce travail.

Les deux études ont été réalisées dans un modèle de transplantation de neurones corticaux embryonnaires chez l'adulte après lésion par aspiration unilatérale du cortex moteur. Les travaux antérieurs au sein de notre équipe ont démontré que la transplantation de neurones embryonnaires corticaux immédiatement après la lésion du cortex moteur adulte permet la reconstruction point-à-point des voies motrices lésées. De plus, les neurones transplantés développent les projections axonales vers les cibles corticales appropriées y compris sur de longues distances, vers la moelle épinière (Gaillard et al., 2007). Cependant, il n'existe pas de donnée sur le profil du développement, de différenciation ou de maturation de neurones greffés dans le temps. L'efficacité de la transplantation corticale dépend du degré de survie du transplant, de sa

capacité à restaurer les projections spécifiques et à se différencier selon le phénotype neuronal approprié. L'objectif de la première étude, était d'analyser, dans le temps, la maturation et le développement des neurones embryonnaires corticaux transplantés dans le cortex moteur lésé adulte ainsi que le développement de leurs projections axonales.

Nous avons récemment montré que l'introduction d'un délai d'une semaine entre la lésion corticale et la transplantation induit des effets bénéfiques sur le plan neuroanatomique et fonctionnel. En effet, le délai augmente la taille du transplant, la prolifération cellulaire, la vascularisation des greffes et le nombre de projections développées par les neurones greffés (Péron et al., 2015). De façon intéressante, nous avons montré que l'introduction d'un délai permet une amélioration des récupérations motrices. Nous avons, dans notre seconde étude, analysé l'implication de l'expression des molécules anti-inflammatoires comme support des effets bénéfiques observés en introduisant un délai entre la lésion et la transplantation corticale. **INTRODUCTION**

I. Le cortex cérébral

Le cortex cérébral, chez l'adulte, est segmenté en plusieurs aires distinctes qui diffèrent les unes des autres par leurs cyto-architectures, leurs connexions et leurs propriétés physiologiques.

Ce chapitre développe des éléments concernant la structure du cortex cérébral et les principales étapes de son développement.

A. Généralités sur l'organisation du cortex cérébral

Le néocortex désigne la partie périphérique des hémisphères cérébraux. Il fait partie du cortex cérébral et joue un rôle primordial dans les fonctions cognitives supérieures telles que l'activité consciente, la perception sensorielle, le langage, le raisonnement spatial ou encore les commandes motrices volontaires (Finlay, 1995).

Le néocortex est une structure organisée en six couches qui renferment des centaines de types de neurones différents, d'interneurones et de cellules gliales (Ramon y Cajal, 1995).

1- Les couches corticales

Le cortex cérébral possède une organisation laminaire en 6 couches (Figure 1) et plus de 40 aires corticales. Les couches corticales sont numérotées de I à VI à partir de la surface du cerveau et elles sont distinctes par leur composition cellulaire et leur épaisseur (Lev et White, 1997).

La couche I (couche moléculaire ou plexiforme) possède une densité cellulaire faible. Elle contient principalement des fibres nerveuses orientées horizontalement, des cellules gliales, mais aussi des cellules de Cajal-Retzius et des neurones étoilés. Cette

couche reçoit des afférences de neurones thalamiques qui relaient les informations provenant des ganglions de la base (Kuramoto et al., 2009). La couche II (couche granulaire externe) est constituée de neurones granulaires de petite taille. La couche III (couche pyramidale externe) est formée de cellules pyramidales. Ces 2 couches, II et III, émettent des dendrites dans la couche I (Petreanu et al., 2009) grâce auxquelles elles reçoivent des excitations thalamiques (Hooks et al., 2013). Elles projettent également des axones vers les neurones cortico-spinaux de la couche V (Schubert et al., 2006), vers le cortex controlatéral (pour revue, Molyneaux et al., 2007) ainsi que vers le striatum ipsilatéral et controlatéral (Reiner et al., 2003). La couche IV (couche granulaire interne) est la couche la moins épaisse du cortex moteur primaire M1. Elle est constituée de neurones étoilés et pyramidaux. Les neurones de cette couche IV forment des connections entre eux (Cowan et Stricker, 2004) mais projettent également les collatérales de leurs axones dans toutes les couches corticales, notamment les couches II et III (Lübke et al., 2000). La couche IV reçoit des afférences du thalamus, et du cortex controlatéral. En ce qui concerne la couche V (couche pyramidale interne), elle contient de larges neurones pyramidaux ou neurones de projection, qui émettent des projections vers des cibles sous-corticales, comme le striatum, le tractus pyramidal (Reiner et al., 2003), ou corticales. La couche VI (couche polymorphe) contient des cellules pyramidales qui projettent vers le thalamus (Zhang et Deschênes, 1997, Zhang et Deschênes, 1998) ainsi que dans d'autres régions corticales. Cette couche reçoit des afférences du thalamus et d'autres régions corticales (Zhang et Deschênes, 1997, Zhang et Deschênes, 1998).



Figure 1: Organisation laminaire du cortex. Les 6 couches corticales sont visualisées et délimitées grâce aux 3 techniques de coloration La coloration de Golgi montre les corps cellulaires des neurones et les dendrites. La coloration de Nissl révèle les corps cellulaires et les dendrites proximales et la coloration de Weigert permet de visualiser la distribution axonale (Heimer, 1994).

2- Organisation cellulaire

Le cortex cérébral est composé de deux types cellulaires, les neurones et la glie. La majorité des neurones (environ 80%) sont des neurones pyramidaux de type excitateur et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. D'un point de vue morphologique, les neurones pyramidaux corticaux ont un corps cellulaire de forme pyramidale et possèdent une large dendrite apicale qui contacte, la plupart du temps, la couche I du cortex. Leurs dendrites possèdent de nombreuses épines où s'établissent des contacts synaptiques. Ces neurones pyramidaux sont particulièrement nombreux dans les couches II/III, V et VI, et sont absents de la couche I. Ils peuvent, soit projeter leur axone localement, soit contacter des cibles corticales et sous-corticales du cortex cérébral et sont alors appelés neurones de projection.

Le cortex cérébral contient également environ 20% de cellules non-pyramidales inhibitrices qui utilisent l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur. Ils constituent des réseaux locaux qui inhibent les neurones de projection. Ce sont des neurones à corps cellulaire ellipsoïdal, et qui, en général, n'ont pas de dendrite proéminente. Ces neurones ont des axones courts projetant localement, d'où leur nom d'interneurones. Ils ne constituent pas une population homogène mais présentent une grande diversité morphologique, électrophysiologique et chimique (Kawaguchi et Kubota, 1997 ; pour revue, Contreras, 2004). Les interneurones GABAergiques ne sont pas distribués de façon aléatoire dans le cortex, ils ont tendance à former de petits amas concentrés dans le tissu cortical (Ciceri et al., 2013).

Une faible proportion des neurones corticaux sont les neurones Cajal-Retzius qui peuplent la couche I du cortex et régulent le positionnement laminaire des neurones corticaux pendant le développement en sécrétant la Reelin. Cette dernière est une protéine qui semble être requise pour établir une stratification corticale en exerçant un rôle répulsif sur les neurones en migration radiaire (pour revue, Tissir et Goffinet, 2003).

Les cellules gliales constituent la population cellulaire majoritaire du système nerveux central (SNC) des mammifères. Elles regroupent les astrocytes, les oligodendrocytes, et la microglie. Les astrocytes ont généralement une forme étoilée et sont pourvus de nombreux prolongements en contact direct avec les vaisseaux sanguins, la pie-mère et les neurones. Ils assurent un support structurel, métabolique et trophique pour les neurones moteurs. Des études récentes montrent que les astrocytes fournissent non seulement un rôle de soutien pour les neurones, mais qu'ils régulent également certaines fonctions physiologiques du cerveau (Molofsky et al., 2012; Burda et Sofroniew, 2014; Sloan et Barres, 2014). Les oligodendrocytes quant à eux, jouent un rôle essentiel dans la formation de la gaine de myéline des axones du SNC favorisant la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Cette fonction est assurée par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. La microglie constitue la principale cellule immunocompétente du SNC. En effet, la microglie est activée en réponse à une

atteinte du SNC et possède également un rôle de sécrétion de multiples facteurs en fonction des signaux environnementaux.

B. La corticogenèse

1- La neurogenèse

Durant le développement embryonnaire, le SNC se forme à partir des cellules neuroépithéliales du tube neural. La zone ventriculaire (VZ) est la couche qui tapisse le ventricule et en-dessus apparait la zone sous ventriculaire (SVZ). Les progéniteurs présents dans la VZ et la SVZ génèrent la majorité des neurones entre le jour embryonnaire (E) 11,5 et 17,5 (Takahashi et al., 1995). Les premières cellules migrent de la VZ et donnent naissance à une nouvelle zone, la pré-plaque (PP) (Marin-Padilla, 1971). Cette dernière se divise ensuite en une couche superficielle et une couche profonde appelées respectivement la zone marginale (MZ) et la sous-plaque (SP). Simultanément, une zone constituée d'une forte proportion de fibres et de quelques rares cellules en division, appelée zone intermédiaire (IZ), se forme entre la SVZ et la PP. Cette zone est l'origine de la substance blanche chez l'adulte. La plaque corticale (CP) commence à se développer entre la MZ et la SP (Bayer et Altman, 1991), elle sera à l'origine de la mise en place progressive des différentes couches cellulaires du futur cortex. Ainsi, les générations successives de cellules neuronales quittent la VZ, migrent en traversant la sous-plaque et forment les couches séquentielles de la plaque corticale. De ce fait, la superposition de la plaque sous-corticale se produit selon le profil « insideout » dans lequel les neurones générés en premier se retrouvent dans les couches profondes, et les neurones générés en dernier forment les couches les plus superficielles du cortex (Rakic et Lombroso, 1998).

Peu après la naissance, la sous-plaque disparaitra, ses cellules seront incorporées dans la couche VI, dispersées ou éliminées par mort cellulaire (pour revue, K L Allendoerfer et Shatz, 1994). Le reste de la zone marginale constitue la couche I acellulaire du cortex mature. Celle-ci forme avec les cinq couches dérivant de la plaque corticale le néocortex (Figure 2).



Figure 2: (A) Les principales voies de migration des neurones corticaux au cours du développement cortical. Les neurones de projection proviennent des progéniteurs du ventricule dorso-latéral (ligne rouge) et migrent radialement pour remplir le cortex en développement (flèches rouges). Les interneurones corticaux proviennent des structures ventro-latérales (ligne verte, LGE et MGE: éminence ganglionnaire latérale et médiale) et migrent tangentiellement dans le cortex (flèches vertes). (B) Schéma illustrant la génération temporelle des neurones de projection à partir de progéniteurs situés dans la VZ et SVZ. VZ: zone ventriculaire, SVZ: zone sous-ventriculaire, PP: pré-plaque, SP: sous plaque, IZ: zone intermédiaire, CP: plaque corticale, MZ: zone marginale, WM: substance blanche, E: épendyme (D'après Mérot et al., 2009).

Plusieurs théories ont été émises afin de comprendre le déroulement de l'expansion et de la régionalisation du néocortex. L'hypothèse de la « radial unit » (Rakic, 1988) énonce que la surface du néocortex et son épaisseur sont déterminées au cours de deux phases. La surface est établie d'abord, au cours de la phase de prolifération,

lorsque les cellules neuroépitheliales subissent des divisions symétriques pour amplifier le nombre des cellules d'origine. L'épaisseur du néocortex est déterminée plus tard, au cours de la phase de différenciation, lorsque chaque cellule gliale commence à générer des neurones par des cycles séquentiels de divisions asymétriques (Rakic, 1988). Au cours de cette dernière phase, les neurones d'une même unité proliférative migrent par ordre de naissance, suivant le même guide de glie radiaire que leur cellule-mère pour arriver au sein de la plaque corticale. Une « radial unit » est alors définie comme une «colonne ontogénétique» de neurones d'une même unité proliférative.

L'hypothèse du « protomap », développée par Rakic, affirme que la répartition régionale du cortex est établie à des stades précoces du développement (Rakic, 1988) et insiste sur le rôle des facteurs ontogénétiques. Selon cette hypothèse, le neurone cortical est engagé pour une aire précise avant qu'il n'ait atteint sa position finale dans la plaque corticale.

La théorie du « protocortex » (O'Leary, 1989), à l'inverse de l'hypothèse du « protomap », attribue une influence dominante aux instructions épigénétiques durant les mécanismes de différenciation corticale. Le cortex est divisé en zones fonctionnelles tardivement, sous l'influence de facteurs environnementaux et plus particulièrement les afférences thalamiques (O'Leary, 1989; Schlaggar et O'Leary, 1991).

2- Les progéniteurs des neurones corticaux

Plusieurs types de progéniteurs neurogéniques ont été décrits dans le néocortex en cours de développement tels que les cellules neuroépithéliales (NE), la glie radiaire (RG), et les progéniteurs intermédiaires (IP).

Tous les neurones du néocortex ont comme origine les cellules pseudostratifiées neuroépitheliales. Ces cellules subissent des divisions cellulaires symétriques afin d'accroître le nombre de progeniteurs multipotents. Aux alentours du 11^{ème} jour de vie embryonnaire, les cellules NE passent d'un mode prolifératif symétrique à un mode de division asymétrique pour générer les neurones précoces (pour revue, Gotz et Huttner,

2005) et d'autres populations de progéniteurs telles que les RGs (Figure 3). Ces neurones migrent en direction des cellules de Cajal-Retzius générées dès le jour E10 (Bielle et al., 2005).

Sous l'action de gènes tels que FoxG1 (Forkhead box protein G1), Lhx2 (LIM homeobox protein 2), Pax6 (Paired box protein 6) et Emx2 (Empty spiracles homeobox 2), les NEs se transforment en cellules gliales radiaires (RGs). Au cours de cette transformation, les NEs perdent une partie de leurs propriétés épithéliales en faveur de certaines caractéristiques gliales, en conservant le contact avec la surface ventriculaire qui leur donne la morphologie radiaire ainsi que l'expression de la protéine Nestin. Parmi les changements caractérisant la transition des NEs aux RGs peuvent être cités : la perte des jonctions serrées (Aaku-Saraste et al., 1996), l'acquisition des granules de stockage de glycogène (Gadisseux et Evrard, 1985), l'expression des gènes astrogliaux tel que la BLBP (Brain Lipid Binding Protein) et des marqueurs astrogliaux tels que le GLAST (Astrocyte-Specific Glutamate Transporter), S100β, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et la vimentine (Hartfuss et al., 2001; Heins et al., 2002; Noctor et al., 2002). La glie radiaire a été longtemps connue pour son rôle crucial dans le guidage des neurones à leur emplacement définitif dans la plaque corticale (pour revue, Rakic, 2003). Plusieurs études ont démontré qu'au moins un certain pourcentage des cellules gliales fonctionne également comme progéniteurs grâce à leur division asymétrique. Ils jouent un rôle majeur dans la neurogenèse corticale (Noctor et al., 2001; Hartfuss et al., 2001) en générant de la macroglie et des neurones pyramidaux soit directement par mitoses, ou indirectement, à travers la production de progeniteurs intermédiaires (Noctor et al., 2004).

Les progeniteurs intermédiaires (IP) se distinguent des RGs par l'expression du facteur de transcription Tbr2 (T-box brain 2) et la diminution de régulation du facteur de transcription Pax6 (Englund et al., 2005, Ayoub et al., 2011). Les IPs perdent le contact avec la surface ventriculaire et migrent vers des positions basales avant de subir plusieurs mitoses. Lors du développement, le nombre de ces IPs augmente, créant ainsi la SVZ. Leur division cellulaire symétrique produit 2 neurones qui donneront naissance dans un premier temps aux neurones des couches profondes, puis aux neurones des couches

superficielles (Gotz et Huttner, 2005). Des études préliminaires suggèrent que les IPs participent à la formation de toutes les couches corticales y compris la sous-plaque et les neurones Cajal-Retzius (Pimeisl et al., 2013).



Figure 3: La génération, la migration et la différenciation des cellules neurales dans le néocortex. Les cellules neuro-épithéliales (NPCs) subissent des divisions cellulaires symétriques pour produire un nombre initial de progéniteurs corticaux qui se transforment plus tard en cellules gliales radiaires apicales (aRGCs). Les aRGCs commencent alors leur division cellulaire asymétrique générant pour chacune, une aRGC et un neurone de projection. Le neurone migre radialement à partir de la zone ventriculaire (VZ) vers la plaque corticale (CP). Les premiers neurones initialement générés migrent pour former la pré-plaque. Les neurones générés plus tard divisent la pré-plaque en une zone marginale (MZ) et la sous-plaque (SP). La MZ se compose également de cellules de Cajal-Retzius provenant de multiples sites dans le cerveau antérieur incluant l'ourlet cortical. Les neurones de projection générés en premier se déposent dans les couches profondes (couches V et VI) et les neurones de projection générés plus tard s'installent dans les couches superficielles (profil de type «inside-out»). En outre, certaines populations de cellules-filles RGC deviennent des cellules progénitrices intermédiaires (IPC) ou des cellules gliales radiaires basales (bRGC) dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) (D'après Shibata et al., 2015).

3- Spécification des progéniteurs neuronaux

Afin de donner naissance à un neurone cortical, une cellule souche pluripotente passe par 4 étapes majeures : la compétence, la spécification, l'engagement, et la différenciation (Wilson et Edlund, 2001). Pendant le développement, les cellules compétentes, c'est-à-dire capables de devenir des précurseurs neuraux, deviennent progressivement limitées dans leur état de compétence. La spécification initiale des progéniteurs corticaux implique des ligands sécrétés aux alentours du domaine télencéphalique cortical dorsal.

Les familles de protéines telles que Fgf (Fibroblast growth factor) sécrétée à partir de la crête neurale antérieure, Wnt et Bmp (Bone morphogenetic proteins) sécrétées à partir de l'ourlet cortical, et Shh (Sonic hedgehog) sécrétée par l'éminence ganglionnaire médiane (Hébert et al., 2002; Shimogori et al., 2004) génèrent des informations entrainant une expression graduelle des facteurs de transcription (TFs). Par exemple, l'expression des TFs tels qu'Emx1, Emx2 (Empty spiracle homologues 1 and 2), Pax6 et Lhx2 se traduit par une régionalisation moléculaire de la zone germinale. Une mutation de Emx1/2 entraine une réduction de la taille du cortex (Bishop et al., 2003). Emx2 est également requis en association avec Pax6, pour l'établissement de l'identité dorsale des progéniteurs. En effet, on note une absence du cortex chez les embryons doublement mutés Pax6/Emx2 (Muzio et al., 2002).

Nous avons détaillé précédemment les différentes couches corticales qui sont colonisées par différents sous-types de neurones pyramidaux. Ils expriment différents facteurs de transcription (Figure 4), leur identification est donc possible par des techniques telles que l'hybridation in situ ou les séquençages d'ARN (Molyneaux et al., 2015). Il a été défini que les facteurs de transcription comme Svet1 (Subventricular-expressed transcript 1), Cux1 (Cut-like homeobox 1) et Cux2 (Cut-like homeobox 2) marquent les neurones des couches superficielles. En parallèle, Foxp2 (Forkhead box protein P2), Ctip2 (Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2) et Satb2 (Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2) sont exprimés par les neurones des couches profondes (pour revue Leone et al., 2008; Greig et al., 2013).



Figure 4: Profils des marqueurs spécifiques des neurones de chaque couche corticale. (D'après Gaspard et al., 2008).

La spécification des neurones suit une séquence temporelle coordonnée. Les premiers progéniteurs corticaux, qui produisent normalement des neurones de la couche profonde, sont multipotents. Lorsqu'ils sont transplantés dans une niche de progéniteurs tardifs, ils peuvent alors générer les neurones des couches superficielles nés plus tard (pour revue, McConnell et Kaznowski, 1991). Les progéniteurs des couches superficielles ont un potentiel de plasticité plus faible (Mizutani et Saito, 2005) et ne sont capables de produire que des neurones des couches superficielles, même dans un environnement hôte jeune. A un certain moment du développement, le neurone entre dans sa division mitotique finale et initie sa migration.

Après la spécification, les précurseurs neuraux s'engagent, de manière irréversible, vers un phénotype neural (Wilson et Edlund, 2001). Plus tardivement, les précurseurs sortiront du cycle cellulaire et se différencieront en neurones ou cellules gliales.

4- Migration cellulaire

Les neurones corticaux naissent dans la VZ, ainsi, l'organisation laminaire corticale exige une migration précise de ces neurones vers la plaque corticale afin d'atteindre les couches corticales définitives (pour revue Ayala et al., 2007; Rakic, 2007).

Différentes études ont montré que les neurones corticaux adoptent soit une migration radiaire, soit une migration tangentielle. Les neurones corticaux pyramidaux, originaires du télencéphale dorsal utilisent une migration radiaire relativement directe. Deux principaux modes de migration radiaires ont été identifiés : la translocation somatique, utilisée aux stades précoces, et la locomotion (en association avec la glie radiaire) utilisée aux stades plus tardifs (Nadarajah et al., 2001; Borrell et Marin, 2006; Rakic, 2007).

Contrairement aux neurones de projection, la plupart des interneurones corticaux, originaires du télencéphale ventral, vont parcourir de longues distances pour atteindre le cortex cérébral (pour revue, Marín et Rubenstein, 2003; Métin et al., 2006). Ainsi, les précurseurs des interneurones vont s'engager dans 2 voies principales de migration tangentielle, la première dans la zone marginale corticale et la deuxième le long de la SVZ. Après avoir atteint le cortex, les interneurones adoptent une migration radiaire pour envahir les couches corticales et s'intégrer dans le circuit cortical. Des études récentes indiquent que les cellules endothéliales peuvent guider la migration tangentielle (pour revue, Won et al., 2013).

La migration, radiaire ou tangentielle, des neurones corticaux est contrôlée par de nombreux gènes. Une mutation de l'un de ces gènes peut induire une malformation cérébrale qui est généralement caractérisée par des troubles de migration neuronale et est souvent associée à un spectre de maladies neurologiques ou neuropsychiatriques (pour revue Guerrini et al., 2008 ; Guerrini et Parrini, 2010). Par exemple, une mutation du gène reeler, supprimant l'expression de la Reelin par les cellules de Cajal-Retzius (pour revue, Frotscher, 1997), entraîne une désorganisation histologique du néocortex portant principalement sur une inversion des couches corticales. Les couches s'organisent non pas suivant un mode normal « inside-out » mais selon un mode « outside-in » (Caviness Jr, 1982).

Le cortex cérébral est divisé en plusieurs aires distinctes, impliquées dans des fonctions spécifiques tel que les fonctions motrices, les fonctions sensorielles ou encore les fonctions cognitives. Durant ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement au système moteur.

5- Organisation anatomo-fonctionnelle du cortex moteur

Le cortex moteur joue un rôle central dans le comportement moteur des mammifères, le contrôle, la planification et l'exécution des commandes motrices volontaires. Il est situé dans le lobe frontal du cortex cérébral. Il est constitué du cortex moteur primaire (ou M1) et du cortex moteur secondaire (ou M2) formé par le cortex prémoteur (CPM) et l'aire motrice supplémentaire (AMS). Le cortex moteur respecte une organisation somatotopique anatomique et fonctionnelle précise.

La cartographie fonctionnelle du cortex moteur a été établie grâce à des techniques de microstimulation intracorticale (ICMS) permettant d'établir une relation entre la structure corticale stimulée et l'organisation fonctionnelle (Tennant et al., 2011). La stimulation électrique a été à l'origine du concept de la somatotopie (Penfield et Rasmussen, 1950). En effet, selon ce concept, chaque partie du corps est représentée sur le cortex moteur primaire telle une carte (Figure 5). Par la suite, plusieurs études ont été menées pour caractériser l'organisation du cortex moteur chez le chat (Asanuma et Sakata, 1967), les primates (Nudo et al., 1996), le rat (Neafsey et Sievert, 1982; Neafsey et al., 1986) et la souris (Li et Waters, 1991; Pronichev et Lenkov, 1998; Tennant et al., 2011). Ces études montrent une organisation générale similaire chez les différentes espèces. Le cortex moteur du rat comprend 5 zones bien décrites : rostral forelimb area (RFL), caudal forelimb area (CFL), hindlimb (HL), vibrissae motor-frontal eye field (V-FEF) et jaw, lips and tongue area (JLT). La RFL située à un niveau rostral, correspond au contrôle des muscles de la partie distale. La CFL, en position plus caudale, commande la musculature proximale. Ensuite, la HL, en position plus caudale correspond aux

mouvements des pattes postérieures. Entre les régions RFL et CFL se situent la zone V-FEF qui correspond aux mouvements des vibrisses et des paupières, ainsi que la zone JLT qui correspond aux mouvements de la mâchoire, des lèvres et de la langue (Neafsey et al., 1986; Neafsey, 1991).



Figure 5: Représentation somatotopique des muscles contrôlant différentes parties du corps suite à de faibles stimulations électriques dans le cortex moteur primaire humain selon l'Homunculus de Penfield et Rasmussen (1950).

Le cortex moteur est une structure hautement organisée. Des populations distinctes des neurones de projections sont situées dans les différentes couches corticales. Les neurones reçoivent des afférences en provenance de différents centres cérébraux et envoient réciproquement des efférences vers différents niveaux du cerveau et de la moelle épinière.

a- Efférences corticales

Les principaux systèmes de projections émis par les neurones pyramidaux manifestent une organisation topographique précise vers des cibles corticales ou sous corticales (Figure 6).

Les projections cortico-spinales, appelées également faisceau pyramidal, issues des neurones pyramidaux de la couche V, forment le faisceau moteur direct entre le cortex et la moelle épinière. Le faisceau pyramidal représente la principale efférence du cortex moteur s'étendant sur une grande distance. La majorité des axones traverse la ligne médiane. Ils subissent une décussation au croisement entre le bulbe rachidien et la moelle épinière, pour rejoindre la région dorso-latérale de la moelle controlatérale. Ils se terminent au niveau de la corne ventrale et de la zone intermédiaire de la substance grise de la moelle épinière où ils contactent les motoneurones spinaux ou les interneurones (Galea et Darian-Smith, 1997; Lacroix et al., 2004).

Les projections cortico-rubrales forment une voie de contrôle moteur auxiliaire de la voie cortico-spinale. C'est le principal faisceau moteur indirect entre le cortex moteur et la moelle épinière. Les neurones pyramidaux de la couche V émettent des projections majoritairement ipsilatérales vers les deux tiers rostro-médians du noyau rouge situé dans le mésencéphale. La voie rubrospinale intervient dans la motricité et la coordination des muscles distaux des pattes antérieures et postérieures (Song et Murakami, 1998).

Les neurones du cortex moteur émettent d'autres projections qui atteignent la moelle épinière comme la voie cortico-réticulo-spinale, impliquée dans le contrôle de la posture. Il existe notamment la voie cortico-vestibulo-spinal et la voie cortico-tecto-spinale qui sont en relation étroite avec les perceptions vestibulaires, visuelles et proprioceptives.

Les projections cortico-striatales contactent le striatum dorsolatéral et participent au contrôle et à l'exécution du mouvement. Les neurones corticostriataux sont présents majoritairement dans la couche Va (Oswald et al., 2013) mais sont également retrouvés dans les couches III et VI (Reiner et al., 2003). Plusieurs études montrent que les projections corticales vers le striatum suivent une organisation topographique (McGeorge et Faull, 1989; Ebrahimi et al., 1992). Ces projections sont essentiellement ipsilatérales, mais une certaine partie des fibres projette vers le striatum controlatéral (McGeorge et Faull, 1989). En outre, il semble que certaines fibres ipsilatérales soient des collatérales destinées à d'autres cibles sous-corticales (Reiner et al., 2010).

Les projections cortico-pontiques, émises par les neurones pyramidaux de la couche V, constituent des relais indirects entre le cortex et le cervelet. Elles participent ainsi au contrôle de la motricité, et également au maintien de la posture et à la coordination spatio-temporelle des mouvements.

Les projections cortico-thalamiques projettent vers le thalamus ipsilatéral (Oswald et al., 2013). Elles sont issues majoritairement des neurones de la couche VI et d'une faible population de neurones de la couche V innervant d'autres cibles sous-corticales du cortex. Ces projections exercent un contrôle inhibiteur sur le thalamus soit en ciblant des interneurones locaux, soit par l'intermédiaire des neurones GABAergiques du noyau réticulaire du thalamus.

Les projections cortico-corticales sont développées par les neurones pyramidaux des couches II/III mais également ceux de la partie supérieure de la couche V (Oswald et al., 2013) et la couche VI (Zhang et Deschênes, 1997). Elles se répartissent en deux catégories, les projections ipsilatérales au sein d'un même hémisphère et les projections controlatérales qui contactent l'hémisphère homologue controlatéral via le corps calleux.

b- Afférences corticales

Le cortex est la cible de nombreuses afférences provenant des hémisphères ipsi et controlatéral des autres aires corticales (afférences cortico-corticales) ainsi que des afférences d'origine thalamique et hypothalamique. Il reçoit notamment des afférences i) dopaminergiques de la substance noire (pour revue, Björklund et Dunnett, 2007) et de l'aire tegmentale ventrale, ii) sérotoninergiques des noyaux du raphé, iii) cholinergiques du noyau basal de Meynert, et iv) noradrénergiques du locus cœruleus (Lin et al., 1990; Zilles et Wree, 1995 ; Björklund et Dunnett, 2007).



b Corticofugal; corticothalamic neurons



c Corticofugal; subcerebral projection neurons



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 6: Représentation schématique des principales efférences du cortex moteur. (a) Les neurones pyramidaux de petite et moyenne taille des couches II/III, V et VI émettent des projections qui traversent le corps calleux vers le cortex controlatéral (en noir), vers le cortex controlatéral ou le striatum ipsilatéral ou controlatéral (en bleu), et vers le cortex controlatéral ou le cortex ipsilatéral frontal (en vert). (b) Les neurones pyramidaux de la couche VI, et minoritairement de la couche V. envoient des projections vers les noyaux thalamiques. (c) Les grands neurones pyramidaux de la couche V émettent des projections vers le tectum dont les collatérales ciblent le pont (en orange), vers les noyaux du pont (en rose), et vers la moelle épinière dont les collatérales ciblent le striatum, le noyau rouge, le pont et la médulla (en violet). CC, corps calleux ; Str, striatum ; Th, thalamus ; Po, pont ; OB, bulbe olfactif ; Crb, cervelet ; SC, moelle épinière. (D'après Molyneaux et al., 2007).

C. Lésion du cortex moteur

La perte de neurones est une caractéristique commune à de nombreuses conditions neuropathologiques telles que les lésions (traumatisme, accident vasculaire cérébral) ou les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique, maladies d'Huntington, d'Alzheimer...). L'étude des lésions du cortex moteur primaire a montré son rôle déterminant dans l'exécution des fonctions motrices. De nombreuses études ont montré, après la lésion du cortex moteur, un certain niveau de récupération fonctionnelle spontanée (pour revue, Darling et al., 2011). Cependant cette récupération reste limitée. Afin de pallier aux capacités de régénération limitées, il est nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques.

Les modèles animaux restent une source fondamentale d'informations pour l'étude des lésions corticales ainsi que des stratégies réparatrices. Il existe plusieurs modèles animaux de lésion corticale, tels que :

- Les modèles de lésion par percussion fluide (O'Connor et al., 2011) dont le principe est d'appliquer un pulse de pression au système cérébral via le contact avec un milieu fluide.
- Les modèles de lésion cérébrale traumatique (TBI, Traumatic Brain Injury) comme l'impact cortical contrôlé (CCI, Controlled Cortical Impact). Il s'agit d'un poids rigide qui, par un système d'air pressurisé, va exercer une force physique externe sur le cerveau (Edward Dixon et al., 1991). Ces modèles produisent des déficiences motrices et cognitives dans le cerveau.
- Les modèles d'ischémie partielle ou complète, dont le principe est d'induire une diminution de l'apport sanguin à une ou plusieurs régions, ou à l'ensemble du cerveau (pour revue, Liu et McCullough, 2011). Chez la plupart des mammifères, l'obstruction de l'artère cérébrale moyenne entraine une lésion au niveau du cortex moteur.

- Les modèles neurotoxiques, basés sur l'administration d'un composé neurotoxique tel que l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) ou l'acide iboténique.
- Le modèle de lésion corticale par aspiration de toutes les couches du cortex sans atteindre le corps calleux. La lésion par aspiration provoque une destruction des corps cellulaires et des axones afférents et efférents. Ce modèle de lésion est le modèle utilisé dans notre étude en ciblant la zone du cortex moteur qui contrôle le mouvement des membres antérieurs.

Afin de réparer le cerveau lésé, différentes stratégies thérapeutiques ont été mises en place. Parmi elles, les thérapies cellulaires occupent une place importante et font l'objet de notre travail. Le principe est, soit de substituer les neurones dégénérés par une transplantation neuronale, il s'agit d'une source cellulaire exogène, ou mobiliser la migration des cellules souches endogènes présentes dans quelques régions précises du cerveau vers la région endommagée.

II. Réparation cérébrale par neurotransplantation

La neurotransplantation est considérée comme un outil de choix dans l'étude de certains aspects du développement de différentes régions cérébrales. Les approches thérapeutiques par transplantation cellulaire sont considérées comme une stratégie prometteuse pour remplacer les neurones dégénérés soit par des neurones corticaux embryonnaires ou par des cellules souches.

Dans un premier temps, nous effectuerons dans ce chapitre un rappel historique concernant la neurotransplantation, puis, nous présenterons les principales données obtenues à nos jours dans le domaine de la transplantation neuronale.

A. Rappels historiques

Le processus de transplantation de neurones pour réparer les lésions du cerveau n'est pas un concept si récent. En effet, à partir du 16ème siècle, le chirurgien français Ambroise Paré décrit la demande d'un patient de lui ouvrir le crâne, d'enlever son cerveau et de le remplacer par un autre (pour revue, Dunnet, 2010). En 1890, le travail de W. Gilman Thompson présente la première tentative scientifique de greffe de tissu du SNC, décrite dans son rapport « Successful brain grafting ». En effet, Thompson voulait savoir si du tissu cérébral greffé pouvait survivre après la greffe, ainsi il a réalisé des allogreffes de fragments de tissu cortical chez des chiens et des xénogreffes entre des chiens et des chats adultes. A cette époque, il existait peu de connaissances sur la réponse immunitaire et ses causes, et les techniques ne permettaient pas d'affirmer si le tissu observé 7 semaines après la transplantation provenait bien du donneur, ni s'il contenait des neurones, ou s'il correspondait plutôt à des débris de neurones et du tissu cicatriciel. Toutefois, ces expériences pionnières de greffes dans le SNC adulte apparurent comme encourageantes.

Vingt ans après les travaux de Thompson, en 1911, Tello réalisa la transplantation de portions de système nerveux périphérique dans le SNC. Ranson montra en 1914, que des ganglions spinaux, provenant de donneurs néonataux, pouvaient être greffés avec réussite dans le cortex cérébral de jeunes rats. Un peu plus tard, Dunn observa que du tissu néonatal de rats albinos était capable de survivre dans le SNC de rats nouveau-nés (Dunn, 1917). Ainsi elle aborda deux principes constitutifs: 1) la greffe doit être composée de tissu immature capable de survivre et de se développer après la transplantation, et 2) le greffon doit recevoir une vascularisation appropriée, facteur important pour la survie du transplant (Dunn, 1917). Par la suite, en 1940, Le Gros Clark reporta le succès de la première greffe de tissu néocortical (Clark, 1940). Il transplanta du tissu cortical embryonnaire obtenu à partir d'embryons de lapins (E15-20) dans le cortex frontal de lapins âgés de 6 semaines et observa la survie et la différenciation du tissu greffé.

Trente ans plus tard, les travaux de l'équipe de J. Altmann (1972) ont permis la mise en place de la technique d'injection de [³H] thymidine, employée pour marquer les cellules en prolifération dans le greffon (Das et Altman, 1971). En 1979, Björklund et ses collaborateurs ont montré que des neurones fœtaux transplantés peuvent développer des caractéristiques de maturité et de connexions avec le cerveau hôte (Bjorklund et Stenevi, 1979). En effet, il a été montré que les transplants améliorent significativement les déficits moteurs liés à la destruction de la substance noire induite expérimentalement par injection de 6-hydroxydopamine chez le rat adulte (Bjorklund et Stenevi, 1979; Perlow et al., 1979). Les premières transplantations réalisées en vue de pallier la maladie de Parkinson ont impliqué des greffons autologues surrénaliens (Backlund et al., 1985), mais les premiers résultats positifs ont été obtenus quelques années plus tard, grâce à la transplantation de tissu nigral fœtal chez des patients atteints de la maladie de Parkinson en observant des améliorations cliniques significatives (Lindvall et al., 1990).

A ce stade, les travaux scientifiques consacrés aux expériences de transplantation neuronale corticale se sont multipliés. Des études ont confirmé la survie du transplant sur de longues périodes ainsi que son développement. De ce fait, de nombreuses études se sont intéressées à la capacité de réparation offerte par le transplant sur le plan neuroanatomique ainsi que fonctionnel. Différentes techniques ont été utilisées afin d'étudier l'aspect fonctionnel du transplant comme l'analyse de l'activité métabolique de celui-ci par mesure de la consommation de 2-deoxylglucose (2-DG) (Sharp et Gonzalez, 1984; Ebrahimi-Gaillard et al., 1995). Des tests comportementaux également été mis en place afin d'évaluer la récupération fonctionnelle induite par le transplant (Plumet et al., 1990, Sandor et al., 1991). De plus, des études électrophysiologiques ont également permis de tester l'intégration fonctionnelle des transplants in vivo (activité unitaire spontanée ou en réponse à une stimulation) (Neafsey et al., 1989) ou in vitro (Santos-Torres et al., 2009) par la technique du patch clamp (consiste en l'enregistrement de courants ioniques transitant à travers la membrane cellulaire, permettant ainsi d'étudier l'excitabilité des neurones greffés).

Plusieurs sources de neurones peuvent être utilisées pour la transplantation, les neurones embryonnaires corticaux, les neurones corticaux dérivés de cellules souches ou les neurones corticaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites.

B. Transplantation de neurones embryonnaires corticaux

1- Chez le nouveau-né

Plusieurs études menées chez le nouveau-né ont montré que les neurones corticaux embryonnaires greffés dans le cortex frontal de rats nouveau-nés peuvent recevoir des afférences corticales et sous-corticales du receveur (Castro et al., 1988) et surtout émettre des projections spécifiques vers la majorité des cibles du cortex frontal (Chang et al., 1984; Plumet et al., 1991 ; Frappé et al., 1999; Pinaudeau et al., 2000).

La visualisation des connexions entre l'hôte et le transplant a pu être réalisée grâce à l'injection intra cérébrale de traceurs rétrogrades ou antérogrades. En 1985, Castro et ses collaborateurs réalisent des prélèvements de fragments de tissu cortical sur des embryons âgés de 15 à 17 jours, qu'ils greffent chez 15 rats nouveau-nés (à P0-P1, soit le jour ou le lendemain de la naissance) dont le cortex moteur a été préalablement lésé par aspiration pour environ la moitié des cas. Deux à six mois plus tard, ils réalisent des injections de 2 traceurs fluorescents rétrogrades différents. Le premier traceur, Fast Blue (FB), est injecté dans le cortex controlatéral au transplant, et le deuxième traceur, Diamidino Yellow (DY) est injecté dans le thalamus ipsilatéral au site de transplantation. Castro observa des projections cortico-corticales callosales, émises par le transplant sur la totalité des cas où la transplantation a été précédée d'une lésion. En comparaison, les neurones de projections callosales ont été retrouvés dans 3 cas sur 8 ayant reçus une transplantation sans lésion. De plus, le nombre de fibres émanant des transplants était moins important dans les cas de transplantation sans lésion. De ce fait, il semblerait que certaines conditions puissent influencer le développement du transplant ainsi que les projections développées par les neurones transplantées. Enfin, des projections dirigées vers le thalamus ont également été mises en évidence, sans différence quantitative entre les animaux avec ou sans lésion.

Plusieurs études montrent l'existence de projections entre les neurones transplantés et le thalamus (Castro et al., 1985; Plumet et al., 1991), le striatum (Chang et al., 1984; Plumet et al., 1991) ou la moelle épinière (Floeter et Jones, 1984). Sørensen et ses collaborateurs (1992) confirment que la plupart des projections établies par les neurones transplantés respectent une topographie corticale et sont dirigées vers les cibles appropriées de l'hôte. Il précise cependant que la densité des projections du transplant est plus faible que les projections du cortex intact. De la même façon, un certain nombre d'études a mis en évidence des projections, également thalamiques et corticales, émises par l'hôte vers le transplant (Chang et al., 1986; Frappé et al., 1999).

Ainsi, il est clairement établi que les neurones embryonnaires transplantés en position homotopique dans le cortex de receveurs nouveau-nés développent des connexions réciproques avec l'hôte en respectant l'organisation topographique retrouvée dans le cortex intact. Certains travaux ont étudié les projections efférentes et afférentes développées par des neurones embryonnaires corticaux greffés de façon hétérotopiques dans le cortex de receveurs nouveau-nés.

En 1985, Stanfield et O'Leary ont utilisé la stratégie de transplantation hétérotopique pour montrer que les efférences développées par les neurones transplantés dépendent du site cortical dans lequel les neurones sont greffés. Un an plus tard, Chang prélève des fragments de neurones corticaux embryonnaires du cortex occipital ou frontal des embryons à E15 qu'il transplante dans le cortex occipito-pariétal de rats nouveau-nés (Chang et al., 1986). Il observe que les transplants, homotopiques ou hétérotopiques, reçoivent des projections des noyaux thalamiques qui innervent normalement le cortex occipito-pariétal. De plus, il constate que les cellules présentes au sein du greffon présentent une organisation laminaire. Ainsi, ces travaux révèlent que les afférences reçues par le transplant dépendent de l'environnement dans lequel les cellules greffées se développent ; néanmoins, l'organisation laminaire du greffon semble être une propriété intrinsèque des cellules transplantées. Par la suite, les résultats de Chang ont été contredits. Cependant, certaines études ont souligné l'influence importante des facteurs intrinsèques et extrinsèques sur la distribution topographique corticale. Les travaux réalisés par Ebrahimi-Gaillard (Ebrahimi-Gaillard et al., 1994; Gaillard et al., 1998) ont montré que des neurones embryonnaires, d'origine occipitale, transplantés en position homotopique ou hétérotopique dans le cortex frontal de rats nouveau-nés, développent des projections efférentes et afférentes (Frappé et al., 1999) en direction de cibles corticales et sous-corticales du cortex occipital, c'est-à-dire, les cibles correspondant à leur région d'origine. Ces résultats suggèrent que les neurones embryonnaires greffés conservent les propriétés de développement de leur site d'origine, de ce fait, l'origine des neurones embryonnaires semble être un facteur primordial à la mise en place des connexions neuronales en développement. En effet, le stade de développement du tissu embryonnaire avant la greffe semble être un élément décisif à la différenciation de ce tissu après la transplantation. Dans les cas où le tissu embryonnaire est prélevé aux stades avancés du développement cortical, les précurseurs neuronaux sont engagés irréversiblement dans la voie de différenciation de leur position initiale. Par contre, dans les cas où le tissu embryonnaire est prélevé avant la dernière division mitotique et transplanté de manière hétérotopique, les progéniteurs présents dans le tissu transplanté sont capables d'être influencés par leur nouvel environnement et d'acquérir un phénotype correspondant à celui-ci (Pinaudeau et al., 2000; Gaillard et al., 2003).

Ensemble, ces résultats montrent que, d'un point de vue anatomique, les cellules embryonnaires corticales transplantées dans le cortex d'un receveur nouveau-né peuvent s'intégrer, survivre et remplacer les voies lésées. Des investigations ont été menées pour étudier la capacité fonctionnelle des transplants à atténuer les déficits induits par les lésions. Les travaux de Plumet, en 1990 et 1991, montrent que la transplantation du tissu embryonnaire cortical (E16) immédiatement après la lésion induit une réduction de la déficience motrice chez le receveur (Plumet et al., 1990; 1991). Dans ces études, Plumet et ses collaborateurs utilisent 3 groupes de rats : des rats contrôles, des rats lésés et des rats transplantés immédiatement après la lésion. Le groupe greffé présentait un pourcentage plus faible de déficit moteur en comparaison au groupe lésé. Sandor a également effectué une transplantation de neurones corticaux fœtaux (E17-E18) dans la cavité lésionnelle unilatérale dans le cortex moteur de rat nouveau-né (Sandor et al., 1991). A l'âge adulte, la motricité du membre antérieur controlatéral au site de lésion est évaluée par un test comportemental. L'ablation du transplant a abouti à une détérioration des performances motrices qui ressemble à celle induite après une lésion corticale. Ces effets observés suggèrent que ces transplants fonctionnent de façon analogue à ceux du cortex normal. Ensemble, les résultats des tests comportementaux montrent que la transplantation semble favoriser la récupération des capacités motrices chez le nouveauné.

Après la transplantation homotopique de tissu cortical frontal embryonnaire (E14-E16) chez le rat nouveau-né, Neafsey et ses collaborateurs réalisent, par électrophysiologie, l'enregistrement de l'activité unitaire des transplants. Les cellules dans le transplant et le cortex normal ont répondu à la stimulation du noyau thalamique ventrale et la stimulation sensorielle périphérique. Ces données montrent que des connexions fonctionnelles de l'hôte se sont établies vers le transplant fœtal (Neafsey et al., 1989). Enfin, l'intégration fonctionnelle du transplant peut être évaluée par des mesures de métabolisme. La technique du 2-désoxyglucose a été utilisée pour étudier l'activité métabolique du transplant embryonnaire greffé dans le cortex préalablement lésé de rats nouveau-né (Ebrahimi-Gaillard et al., 1995). Ensemble, ces résultats suggèrent que les neurones embryonnaires corticaux peuvent remplacer les voies lésées chez le nouveau-né.

2- <u>Chez l'adulte</u>

Pendant plusieurs années, le SNC adulte a été considéré comme un environnement où le potentiel de régénération axonale était limité et où les phénomènes de plasticité et de neurogènes étaient considérés comme inexistant (Azmitia et Björklund, 1987). L'absence de la régénération axonale en cas de lésion chez l'adulte est attribuée à la présence de facteurs inhibiteurs qui rendent le SNC peu permissif à la repousse axonale (pour revue, Wang et al., 2012), tels que les protéines myéliniques Nogo-A, MAG (myelin-associated glycoprotein) et OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) (pour revue, Lee et Zheng, 2012). En conditions physiologiques, ces facteurs jouent un rôle important dans le cerveau et la moelle épinière. Ils régulent la formation de la myéline et l'interaction axone-myéline (pour revue, Baldwin et Giger, 2015) en maintenant un équilibre avec les facteurs de croissance, comme le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). Une autre source importante de la barrière de la régénération axonale est la cicatrisation gliale induite après la lésion (Davies et al., 1997). En effet, suite à une lésion, la réaction gliale entraîne le recrutement de la microglie, des oligodendrocytes et des astrocytes au niveau du site de la lésion (pour revue, Yiu et He, 2006). Cette réaction pourrait, d'une part, avoir des effets bénéfiques, comme i) isoler le site lésionnel, ii) minimiser la surface de l'inflammation et iii) limiter la dégénérescence cellulaire. D'autre part, il est à noter que de nombreux astrocytes adoptent un phénotype réactif et libèrent des molécules inhibitrices, des chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) engendrant un gradient inhibiteur pour la régénération axonale (Davies et al., 1999; pour revue, Yiu et He, 2006; Cregg et al., 2014).

Chez l'animal adulte, Plumet et ses collaborateurs ont réalisé des tests de préhension de nourriture après transplantation homotypique de cortex sensorimoteur embryonnaire (E16) dans la cavité lésionnelle. Dès la neuvième semaine posttransplantation, ils observent une amélioration des performances motrices de la patte antérieure chez les animaux transplantés en comparaison des animaux lésés sans cependant atteindre les niveaux des animaux intactes. Ceci suggère que la transplantation du tissu fœtal induit une récupération fonctionnelle partielle des mouvements fins des pattes antérieures chez le rat adulte (Plumet et al., 1993). De même, Riolobos décrit, après transplantation du tissu embryonnaire cortical (E17), dans le cortex frontal lésé de rats adultes (âgé de 2 mois et demi), des améliorations fonctionnelles similaires à celles obtenues par Plumet lors de l'utilisation du même test (Riolobos et al., 2001). Dans d'autres études, les cellules transplantées présentent une activité métabolique et une organisation topographique des projections corticales dans le cortex de l'hôte (Grabowski et al., 1993; Ebrahimi-Gaillard et al., 1995; Gaillard et al., 1998).

Circata et ses collaborateurs ont réalisé, en 1992, des transplantations de tissu cortical embryonnaire (E17) dans le cortex moteur lésé de rats adultes. Une étude comportementale a permis de mettre en évidence, chez les animaux transplantés, une récupération fonctionnelle de leurs performances motrices, en comparaison des animaux lésés. Toutefois, la corrélation entre ces observations et les résultats de l'étude anatomique des projections établies entre l'hôte et le transplant n'étaient pas aussi convaincante (Cicirata et al., 1992). En absence de projections notables, l'effet bénéfique des transplants a été attribué à la présence de facteurs trophiques issus du tissu embryonnaire d'origine augmentant l'activité fonctionnelle du cortex adjacent. D'autres auteurs ont démontré une reconstruction partielle des voies lésées chez l'adulte puisque le transplant émet peu de projections vers le tissu hôte et dont les cibles sont rarement éloignées du cortex (Roger et Ebrahimi-Gaillard, 1994; Guitet et al., 1994; Grabowsi et al., 1995).

Bien que l'évaluation du transplant et la reconstruction des voies lésées fût auparavant possible par l'injection de traceurs rétrogrades ou antérogrades, l'utilisation de cette technique compte également de nombreuses limites. En particulier, pour empêcher la fuite du traceur hors du site d'injection, une faible quantité de traceurs est injectée dans la région d'intérêt ne permettant de mettre en évidence qu'une faible partie du système de projection. Au cours des dernières années, les techniques de traçage ont été remplacées par la génération de souris génétiquement modifiées exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein). La transplantation de fragments de tissus embryonnaires issus de souris GFP sous le contrôle du promoteur de la β -actine a alors permis de distinguer le transplant de l'hôte et de visualiser la totalité des projections des neurones transplantés vers leurs cibles (Gaillard et al., 2004).

En 2007, Gaillard et collaborateurs ont réalisé une lésion par aspiration au niveau du cortex moteur de souris adultes et transplanté immédiatement après la lésion un fragment du tissu cortical embryonnaire d'origine moteur prélevé chez des embryons à E14 exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la β -actine. Plusieurs semaines après la transplantation, ils ont constaté la présence de projections émises par les neurones transplantés vers les cibles corticales et sous-corticales appropriées de l'hôte, y compris sur de longues distances, jusqu'au striatum ou à la moelle épinière en respectant une organisation topographique similaire à celle du cortex moteur intacte (Gaillard et al., 2007). En outre, une partie des efférences du transplant sont myélinisées indiquant l'intégration et la maturation des neurones transplantés. Les neurones de l'hôte établissent également des contacts synaptiques avec le transplant. Ainsi, grâce à cette approche expérimentale, Gaillard et collaborateurs ont mis en évidence la permissivité du SNC adulte à la repousse axonale des neurones embryonnaires greffés et la capacité de reconstruire point-à-point des voies motrices lésées chez l'adulte (Figure 7).

Ces résultats ont par la suite été confirmés. Toutefois, bien que certains travaux aient mis en évidence, après transplantation de précurseurs embryonnaires corticaux chez la souris adulte non lésée, la présence de projections sur de longues distances vers les cibles appropriées du cortex, la présence de projections ectopiques pouvant induire des dysfonctionnements ont également été révélées (Magavi et Lois, 2008). L'absence d'une lésion avant la transplantation pourrait expliquer ces résultats. En effet, il a été démontré que les neurones greffés émettent des projections qui empruntent les voies en dégénérescence (Gaillard et Jaber, 2008). Cette possibilité de reconstruction des voies lésées adultes par greffe de cellules embryonnaires n'est pas propre au cortex moteur. En outre, des études supplémentaires ont rapporté dans un modèle animal de la maladie de Parkinson, une reconstruction de la voie nigrostriée par la transplantation de neurones dopaminergiques embryonnaires issus du mésencéphale ventral dans la substance noire (Thompson et al., 2009; Gaillard et al., 2009; Barker et al., 2013). En effet, la réparation anatomique et fonctionnelle de la voie nigrostriée suggère la présence de facteurs de guidage spécifiques dans le cerveau adulte et leur capacité d'orienter les axones des cellules embryonnaires transplantées vers leurs cibles spécifiques chez l'hôte (Gaillard et al., 2009; Thompson et al., 2009, pour revue Gaillard et Jaber, 2011).



Figure 7: Reconstruction anatomique des voies lésées après transplantation de fragment de cortex moteur embryonnaire dans le cortex moteur lésé chez la souris adulte. Mise en évidence en microscopie électronique des contacts synaptiques établis entre l'hôte et les
neurones GFP transplantés au niveau du cortex (A), du thalamus (E) et de la capsule interne (F); plusieurs axones sont myélinisés. (B) L'absence d'une fusion cellulaire entre les cellules transplantées (bleu) et les cellules de l'hôte contenant le chromosome Y (rose). (C), (D) Les axones GFP+ quittent le transplant et innervent le cortex adjacent ainsi que le striatum. (G) Les axones GFP+ contactent des cibles sur de longues distances. Les cellules marquées par un traceur rétrograde injecté dans la moelle épinière sont présentes dans le transplant (jaune) et dans le cortex moteur adjacent (rouge). (D'après Gaillard et al., 2007).

3- Caractéristiques histologiques des transplants

L'ensemble des études décrites dans les parties précédentes souligne la capacité des neurones transplantés à développer des projections suivant une organisation topographique similaire à celle observée chez l'animal intact. Cependant, la question concernant la capacité du transplant embryonnaire à se développer en respectant l'organisation laminaire observée dans le cortex « normal » a été largement débattue.

Parmi les premières descriptions cytoarchitecturales détaillées du tissu greffé, Chang et son équipe constatent que lorsque les blocs de tissu cortical sont greffés en inversant leur orientation dorso-ventrale, le greffon développe une organisation laminaire inversée par rapport au cortex « normal ». Ils concluent alors que l'organisation laminaire de certaines régions du transplant est conservée par rapport au cortex « normal » et semble intrinsèque au transplant (Chang et al., 1986). Cependant, de nombreux travaux mettent en avant l'absence d'organisation laminaire des neurones corticaux au sein des transplants. Les neurones corticaux se présentent souvent sous forme diffuse ou organisée en bandes ou en amas (rosettes, clusters), séparés par des espaces comportant des faisceaux de fibres (Castro et al., 1985; Plumet et al., 1990; Garnier et al., 1995; Pinaudeau et al., 2000; Gaillard et Roger, 2000; Santos-Torres et al., 2009).

L'efficacité de la transplantation corticale embryonnaire à réparer le SNC lésé dépend donc du degré de survie du transplant, de sa capacité à restaurer les projections spécifiques et à se différencier selon le phénotype neuronal approprié. La présence, dans le transplant, de cellules pyramidales, non-pyramidales et gliales a été démontrée à partir des années 80 (Floeter et Jones, 1984; Belichenko et al., 2001). Par ailleurs, des études électrophysiologiques ont démontré que le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le transplant (Santos-Torres et al., 2009). En parallèle, des études immunohistochimiques ont également montré la présence de neurones de type GABAergique (Bragin et al., 1991) ainsi que de récepteurs glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques (Santos-Torres et al., 2009). Ces données penchent en faveur d'un phénotype cellulaire conforme à celui du cortex normal.

Nous avons effectué une étude précise du développement des cellules transplantées afin d'étudier la mise en place des différentes populations neuronales dans le temps ainsi que le développement des projections de neurones greffés vers leurs cibles corticales et sous corticales. Ces résultats seront présentés ultérieurement dans ce mémoire.

4- Facteurs influençant le développement des neurones transplantés

Plusieurs facteurs influencent la survie et le développement des cellules greffées. Il est donc nécessaire de définir les conditions expérimentales optimales à la survie du transplant dans le cerveau hôte et le potentiel thérapeutique de la neurotransplantation.

• Age du donneur et du receveur

Durant de nombreuses années, l'âge du donneur et du receveur a été le principal facteur mis en cause dans les expériences de transplantation. Nous avons présenté précédemment que les neurones post-mitotiques sont engagés irréversiblement dans une voie de différenciation adéquate. Lors de la transplantation, le devenir de ces neurones ne sera donc plus influencé par les facteurs présents dans l'environnement où ils seront greffés.

Das et ses collaborateurs ont déterminé chez le rat, une fenêtre de temps optimale (entre E14 et E15) durant laquelle les neurones corticaux de projection présentent un pic de neurogenèse (Das et al., 1980). Ainsi, le prélèvement de tissu provenant d'un embryon de cet âge présente les meilleures conditions de survie et de développement pour la transplantation (Dunnett et Björklund, 1994). Concernant l'âge de receveur, Hallas et ses collaborateurs ont montré en 1980, que plus le cerveau receveur est jeune, plus le développement du transplant et de ses projections est favorisé. La plupart des équipes de recherche ont donc privilégié l'utilisation de receveurs nouveau-nés ou jeune-adultes (Chang et al., 1984). Plus tard, des études ont constaté que suite à la transplantation de tissu embryonnaire occipital (E15-16) dans le cortex visuel de rats adultes, le transplant était capable de i) répondre aux stimulations visuelles, ii) recevoir des projections afférentes du cortex et du thalamus de l'hôte et iii) développer des projections corticales (Gaillard et al., 2004 ; 1998). Cependant un nombre limité de travaux s'est intéressé à étudier les niveaux de survie, de croissance et de récupération anatomique et fonctionnelle des transplants dans le cerveau âgé (Eriksdotter-Nilsson et Olson, 1989; Collier et al., 1999; Zaman et Shetty, 2002).

• Présence ou absence d'une lésion

Les résultats de Castro, détaillés auparavant, montrent que la présence d'une cavité lésionnelle avant la transplantation semble favoriser l'intégration du transplant, sa croissance et le développement de ses connexions chez le nouveau-né (Castro et al., 1985). Ces résultats ont été reproduits partiellement chez l'animal adulte (Gibbs et Cotman, 1987) et ont été confirmés plus récemment chez la souris adulte (Gaillard et al., 2007). La transplantation de neurones corticaux embryonnaires dans le cortex non lésé ne favorise pas le développement des projections des neurones transplantés. En effet, les axones émanant des neurones du transplant semblent être guidés vers les cibles corticales en empruntant les voies dégénérées suite à la lésion. Dans cette même étude, Gaillard et Jaber ont constaté, dans le cas d'une lésion suivie d'une transplantation, que les astrocytes de l'hôte conservent une capacité de réexpression de facteurs de développement suffisant pour diriger la croissance axonale du transplant. De façon similaire, une précédente étude a démontré que ces astrocytes conservent leur capacité à réexprimer un phénotype précoce pouvant partiellement être à la base de la migration active des neurones transplantés et des précurseurs neuronaux (Leavitt et al., 1999).

• La neuroinflammation

Le cerveau est considéré comme un site privilégié d'un point de vue immunologique. En effet plusieurs études ont montré que les greffes d'origine cérébrale survivaient relativement bien (Bjorklund et al., 1982). Cependant, une réaction inflammatoire survient suite à toutes lésions ou entrée d'un agent infectieux (pour revue, Perry et al., 1997). De nombreuses études se sont intéressées à la neuroinflammation, pour son rôle aussi bien délétère que bénéfique sur les neurones (pour revue, Block et al., 2007). Nous détaillerons ultérieurement le phénomène de la neuroinflammation parce qu'il fait l'objet de la deuxième étude menée dans ce projet.

• La vascularisation du transplant

L'importance de la vascularisation pour la survie du transplant a été soulignée très tôt par Dunn en 1917. La vascularisation intrinsèque du transplant et la néovascularisation développée à partir du cerveau hôte assurent l'apport de nutriments et d'oxygène au transplant. Plusieurs auteurs ont montré que la survie des neurones transplantés peut être améliorée si les transplants sont greffés dans des zones fortement vascularisées telles que le plexus choroïde ou la chambre antérieure de l'œil (Olson et al., 1982; Stenevi et al., 1976). De plus, certaines études ont suggéré que la présence d'un délai entre la lésion et la transplantation induit le développement de vaisseaux sanguins et la libération de facteurs neurotrophiques favorisant la survie des cellules greffées (Johansson et Grabowski, 1994; Dray et al., 2009). Les phénomènes de néovascularisation sont induits par des facteurs comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et les angiopoïétines (pour revue, Xiong et al., 2010). En effet, il a été démontré que le fait de surexprimer le VEGF au sein des cellules transplantées dans un modèle de la maladie de Parkinson, permet de favoriser le développement et la survie des neurones dopaminergiques greffés (Casper et al., 2002; Lee et al., 2007).

• Les facteurs trophiques

Les neurones, les cellules immunitaires et les cellules gliales libèrent, après la lésion, des facteurs trophiques favorisant la réparation des voies lésées. De plus, les cellules transplantées peuvent sécréter ou promouvoir la sécrétion de facteurs neurotrophiques par les cellules de l'hôte (Dunnett et al., 1987). Parmi les facteurs libérés autour de la lésion, le NGF (nerve growth factor) (Hotta et al., 2005) et le BDNF ont été reportés. Il existe d'autres familles de facteurs de croissance dont les niveaux d'expression sont augmentés après une lésion corticale comme le Fibriblast Growth Factor (FGF), le VEGF (Nieto-Sampedro et al., 1988; Sköld et al., 2005) et le Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Wang et al., 1997).

Lee et collaborateurs ont réalisé une série de transplantations de cellules souches humaines (hNSCs) dans le cortex après lésion ischémique (Lee et al., 2007; Lee et al., 2009; Lee et al., 2010). Dans chacune des études, les hNSCs surexpriment le GDNF, le VEGF ou le BDNF. Ces travaux ont révélé que la survie des cellules transplantées et les améliorations fonctionnelles qu'elles induisent étaient plus importantes par rapport aux hNSCs qui ne surexpriment pas ces facteurs. Ainsi, la combinaison entre la transplantation et l'administration de facteurs trophiques semble avoir un effet bénéfique sur la survie des cellules greffées.

• Délai entre la lésion et la transplantation

Dans le cadre de lésion traumatique chez l'Homme, la disponibilité du greffon et la réalisation d'une greffe immédiatement après la lésion n'est pas toujours possible. De ce fait, il est important d'explorer l'importance d'un délai entre la lésion et la transplantation pour que la transplantation neuronale soit considérée comme une thérapie possible.

De plus, l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation corticale serai un facteur crucial favorisant la survie et le développement du transplant (Nieto-Sampedro et al., 1983; Stein et al., 1988 ; Grabowski et al., 1994). Les résultats de Stein et al., en 1988, montrent qu'un délai de 30 ou 60 jours entre la lésion et la transplantation corticale n'a aucun effet sur la récupération fonctionnelle, en revanche, une amélioration de cette dernière est observée lorsque la transplantation est réalisée 7 ou 14 jours après la lésion (Stein et al., 1988). Ainsi, ces résultats mettent en avant les avantages de l'introduction d'un délai court entre la lésion et la transplantation. En effet, dans un modèle de greffe de tissu embryonnaire striatal dans le cortex entorhinal, il a été montré

qu'un délai de 9 jours semble être optimal pour la survie du transplant. Ceci coïncide avec le pic de libération de facteurs neurotrophiques par les astrocytes autour de la lésion (Nieto-Sampedro et al., 1983). Cependant, Grabowski rapporte un effet bénéfique avec des délais de 5-7 jours ou de 8 semaines et les conditions seraient les plus favorables avec un délai de 3 semaines après une lésion ischémique (Grabowski et al., 1994).

Afin de choisir de facon optimale le moment le plus approprié pour effectuer la greffe après une lésion permettant de favoriser l'intégration de nouveaux neurones, nous avons effectué une étude pilote en introduisant des délais de 5, 7 ou 30 jours entre la lésion corticale et la transplantation. Nous avons montré que l'introduction d'un délai de 7 jours favorise la prolifération et le développement des projections de neurones greffés. Sur la base de ces résultats, une étude approfondie a été réalisée dont l'objectif était d'étudier l'influence d'un délai de 7 jours entre la lésion corticale et la transplantation sur le développement anatomique et fonctionnelle des neurones greffés. Suite à une lésion unilatérale par aspiration du cortex moteur, les transplantations homotopiques de tissu embryonnaire cortical, prélevé à E14 et sur-exprimant la GFP, sont effectuées soit immédiatement après la lésion (groupe sans délai) soit 7 jours plus tard (groupe avec délai). Les résultats montrent i) une augmentation significative du volume du transplant chez le groupe avec délai en comparaison du groupe sans délai, ii) l'augmentation du volume du transplant de par une forte augmentation de la prolifération des cellules transplantées. De même, 4 jours après la transplantation, une augmentation significative des vaisseaux sanguins a été observée chez le groupe délai, et une différence d'origine des vaisseaux a également été constatée. En effet, chez le groupe avec délai, les vaisseaux provenaient à la fois de la régénération des vaisseaux sanguins de l'hôte et du tissu transplanté ce qui n'était pas le cas pour le groupe sans délai. Aucune modification de la distribution des projections émises par les neurones transplantés n'a été observée entre les 2 groupes. Cependant, une augmentation importante de la densité des projections développées par les cellules transplantées vers toutes les cibles du cortex moteur a été soulignée en introduisant un délai entre la lésion et la transplantation. Au niveau fonctionnel, en utilisant un test de motricité fine des membres antérieurs, le « staircase », les résultats montrent un déficit des performances des pattes controlatérales au côté de la lésion chez les souris lésées en comparaison des souris contrôles pendant toute la durée du test de comportement. Les souris transplantées, avec ou sans délai, montrent une réduction de la performance du membre antérieur controlatéral suivie d'une récupération persistante. De plus, conformément aux effets anatomiques bénéfiques observés en introduisant un délai entre la lésion et la transplantation, les animaux transplantés avec délai montrent une amélioration de la récupération fonctionnelle.

Ensemble, ces données confirment que l'introduction d'un délai d'une semaine entre la lésion et la transplantation corticale est bénéfique d'un point de vue fonctionnel et aussi anatomique sur la croissance de la taille du transplant par la prolifération cellulaire, sur la vascularisation notamment en favorisant le développement des propres vaisseaux du transplant et sur le nombre de projections développées par les cellules transplantées.

Plusieurs facteurs peuvent être à la base des améliorations observées en introduisant un délai de 7 jours entre la lésion et la transplantation corticale, comme la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques (Sköld et al., 2005, Dray et al., 2009), la diminution des niveaux de toxines (Gonzalez et Sharp, 1987), la sécrétion des facteurs trophiques (Nieto-Sampedro et al., 1983) et le niveau de l'inflammation. Nous nous sommes alors intéressés à l'étude du rôle de l'inflammation qui fait l'objet de la deuxième étude présentée dans ce manuscrit.

Pour conclure, les lésions dans le cortex moteur chez le nouveau-né ou l'adulte, entraînent la mort cellulaire des neurones et la destruction de leurs projections induisant un dysfonctionnement moteur. La transplantation des neurones embryonnaires est potentiellement capable de remplacer les neurones perdus et de régénérer les projections corticales vers les cibles appropriées. Les cellules embryonnaires ont été utilisées dans des études cliniques, notamment chez des patients parkinsoniens, qui montrent un certain effet bénéfique de ces transplantations chez une partie des patients (pour revue, Björklund et al., 2003 ; Jaber et Gaillard, 2012). Il est peu probable que les neurones embryonnaires humains deviennent une source de cellules pour la transplantation en raison de problèmes d'approvisionnement et de standardisation de tissus pour la transplantation. L'avenir de ces greffes dépend donc de l'obtention de sources alternatives de tissus. De ce fait, les neurones dérivés des cellules souches ou des cellules pluripotentes induites (IPSCs pour «induced pluripotent stem cells») offrent une alternative prometteuse.

5- <u>Particularité de la transplantation des neurones dérivés des</u> <u>cellules souches</u>

La transplantation de neurones dérivant des cellules souches permet de surmonter les limites rencontrées en utilisant les cellules embryonnaires et se rapproche d'avantage d'une future utilisation en thérapie cellulaire.

En effet, les cellules souches sont caractérisées par leur capacité d'autorenouvèlement infinie. Les cellules souches embryonnaires (ESC pour Embryonic Stem Cell), dérivées de blastocystes, sont pluripotentes et sont donc capables de donner naissance à tous les types cellulaires, excepté les cellules germinales. Les cellules souches, organe ou tissu spécifique, représentent un autre groupe des cellules souches. Elles dérivent des ESCs (pour revue, Anderson et al., 2001) et sont multipotentes, c'est à dire capables de donner naissance à différents types cellulaires mais limitées à un lignage cellulaire donné. Ces dernières sont présentes durant la vie embryonnaire, mais également chez l'adulte (pour revue, Anderson et al., 2001). C'est le cas, par exemple, des cellules souches neurales pouvant se différencier en neurones ou en cellules gliales. Plus tard, les cellules souches pluripotentes (IPSC pour Induced Pluripotent Stem Cell) ont été produites à partir de cellules somatiques adultes en forçant l'expression de certains gènes de pluripotence (Takahashi et Yamanaka, 2006; Yu et al., 2008). Cependant, l'utilisation de ces cellules est toujours à un stade expérimental et certains obstacles majeurs doivent encore être maitrisés, comme leur tendance à former des tumeurs après inoculation à un stade trop précoce de différenciation.

Au cours des deux dernières décennies, plusieurs études ont réussi à générer, in vitro, différents sous-types de neurones corticaux à partir des cellules souches embryonnaires et induites (pour revue, Akhtar et Breunig, 2015). En effet, pour générer un sous-type neuronal spécifique, les cellules souches sont induites par différents signaux

de différenciation, obligatoirement fournis en quantité appropriée et dans une fenêtre temporelle adéquate. Ainsi, la différenciation des cellules souches en l'absence de facteurs exogènes entraine la génération de cellules neuronales d'identité antérieure (Watanabe et al., 2005, Gaspard et al., 2008).

En 2008, Gaspard et collaborateurs ont développé un protocole pour générer in vitro des neurones corticaux à partir de cellules souches embryonnaires de souris qui respectent les principales étapes de la corticogenèse et de la diversité neuronale corticale. Lors de la différenciation dans un milieu dépourvu de morphogènes, le signal Sonic Hedgehog (SHH) est inhibé afin d'obtenir une population homogène de progéniteurs neuronaux d'identité corticale. Ces neurones ont été greffés dans le cortex cérébral de souris nouveau nés, où ils développent des projections axonales similaires à celles des neurones corticaux et plus particulièrement vers des cibles du cortex visuel. Ces résultats montrent que l'identité d'une zone corticale peut être spécifiée sans aucune influence des facteurs de l'hôte (Gaspard et al., 2008; Gaspard et al., 2009a; Gaspard et al., 2009b). De même, l'exposition des cellules souches à des signaux tels que Wnt et BMP a un effet similaire, aboutissant à la génération de cellules d'identité corticale (Watanabe et al., 2005). Ainsi, l'exposition des cellules souches à des morphogènes tels que FGF-8 ou à leur antagoniste peut moduler l'identité rostro-caudale des cellules neuronales corticales générées in vitro (Eiraku et al., 2008). Ideguchi et collaborateurs en 2010, transplantent des précurseurs neuronaux corticaux dérivés de cellules souches embryonnaires de souris dans différentes régions du cortex, moteur et visuel. Ils constatent des projections émises par les cellules transplantées vers les cibles spécifiques des régions dans lesquelles elles étaient transplantées (Ideguchi et al., 2010). En ce qui concerne les neurones corticaux dérivés d'ESCs humaines, une étude a rapporté, après la transplantation de ces neurones dans le cerveau de la souris nouveau-née, le développement des projections axonales vers les cibles du cortex visuel et moteur et une intégration fonctionnelle du transplant (Espuny-Camacho et al., 2013).

Plus récemment, une étude a examiné la capacité des neurones corticaux dérivés de cellules souches embryonnaires de souris à contribuer à la réparation des lésions corticales chez des souris adultes (Michelsen et al., 2015). Les ESCs ont été différenciées

en neurones corticaux et progéniteurs d'identité occipitale et puis greffées dans le cortex visuel lésé de souris adultes. Les neurones greffés établissent des projections sur de longues distances correspondant aux circuits du cortex visuel. Ils reçoivent également des afférences du thalamus visuel et répondent d'une manière appropriée aux stimuli visuels de la rétine in vivo, révélant ainsi leur potentiel pour la restauration fonctionnelle des circuits du cortex visuel endommagés. En effet, conformément à ce qui avait été précédemment observé, aucune intégration significative n'a été observée après transplantation de ces mêmes neurones dans le cortex moteur lésé, ni même, après transplantation de neurones corticaux moteurs dans le cortex visuel lésé. Ces résultats montrent une spécificité régionale des aires corticales dans la réparation du cortex cérébral lésé par la transplantation des neurones corticaux dérivés d'ESCs.

Ensemble, ces résultats fournissent une nouvelle perspective pour la thérapie cellulaire dans la reconstruction spécifique des voies corticales lésées dans des modèles animaux de lésion corticale d'un point de vue neuroanatomique et fonctionnel. Mais l'utilisation des ESCs souffre également de certaines limites. D'une part, il existe une grande variabilité entre les lignées d'ESCs humaines dans leur capacité à générer du tissu neural (Osafune et al., 2008). D'autre part, les données concernant le développement des ESCs humaines sont encore restreintes. Si les grandes étapes, notamment précoces, du développement cérébral humain sont connues, nous manquons parfois de références auxquelles comparer le développement des neurones générés à partir des hESCs en laboratoire. Enfin, la dérivation des ESCs humaines dépend de la disponibilité de blastocystes humains surnuméraires ce qui peut engendrer des limites éthiques.

Jusqu'en 2006 et la découverte faite par Shinya Yamanaka sur la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes, les cellules ESC humaines représentaient la seule source de cellules souches pluripotentes (Takahashi et Yamanaka, 2006). Les cellules souches induites pluripotentes représentent potentiellement une source cellulaire inépuisable présentant les mêmes capacités de différentiation que les cellules ESC mais ne nécessitant pas la destruction d'un embryon. Cette découverte ouvre ainsi les portes de la médecine régénérative de demain avec la

possibilité i) de réaliser des IPS spécifiques d'un patient, ii) de les différencier en type cellulaire défaillant et ainsi iii) de greffer ces cellules en limitant les risques de rejet.

Les cellules IPS représentent donc un intérêt majeur, à la fois dans la mise en place de protocoles de thérapie cellulaire innovants mais également dans le cadre de recherches pharmacologiques in vitro. En effet, il a été démontré qu'il est possible de générer des neurones périphériques (Lee et al., 2009), des motoneurones (Dimos et al., 2008; Ebert et al., 2009), des cellules rétiniennes (Osakada et al., 2009), des neurones de la cochlée (Nishimura et al., 2009) ou encore des neurones dopaminergiques (Wernig et al., 2008; Hargus et al., 2010).

En ce qui concerne les neurones corticaux, quelques auteurs rapportent la possibilité de générer des cellules neuroépithéliales à partir d'IPSCs, et d'induire leur différenciation en neurones corticaux glutamatergiques (Zeng et al., 2010 ; Shi et al., 2012). Les IPSCs humaines sont capables, sans ajout de morphogènes, de se différencier et de générer une population de neurones corticaux en respectant les principales étapes de la corticogenèse (Espuny-Camacho et al., 2013).

Les vecteurs utilisés pour introduire les facteurs de reprogrammation dans les cellules adultes ont été initialement des vecteurs intégratifs rétroviraux (Takahashi et Yamanaka, 2006) et lentiviraux (Yu et al., 2008). Différentes études ont par la suite tenté de générer des lignées d'IPCS plus « sûres » en utilisant des vecteurs lentiviraux polycistroniques permettant l'expression des 4 facteurs de reprogrammation (Sommer et al., 2009). Récemment, des IPCS ont été générées en utilisant des protéines recombinantes (Zhou et al., 2008), ou encore en surexprimant certains types de microARNs (Judson et al., 2009). Enfin, la fonctionnalité des neurones dérivés d'IPSCs et la sécurité de leur utilisation, notamment du fait de leur potentiel tumorigène, doivent être évaluées avant d'envisager toute approche clinique.

III. Neuroinflammation

Les réactions neuroinflammatoires sont observées dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaque ainsi que dans des conditions neuropathologiques comme le traumatisme et les accidents cérébraux (pour revue, Amor et al., 2010; Amor et al., 2014). Cependant le rôle bénéfique ou délétère de la neuroinflammation est encore actuellement en discussion. Nous allons détailler dans un premier temps les différents médiateurs de la neuroinflammation et nous présenterons par la suite les principales données obtenues à ce jour dans le domaine de la neuroinflammation.

A. Le concept de la neuroinflammation

Le cerveau a longtemps été considéré comme un site immuno privilégié (Medawar, 1948). Il s'agit d'un organe particulier, protégé par la barrière hématoencéphalique (BHE), et dont les échanges neuroimmunologiques sont donc relativement limités de part et d'autre du cerveau intact (pour revue, Muldoon et al., 2013). En outre, le cerveau possède son propre système de défense, celui-ci se met rapidement en état d'alerte et une réaction inflammatoire est déclenchée suite à toute lésion ou entrée d'un agent infectieux. Les médiateurs cellulaires de l'inflammation répondent en libérant des cytokines, des chimiokines ou de l'oxyde nitrique.

En parallèle, la perturbation de la BHE va permettre aux cellules hématopoïétiques de quitter la circulation sanguine et d'être en contact avec le site de lésion. L'une des caractéristiques du SNC est l'absence d'un système de drainage lymphatique classique. Ainsi, les mécanismes régissant l'entrée et la sortie des cellules immunitaires du SNC sont mal connus. Cependant, une étude récente a mis en évidence la présence d'un système de vaisseaux lymphatiques classique et fonctionnel bordant le sinus veineux permettant le passage des cellules immunitaires (Louveau et al., 2015).

1- Immunité innée

L'immunité innée est la première barrière de défense observée dans le cerveau suite à toute agression, elle ne dépend pas d'une « mémoire immunitaire » et ne nécessite pas de contact préalable avec l'agent pathogène. Le principal type cellulaire de l'immunité innée du SNC est la microglie qui désigne les macrophages résidents dans le cerveau. Les cellules microgliales sont rapidement activées après une invasion et détruisent les organismes étrangers par phagocytose.

Les cellules locales du SNC, telles que la microglie et les astrocytes, développent une réponse innée impliquant des récepteurs cellulaires de la famille des Pattern Recognition Receptors (PRR). Parmi ces récepteurs se trouve le récepteur Toll-Like (TLR) qui se lie à des motifs moléculaires exprimés soit par des agents infectieux (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPS) soit par des tissus stressés et endommagés (Danger associated molecular patterns, DAMPS).

L'immunité innée implique également les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (DC) qui ne sont pas présentes dans le SNC sain. Elles peuvent être cependant retrouvées suite à la perturbation de la BHE par des signaux chimio-attractifs et expriment des molécules de surface indiquant leur état actif. En général, les macrophages et les neutrophiles accomplissent plusieurs fonctions telles que la destruction d'un corps étranger et la phagocytose des débris cellulaires. Les DCs sont phagocytaires et spécialisées dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes afin d'initier une réponse immunitaire adaptative impliquant la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps, garantissant une protection spécifique contre les agressions (pour revue, Moore et al., 2014).

2- Immunité acquise

L'immunité acquise est une réponse spécifique à un antigène par médiation soit cellulaire soit humorale visant à éliminer des facteurs pathogènes. La réponse humorale est médiée par les lymphocytes B qui libèrent des anticorps et la réponse cellulaire est quant à elle exécutée par les lymphocytes T cytotoxiques (Tc, CD8+) et auxiliaires (Th, CD4+).

Suite à une lésion au niveau du SNC, la microglie est activée entrainant d'une part l'expression de molécules de surface et d'autre part la libération de cytokines et de chimiokines. Ces changements induisent le recrutement des lymphocytes T qui traversent la BHE pour atteindre le site de lésion (Czigner et al., 2007; Dardiotis et al., 2012). Après avoir été présentés aux antigènes, les lymphocytes T (Th) peuvent avoir une réponse Th1 pro-inflammatoire et cytotoxique ou une réponse Th2 anti-inflammatoire et réparatrice.

B. Les médiateurs cellulaires de la neuroinflammation

Comme nous l'avons présenté dans la première partie de ce manuscrit, le SNC est un site complexe qui regroupe différents types cellulaires y compris ses propres cellules résidentes immuno-competentes. Ainsi en cas d'agression qu'elle soit d'origine traumatique, ischémique ou infectieuse, le SNC peut réagir soit par la mise en action des cellules gliales (astrocytes, microglie, oligodendrocytes) soit par l'intermédiaire d'une l'inflammation centrale pouvant s'accompagner d'une invasion de cellules immunitaires périphériques.

En conditions physiologiques, l'accès des cellules périphériques au SNC est étroitement contrôlé par la BHE. En revanche, lors d'une lésion traumatique associée à une rupture de la BHE, différents types cellulaires circulants peuvent migrer du sang vers le site de lésion. Ce processus est passe par l'intermédiaire des cytokines et des chimiokines (Schmidt et al., 2005). Les neutrophiles sont les premiers à traverser la BHE, suivis par les monocytes et les lymphocytes (Kato et Walz, 2000). Nous présenterons par la suite, les principaux médiateurs cellulaires de l'inflammation.

1- <u>La microglie</u>

Parmi les cellules gliales, la microglie immunocompétente constitue la forme résidente des macrophages du SNC. Les cellules microgliales ont été découvertes en 1932, par Del Rio Hortega et leur origine n'est toujours pas clairement établie à l'heure actuelle. Elles sont dispersées dans tout le SNC mais leur répartition n'est pas homogène dans toutes les régions du cerveau. En effet, chez la souris, il a été montré que la distribution de la microglie est plus dense dans la substance grise que dans la substance blanche (Block et al., 2007). Les cellules microgliales surveillent constamment le microenvironnement et répondent à tout type de changement, exerçant ainsi un rôle typique de macrophage. Pour détruire les corps étrangers ou les débris cellulaires, elles peuvent assurer une activité de phagocytose, sécréter des cytokines pro-inflammatoires et jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène (Xing et al., 2012). La microglie constitue donc la première ligne de défense du système immunitaire du SNC (Kreutzberg, 1996).

Lors du développement, et au cours de la maturation du SNC, les cellules microgliales amiboïdes participent au remodelage du tissu nerveux. Les cellules microgliales auraient une grande influence sur la survie neuronale en limitant la formation des neurones et des connexions surnuméraires (Marín-Teva et al., 2004). Elles permettent également d'éliminer les débris cellulaires issus de la formation des réseaux neuronaux (Ferrer et al., 1990) et de contrôler la synaptogenèse lors des premières semaines de vie postnatale (pour revue, Bessis et al., 2007).

Selon son état d'activation, dans le cerveau adulte on distingue deux principaux types de microglie : la microglie ramifiée et la microglie amiboïde (Figure 8). En l'absence de corps étrangers ou de débris cellulaires, les cellules microgliales sont dans un état de « repos » et elles ne sont pas dotées ni de capacité phagocytaire ni de profil migratoire (Chung et al., 2010). Elles sont de petite taille, composées d'un petit corps cellulaire avec de nombreux prolongements cytoplasmiques leur conférant une morphologie caractéristique ramifiée (Rezaie et al., 2002; Kettenmann et al., 2011). Cependant, les études actuelles montrent un état « actif » de la microglie ramifiée, si le corps cellulaire reste plus ou moins statique, les branches sont constamment en

mouvement afin de surveiller les zones environnantes (Davalos et al., 2005) et détecter des changements physiologiques tels que des changements de pH et la libération de neurotransmetteurs (Färber et Kettenmann, 2005). De nombreuses études d'imagerie in vivo se sont intéressées aux mouvements constants des ramifications (Nimmerjahn et al., 2005) ainsi qu'à la visualisation des contacts directs entre la microglie et les astrocytes, les neurones ou encore les vaisseaux notamment au niveau du cortex. Il a été observé que les contacts entre les synapses et la microglie ramifiée étaient transitoires en conditions physiologiques et pouvaient être plus longs (près d'une heure) en conditions ischémiques conduisant l'élimination des synapses non fonctionnelles (Wake et al., 2009). Le but de cet état est de maintenir un taux constant de cellules microgliales disponibles pour détecter et combattre l'agression, tout en maintenant un environnement immunologique quiescent (Kettenmann et al., 2013). D'un point de vue phénotypique, les cellules microgliales ramifiées se caractérisent par une expression faible du récepteur à la fraction iC3b du complément (CD11b), du marqueur leucocytaire CD45 et une absence d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH I ou II).

En situation de traumatisme, d'ischémie et de maladies neurodégénératives, la microglie est activée dans les minutes qui suivent, elle se différencie en microglie amiboïde (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). En plus, l'infiltration des monocytes et des macrophages périphériques à travers la BHE est observée (Vallières et Sawchenko, 2003; Ladeby et al., 2005b). Les changements morphologiques et phénotypiques des cellules microgliales sont sous le contrôle du microenvironnement du cerveau lésé ou malade et notamment de la présence ou non de signaux inflammatoires (pour revue, Biber et al., 2007). Cette transformation progressive inclue des formes intermédiaires de cellules microgliales, ainsi qu'un état hyper-ramifié (Streit et al., 1999). En situation inflammatoire une microglie «active» est caractérisée par la rétraction de ses branches, l'hypertrophie du corps cellulaire et adopte un morphotype amiboïde, proche de celui des macrophages facilitant sa migration vers le site de la lésion (Raivich, 2005). La migration chimiotactique rapide vers le site de lésion est induite par l'ATP, le glutamate et d'autres agents chimiotactiques libérés par les cellules endommagées (Davalos et al., 2005). Une fois activée, la microglie prolifère, phagocyte les débris

cellulaires suite à la mort neuronale, secrète des cytokines pro et/ou anti-inflammatoires, des chimiokines et des facteurs de croissance (Davalos et al., 2005; Xing et al., 2012). D'autre part, la microglie activée sécrète des molécules neurotoxiques diverses telles que le monoxyde d'azote, des protéases, des acides aminées toxiques ou encore des radicaux libres oxygénés (Kreutzberg, 1996). En outre, en fonction de son état d'activation, la microglie n'exprime pas les mêmes marqueurs de surface, signe de sa grande hétérogénéité phénotypique. Au contraire de la microglie quiescente, la microglie activée exprime des marqueurs de surface tels que les molécules CMH de classe I et II. Les cellules microgliales expriment les marqueurs phénotypiques de macrophages, tels que F4/80, CD11b, CD68, CD45 ainsi que le récepteur IBA1 (Kettenmann et al., 2011).

Les cellules amiboïdes activées agissent également comme des cellules présentatrices d'antigènes. Elles sont capables de phagocyter les pathogènes et d'afficher les immuno-molécules qui en résultent aux lymphocytes T pour générer une réponse immunitaire adaptative. La présence de l'antigène CMH classe I ou II exprimé par la microglie activée corrobore cette théorie. La microglie activée interagit également avec les astrocytes pour combattre l'infection le plus rapidement possible avec un minimum de dommages aux cellules environnantes du cerveau. Par conséquent, les cellules endommagées sont détruites par phagocytose et les cellules voisines sont protégées (Garden et Möller, 2006).

Il a été décrit que le niveau d'activation de la microglie pouvait varier en fonction du degré des lésions (Ladeby et al., 2005a) et que cette transformation morphologique est accompagnée d'une migration de cellules microgliales activées vers le site de lésion. En outre, il a également été démontré que la forte densité microgliale au niveau de la lésion pouvait résulter soit de la prolifération de la microglie résidente, soit de la migration des cellules microgliales environnantes, soit de l'infiltration de précurseurs microgliaux issus de la moelle osseuse (Ladeby et al., 2005b; pour revue, Ginhoux et al., 2013). Ce phénomène de migration vers la zone lésée intervient assez précocement et l'activation de la microglie peut prendre de quelques minutes à plusieurs heures selon le type de la lésion. En cas de lésion aiguë, la réponse microgliale atteint généralement son maximum 5 à 7 jours après lésion avant de disparaître progressivement 10 à 14 jours après la lésion (Ladeby et al., 2005b). En parallèle, dans le but d'établir un ensemble de données quantitatives de base sur la réaction des divers types de cellules gliales, Hampton et collaborateurs ont réalisé une incision de l'épaisseur totale du cortex et ont constaté une prolifération microgliale très proche de l'incision (moins de 0,3mm). Cette prolifération persiste pendant plus de 7 jours puis elle diminue au bout du 14^{ème} jour après la lésion (Hampton et al., 2004).



Figure 8: (a) La microglie résidente provient des macrophages de la vésicule ombilicale pour consister dans le parenchyme du SNC au cours du développement. (b) Au repos, la microglie surveille constamment son environnement grâce à ses ramifications mobiles. Les cellules microgliales peuvent faciliter le maintien des synapses (c) et la neurogenèse (d), elles sécrètent également des facteurs de croissance essentiels pour le fonctionnement normal du SNC (e). Suite à un signal de danger, les cellules microgliales rétractent leurs branches et acquièrent une forme ronde et amiboïde (f). Un phénotype neuroprotecteur peut être observé, la microglie élimine les débris cellulaires par phagocytose (g), sécrète des facteurs de croissance associés à la remyélinisation (h) et soutient la régénération (i). En revanche, dans le cas d'une réponse microgliale neurotoxique, les cellules produisent des ROS (reactive oxygen species), le NO (nitric oxide) et des cytokines proinflammatoires telles que IL-1, IL-6 et TNF- α , qui mettent en danger l'activité neuronale (j). La rupture de la BHE va permettre l'infiltration des monocytes/macrophages (k). Celles-ci sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 et TGF- β et promeut la neuroprotection et le renouvellement cellulaire (l) (d'après London et al., 2013).

Une double fonction neuroprotectrice et neurotoxique est couramment attribuée à la microglie (pour revue, Kreutzberg, 1996). L'activation microgliale peut, se propager et se prolonger pour amplifier la destruction des neurones, ceci est une caractéristique commune des maladies neurodégénératives (Gao et Hong, 2008). Quand la microglie est continuellement activée de façon soutenue, elle produit des cytokines pro-inflammatoires et des espèces réactives oxygénées et azotées qui peuvent tuer les agents pathogènes environnants. Ces molécules affectent aussi la viabilité et les fonctions neuronales. Il a été montré que l'interleukine 1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) sont les principales cytokines synthétisées par la microglie avant pour effet d'aggraver les dommages post-ischémiques (Sairanen et al., 1997). L'exposition chronique à des signaux pro-inflammatoires favorise une réponse exagérée microgliale et contribue à la détérioration neuronale (Perry et al., 2007). De façon contradictoire, d'autres études suggèrent un rôle protecteur de la microglie sur les cellules environnantes à travers la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Masliah et al., 2005) et des molécules neurotrophiques participant à la survie neuronale et à la réparation tissulaire comme le NGF (Nerve Growth Factor), le NT3 (Neurotrophine 3) et le BDNF (Elkabes et al., 1996; Batchelor et al., 2002). Par ailleurs, il a été constaté que la présence de neurones sains diminue la réponse microgliale ce qui sous-tend l'idée qu'ils ont un effet inhibiteur sur l'activation microgliale (Pabon et al., 2011). L'existence d'une relation entre la dégénérescence neuronale et l'activation microgliale due à la neuroinflammation parait donc être une évidence.

Cette double fonction varie selon le programme d'activation microgliale. En effet, la microglie peut être polarisée en 2 phénotypes différents dépendant du microenvironnement où elle est activée. Le phénotype M1 (classique) est induit par la présence de lipopolysaccharide (LPS), TNF, et INF- γ (Hernandez-Ontiveros et al., 2013; Kumar et al., 2013) (Figure 9). Ce sous type est caractérisé par l'augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et la diminution des cytokines antiinflammatoires (Chhor et al., 2013). Par contre, quand la microglie est exposée aux cytokines IL-4 et Il-13, elle est orientée vers un phénotype M2 (alternatif) (Chhor et al., 2013). Celui-ci attenu l'inflammation en réduisant la production des cytokines proinflammatoires et l'augmentation de la sécrétion des cytokines antiinflammatoires, l'IL- 10 et TGF- β (Figure 9). De plus, il a été montré que la microglie de type M2 est requise pour la différenciation des oligodendrocytes afin d'assurer une réponse de remyélinisation effective (Miron et al., 2013). Wang et collaborateurs ont analysé la cinétique de polarisation de la microglie dans un modèle murin de CCI et révèlent qu'une réponse de type M2 est transitoire avant d'être remplacée par une réponse de type M1, 7 jours après la lésion (Wang et al., 2013). De ce fait, il serait intéressant d'étudier cette plasticité microgliale et macrophagique en fonction du temps afin de cibler une fenêtre thérapeutique pour agir sur la neuroinflammation.



Figure 9: Hétérogénéité phénotypique microgliale après activation. La microglie peut adopter différents phénotypes : M1 (activation classique), M2a (activation alternative), et M2c (désactivation acquise). En fonction de leur phénotype, les cellules microgliales expriment différents clusters de différenciation (CD), tels que CD86 ou CD206, ou des protéines de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II et sécrètent des cytokines et des chimiokines différentes. CCL2: ligand chimiokine-2 à motif CC ; IFN: interferon ; IL: interleukine ; LPS: lipopolysaccharide ; TGF: Facteur de croissance transformant ; TNF: facteur de nécrose tumorale ; Ym1: YKL-40, chitinase 3-like 3. (D'après Layé et al., 2015).

2- <u>Les astrocytes</u>

Les astrocytes appartiennent à la famille de la macroglie et représentent les cellules gliales les plus nombreuses au sein du SNC. Pendant longtemps, ils ont été uniquement considérés comme des cellules de soutien passives mais leur rôle dans la formation et le fonctionnement des synapses a été mis en évidence durant la dernière décennie (pour revue, Clarke et Barres, 2013).

Les astrocytes peuvent être de deux types différents : soit de type protoplasmique (type 1), ils sont localisés principalement dans la substance grise, tapissant alors la membrane basale de tous les vaisseaux et la pie-mère soit de type fibreux (type 2), localisé principalement dans la substance blanche. Le premier rôle des astrocytes est d'assurer le maintien et la structure tridimensionnelle du cerveau. Les astrocytes de type 1 jouent un rôle primordial dans la régulation des échanges entre le SNC et le milieu extérieur : ils s'opposent à la pénétration d'éléments extérieurs dans le SNC et sont par conséquence nécessaires au maintien de la BHE. Ils sont en contact avec les synapses et participent à l'élimination du glutamate (pour revue, Tabata, 2015). Les astrocytes de type 2 entourent les neurones et les fentes synaptiques. De plus, comme les neurones, ils possèdent des pompes ioniques et des récepteurs membranaires aux neurotransmetteurs et aux signaux environnementaux (pour revue, Clarke et Barres, 2013).

Les astrocytes répondent aux infections du SNC et aux dommages cérébraux de manière rapide par une hypertrophie, constituant le phénomène d'astrogliose marqué par l'expression accrue de la protéine glial fibrillary acidic protein (GFAP, Raivich et al., 1999). L'activation des astrocytes est modulé par des cytokines pro-inflammatoires comme II-1 β , II-6 et TNF- α secrétées par la microglie et par les astrocytes eux-mêmes (Buffo et al., 2010). Les astrocytes activés synthétisent de nombreux médiateurs faiblement présents au sein des astrocytes quiescents et qui contribuent à l'environnement inflammatoire du SNC (Dong et Benveniste, 2001). Ils expriment ainsi certains membres de la famille des TLR leur permettant de reconnaitre les pathogènes (Jack et al., 2005) et le CMH de classe II afin de jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Il est en effet maintenant bien établi que les astrocytes jouent un rôle central dans la régulation de la neuroinflammation et qu'ils produisent, aussi bien in vitro qu'in vivo, un large éventail

de molécules impliquées dans le processus inflammatoire, comme le TNF- α au sein du SNC lésé (Kipp et al., 2008). Les médiateurs secrétés peuvent induire l'activation de cellules avoisinantes, comme les oligodendrocytes ou la microglie (Chung et Benveniste, 1990) et ainsi amplifier localement la réponse immune, modifier la perméabilité membranaire et permettre l'attraction de cellules immunocompétentes dans le parenchyme cérébral.

Les astrocytes activés vont s'assembler pour constituer, autour de la lésion, une barrière physique et chimique dite « cicatrice gliale » (Figure 10, pour revue, Burda et Sofroniew, 2014). La cicatrice gliale délimite le site de la lésion des tissus sains. Sept jours après une lésion au niveau du cortex, un grand nombre d'astrocytes hypertrophiques a été observé aux alentours de la cavité lésionnelle (Hampton et al., 2004). Cependant, une petite fraction des cellules GFAP positives étaient BrdU positives, indiquant donc que l'augmentation du nombre de cellules GFAP positives est due à une extension ou à la migration de ces cellules et non pas à une division cellulaire (Hampton et al., 2004). De même, Villapol et collaborateurs ont montré que, 3 jours après la lésion corticale, au voisinage de cette dernière, les astrocytes réactifs acquièrent une morphologie hypertrophique (Villapol et al., 2014). Ils ont également constaté la présence d'une astrogliose s'étendant de 7 jours à 2 mois après la lésion ainsi que la présence d'un contact entre les astrocytes et les vaisseaux à la frontière de la cavité lésionnelle à partir de 7^{ème} jour post-lésionnel.



Figure 10: Caractéristiques de l'activation des astrocytes. Après la lésion du SNC, les astrocytes activés augmentent leurs fonctions homéostatiques et trophiques (a), ainsi que la production des facteurs de croissance, des cytokines et la libération de composés toxiques et des nucléotides (b). L'astrogliose comprend une prolifération cellulaire (c) et de la migration vers le site de la lésion (d). Les astrocytes réactifs participent à la formation de la cicatrice gliale et contribuent à la réparation de la BHE endommagée (e). Nt/Nu : nucléotides/nucléosides, BBB : barrière hémato-encéphalique (d'après, Buffo et al., 2010).

En fonction du contexte pathologique, l'astrogliose, comme l'activation microgliale, peut avoir des effets antagonistes : ces cellules astrocytaires peuvent être source de composants neurotoxiques tels que des cytokines pro-inflammatoires, de l'oxyde nitrique (NO) et du glutamate, pouvant aggraver l'atteinte initiale (pour revue Haydon, 2001; Przedborski, 2004). En parallèle, la cicatrisation gliale induite après la lésion a été considérée comme une importante barrière à la régénération axonale (Davies et al., 1997). Néanmoins, le rôle protecteur de l'astrogliose a été récemment établi. Plusieurs études ont suggéré qu'après une lésion traumatique, la composition moléculaire de la cicatrice gliale évolue avec le temps en acquérant des propriétés permissives à la croissance axonale (Morel et al., 2002). Ceci a été confirmé dans le cas d'une lésion

corticale suivie par une transplantation de neurones corticaux embryonnaires. Gaillard et Jaber ont constaté que les astrocytes de l'hôte retiennent la capacité de réexprimer des facteurs de développement suffisant pour diriger la croissance axonale du transplant (Gaillard et Jaber, 2007). Ceci est en accord avec une étude précédente montrant que les astrocytes corticaux, chez l'animal adulte, conservent la capacité de réexprimer un phénotype précoce qui peut partiellement être à la base de la migration active des neurones transplantés et des précurseurs neuronaux (Leavitt et al., 1999). En plus, l'astrogliose peut être associée à la promotion et à la survie neuronale par l'élimination de certains composants toxiques pour les neurones et par la sécrétion de différents facteurs de croissance comme le BDNF (Schwartz et al., 1994) et le VEGF (Rosenstein et Krum, 2004). Elle permet également une délimitation de la zone endommagée, une limitation de l'extravasation leucocytaire et une promotion de la réparation de la BHE (Faulkner et al., 2004).

3- Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes forment, avec les astrocytes, un ensemble de cellules que l'on appelle la macroglie. Les cellules progénitrices des oligodendrocytes (Oligodendrocytes progenitor cells, OPC) constituent 3 à 9% du nombre total de cellules dans le SNC adulte. Elles sont localement présentes dans le corps calleux, le striatum et le cortex (pour revue, Zhang et al., 2013). Dans le cerveau adulte, les OPCs se différencient de façon continue en oligodendrocytes matures pour myéliniser les axones amyélinisés tout au long de la substance blanche et grise (Young et al., 2013). Les oligodendrocytes sont à l'origine de la myéline qui participe à la conduction du signal saltatoire et la myélinisation des axones du SNC puisqu'ils envoient des prolongements membranaires qui s'enroulent autour des axones dont le rôle est de fournir et de maintenir la gaine de myéline (pour revue, Bradl et Lassmann, 2010). Des études récentes montrent qu'en plus de faciliter la conduction saltatoire, la myélinisation dans le cerveau adulte contribue au maintien de l'intégrité axonale et à la plasticité neuronale (pour revue, Zhang et al., 2013). Les oligodendrocytes matures sont particulièrement vulnérables aux accidents cérébraux de par leur capacité limitée à faire face au stress oxydatif. En effet, comme ils ne produisent que de faible quantité de l'antioxydant, le glutathion (Thorburne et Juurlink, 1996), toute condition qui induit un stress oxydatif ou métabolique est susceptible d'entraîner l'apoptose des oligodendrocytes. La présence de cytokines inflammatoires est également capable d'initier l'apoptose des oligodendrocytes comme par exemple le TNF- α . La première conséquence de la mort des oligodendrocytes est la perte de myéline conduisant à un retard ou à un blocage complet de la conduction des potentiels d'action le long des axones.

Plusieurs études soutiennent le concept que les oligodendrocytes subissent une gamme de réponses suite à une lésion cérébrale. Le nombre d'oligodendrocytes présents dans la substance blanche diminue durant la première semaine après une lésion par percussion fluide du cerveau chez le rat (Lotocki et al., 2011). De plus, une augmentation rapide du nombre d'OPCs dans les substances blanche et grise à proximité du site de lésion a été rapportée (Buffo et al., 2005; Dent et al., 2015). Ces cellules persistent jusqu'au 14^{ème} jours après la lésion (Hampton et al., 2004). Ainsi, la modulation de l'activation des oligodendrocytes pourrait être un facteur important dans la conception de stratégies thérapeutiques pour favoriser la myélinisation axonale des neurones.

C. Les médiateurs moléculaires de l'inflammation

L'ensemble des mécanismes cellulaires met également en jeu de nombreux médiateurs moléculaires spécifiques (interleukines, chimiokines) pouvant exercer des fonctions variables et parfois antagonistes permettant ainsi le contrôle du processus neuroinflammatoire. Les 2 grandes classes de médiateurs moléculaires de l'inflammation sont les chimiokines et les cytokines.

1- Les chimiokines

Les chimiokines sont de petites molécules chimiotactiques de très faible concentration dans le SNC. Dans une situation inflammatoire, elles sont impliquées dans la migration des astrocytes et de la microglie au niveau du site de lésion ainsi que dans le recrutement des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques au sein du SNC. Une cinquantaine de chimiokines (Laing et al, 2004) ainsi qu'une vingtaine de récepteurs associés (Bacon et al, 2002) ont été décrits. De nombreux récepteurs aux chimiokines sont exprimés à la surface des cellules microgliales tels que CCR2, CCR3, CCR5, CXCR4 et CX3CR1 (Simpson et al, 2000). Les chimiokines sont de véritables acteurs dans les interactions entre les neurones et la microglie (pour revue, Biber et al, 2007). Ainsi, une invasion rapide de la microglie activée autour des neurones endommagés, suggère une libération, par les neurones, de molécules chimioattractives au niveau du site de lésion (Streit et al, 1999).

De plus, plusieurs expériences in vivo utilisant des souris KO pour certains récepteurs aux chimiokines ont permis de mettre en évidence des défauts de migration et d'activation de la microglie (Rappert et al, 2004; Cardona et al, 2006; El Khoury et al, 2007). Cardona et collaborateurs ont montré l'implication du récepteur CX3CR1 et de son ligand CX3CL1, dans le contrôle de la neurotoxicité des cellules microgliales (Cardona et al, 2006). Dans un modèle de souris de la maladie de Parkinson, ils ont décrit une forte activation microgliale accompagnée d'une mort neuronale en absence de CX3CL1 (Cardona et al, 2006). Ceci suggère que chez des souris sauvages à l'état physiologique, l'état d'activation de la microglie est inhibé via la libération de CX3CL1.

2- Les cytokines

Pour communiquer entre elles, les cellules utilisent des facteurs solubles qui sont les cytokines. Ce sont des glycoprotéines membranaires qui peuvent être synthétisées par plusieurs types cellulaires, notamment les macrophages, les lymphocytes et les astrocytes. Elles peuvent agir, spécifiquement par l'intermédiaire de récepteurs, sur un grand nombre de cellules cibles selon différents modes d'action : autocrine, paracrine et endocrine. Elles sont produites lors d'une réponse inflammatoire et sont essentielles au développement et au fonctionnement des réponses immunitaires innées et adaptatives. Elles ont pour rôle d'activer les cellules immunitaires et les recruter au niveau du site de l'inflammation (pour revue, Woodcock et Morganti-Kossmann, 2013).

a- Cytokines pro-inflammatoires

Des cytokines pro-inflammatoires peuvent être secrétées quelques minutes après une lésion cérébrale traumatique (TBI, Traumatic Brain Injury) telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α (Morganti-Kossmann et al., 2002). Elles sont impliquées dans le développement de l'inflammation du SNC, notamment par leur capacité à induire l'expression de molécules d'adhésion et la synthèse de chimiokines par les cellules endothéliales et les astrocytes environnants, facilitant ainsi la migration intra-tissulaire des leucocytes (Engelhardt et Ransohoff, 2005). Récemment, un essai luminex a été utilisé pour détecter l'expression des cytokines dans le cortex cérébral des rats après une lésion modérée par percussion fluide. Les résultats indiquent que la lésion augmente significativement le niveau d'expression d'IL-1 α , IL-6 et du TNF- α (Redell et al., 2013).

L'IL-1 est considéré comme un important régulateur du système immunitaire, il existe 2 sous-types agonistes, l'IL-1α et l'IL-1β. La forme activée se lie au récepteur de type 1 (IL-1R1) qui exerce ses effets biologiques après sa combinaison au IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP). L'effet d'IL-1 est limité par son récepteur antagoniste endogène (IL-1ra) (pour revue, Ziebell et Morganti-Kossmann, 2010). Lors de l'inflammation, les cellules microgliales sont une source importante et très précoce de l'IL-1 (Davies et al., 1999). En effet, une augmentation du niveau d'IL-1 a été observée durant les premières heures après une lésion cérébrale traumatique chez les rongeurs (Woodroofe et al., 1991). Des études sur des modèles animaux de lésion cérébrale traumatique ont montré que le niveau basal d'IL-1β est très faible et qu'une augmentation de l'expression de cette cytokine est détectée dès 1 heure après la lésion (pour revue, Woodcock et Morganti-Kossmann, 2013).

- Le TNF- α est une protéine transmembranaire produite par les macrophages et • les astrocytes chez les rongeurs et chez l'homme. Une augmentation de l'expression de TNF précède l'infiltration des leucocytes au niveau du site de la lésion chez le rat (Riva-Depaty et al., 1994), suggérant que le TNF-α est produite par les cellules résidentes suite à la lésion neuronale. Vitarbo et collaborateurs ont observé une augmentation de l'expression de la protéine et du RNAm du TNF- α dans le cortex et l'hippocampe ipsilatérale, 1 heure après la lésion chez le rat (Vitarbo et al., 2004). De même, dans un modèle d'un impact cortical contrôlé (CCI), Dalgard et collaborateurs ont montré un pic de sécrétion de TNF- α 4 heures après la lésion et une diminution de celle-ci 12 heures après la lésion (Dalgard et al., 2012). La contribution du TNF- α dans des lésions tissulaires a été rapportée, notamment par le fait que le TNF-a recombinant injecté dans le cerveau induit une inflammation cérébrale, la rupture de la BHE et la promotion de l'infiltration de cellules immunitaires (pour revue, Ziebell et Morganti-Kossmann, 2010).
- L'IL-6 est une protéine multifonctionnelle produite par plusieurs types cellulaires comme les astrocytes, la microglie, et les neurones. L'IL-6 inhibe la synthèse du TNF, induit celle du NGF et favorise la différenciation ainsi que la survie neuronale (pour revue, Woodcock et Morganti-Kossmann, 2013). L'IL-6 a également un rôle considérable dans la réponse immunitaire en tant que facteur physiologique de prolifération des lymphocytes B et des plasmocytes.

b- Cytokines anti-inflammatoires

Des cytokines anti-inflammatoires peuvent également être secrétées telles que TGF- β , l'IL-10 et IL-4 qui améliorent ou inhibent l'activation macrophagique et/ou microgliale, la présentation antigénique et les manifestations neurologiques induites par l'inflammation.

- L'IL-10 est l'une des protéines agissant sur l'immunité en inhibant la production de certaines cytokines comme IL-1β et TNF et en modulant le nombre des différentes cellules intervenant dans le système immunitaire, comme les lymphocytes (Moore et al., 2001). L'IL-10 inhibe aussi la fonction présentatrice d'antigènes des cellules accessoires (diminution de l'expression de CMH classe II). L'ensemble de ces propriétés fait de l'IL-10 une cytokine très intéressante pour moduler négativement la réponse immunitaire avec des applications thérapeutiques potentielles.
- Le TGF-β comprend 3 isoformes chez les mammifères : TGF-β1, β2 et β3. Dans le SNC, les trois isoformes peuvent être produites. Les astrocytes constituent la source principale de TGF-β dans un cerveau sain en secrétant constitutivement les isoformes 2 et 3 (Unsicker et al., 1991), bien que les neurones et les oligodendrocytes en produisent également (Zhu et al., 2000). Les cellules microgliales quant à elles ne produisent que l'isoforme 1. Les effets du TGF-β sont nombreux et variés mais contribuent généralement à inhiber les réponses inflammatoires (pour revue Pratt et McPherson, 1997). Sur la microglie, le TGF-β va avoir pour action générale d'inhiber leur fonctions immunitaires (Paglinawan et al., 2003). Il peut ainsi inhiber l'expression de CMH classe II, inhiber leur production de radicaux oxygénés ou encore bloquer leur prolifération (Suzumura et al., 1993).
- Enfin, les mécanismes précis d'action de certaines cytokines sur le cerveau sont encore mal connus. En effet, l'IL-33 a été découverte, en 2005, comme un nouveau membre de la famille d'IL-1. Au vue de son rôle crucial dans la réponse immunitaire innée, elle était nommée comme « alarmine » (Schmitz et al., 2005, Moussion et al., 2008). L'analyse d'ADNc de souris par PCR quantitative en temps réel a montré que l'ARNm de l'IL-33 est largement exprimé dans de nombreux tissus tels que l'estomac, la moelle épinière, le cerveau, les poumons et la peau (Schmitz et al., 2005). L'expression de la protéine d'IL-33 a été détectée à l'âge embryonnaire E19 dans les bulbes

olfactifs et la rétine, et dans de larges zones du cerveau à partir du $9^{\text{ème}}$ jour postnatal (P9) (Wicher et al., 2013). C'est une cytokine à double fonction : elle peut agir comme un facteur de transcription (Carriere et al., 2007) mais aussi comme un médiateur, « alarm », lorsqu'elle est libérée par des cellules endommagées nécrotiques (Cayrol et Girard, 2009). Ainsi, l'IL-33 nucléaire peut interagir avec le facteur de transcription nucléaire kappa-B (NF- κ B) et attenue l'activité de ce dernier (Carriere et al., 2007), tandis que l'IL-33 extracellulaire se lie à son récepteur hétérodimérique constitué du ST2 et IL-1RAcP (pour revue, Liew et al., 2010).

Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à la production et à la fonction de l'IL-33 dans le SNC en conditions inflammatoires. Récemment, dans un modèle de lésion ischémique, il a été rapporté que l'IL-33 était fortement exprimée dans l'hémisphère ipsilatéral à la lésion, 1 jour après l'ischémie, et diminue à partir du 8^{ème} jour après la lésion (Korhonen et al., 2015). De plus, dans un modèle de lésion de la moelle épinière (Spinal cord injury SCI), Pomeshchik et collaborateurs ont observé une augmentation de l'expression d'IL-33 par les astrocytes dans la moelle épinière, dès 24 heures après la lésion et jusqu'à 42 jours après la lésion (Pomeshchik et al., 2015). Après administration de l'IL-33 recombinant pendant la phase aigüe de la lésion de épinière, ils ont détecté un profil la moelle anti-inflammatoire microglie/macrophage de type M2 entraînant la réduction de la lésion secondaire et l'amélioration de la réparation fonctionnelle (Pomeshchik et al., 2015). Ces résultats confirment ceux obtenus par Yasuoka et collaborateurs montrant que les astrocytes sont les principales cellules exprimant l'IL-33 et que la microglie et les astrocytes expriment les récepteurs ST2 et IL-1RAcP dans le SNC (Yasuoka et al., 2011). Ceci suggère que la microglie et les astrocytes peuvent être les premières cibles d'IL-33. Yasuoka et son équipe montrent que l'IL-33 agit sur la microglie en induisant sa prolifération et la sécrétion des cytokines et des chimiokines telles que TNF- α , IL-1 β et CCL2 (Yasuoka et al., 2011, pour revue, Liew et al., 2010). En revanche, Gadani et collaborateurs ont montré que l'IL-33 su niveau du SNC est principalement exprimée par les oligodendrocytes matures et les astrocytes de la substance grise. Après une lésion au niveau du SNC, l'IL-33 sera libérée et agira sur les astrocytes et la microglie pour produire des chimiokines nécessaires au recrutement des monocytes périphériques (Gadani et al., 2015). Ensemble, ces travaux montrent que l'IL-33 est une cytokine multifonctionnelle qui pourrait être impliquée dans différentes conditions physio-pathologiques.

L'effet neurotoxique ou neuroprotecteur de l'inflammation n'est donc toujours pas clairement établi à l'heure actuelle. Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous nous sommes alors proposés de comprendre, dans quelle mesure l'inflammation post-traumatique dans un modèle de lésion corticale, pourrait influencer la survie des neurones greffés ainsi que le développement de projections issues de ces neurones, et inversement comment les cellules transplantées peuvent moduler l'inflammation post-traumatique. Nous nous sommes également intéressés à étudier le rôle de l'IL-33 et son effet bénéfique ou néfaste sur le développement du transplant.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Résumé de l'article 1 (soumis)

Développement et maturation dans le temps des neurones embryonnaires corticaux et de leurs projections axonales après transplantation dans le cortex moteur lésé adulte

Le cortex moteur joue un rôle central dans le contrôle, la planification et l'exécution des commandes motrices volontaires chez les mammifères. C'est une structure organisée en six couches constituées de différents types de neurones, d'interneurones et de cellules gliales. Les neurones à projection glutamatergiques constituent 80% des neurones corticaux et projettent vers les cibles corticales et sous corticales du cortex moteur (Hevner et al., 2006; pour revue Molyneaux et al., 2007). Les interneurones GABAergiques impliqués dans les projections locales constituent les 20% restants des neurones corticaux (Hendry et al., 1987; Meinecke et Peters, 1987). Pendant le développement embryonnaire chez la souris, les progéniteurs présents dans la zone ventriculaire (VZ) et la zone sous ventriculaire (SVZ) génèrent la majorité des neurones corticaux entre le jour embryonnaire (E) 11,5 et E17,5 (Takahashi et al., 1995). Les neurones sont générés selon une séquence temporelle précise. En effet, les neurones générés en premier forment les couches profondes, et les neurones générés en dernier forment les couches les plus superficielles du cortex (Rakic et Lombroso, 1998; Molyneaux et al., 2007). L'expression spécifique de différents marqueurs moléculaires par les neurones de projection permet d'identifier les différentes couches corticales. Par exemple, Cux1 (Cut-like homeobox 1) et Cux2 (Cut-like homeobox 2) sont exprimés spécifiquement par des neurones de couches superficielles, ainsi que Foxp2 (Forkhead box protein P2), Ctip2 (Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factorinteracting protein 2) et Satb2 (Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2) sont exprimés par les neurones des couches profondes (pour revue Leone et al., 2008; Greig et al., 2013).

La perte des neurones est une caractéristique commune à de nombreuses conditions neuropathologiques telles que les lésions (traumatisme, accident vasculaire cérébral) ou les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique, maladies d'Huntington, d'Alzheimer...). En réponse à une lésion corticale, les capacités de repousse axonale et de régénération spontanée du système nerveux central sont limitées (Davies et al., 1997; 1999). Afin de réparer le cerveau lésé, la transplantation neuronale apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse. L'efficacité de la transplantation corticale dépend du degré de survie du transplant, de sa capacité à se différencier selon le phénotype neuronal approprié et de restaurer les projections spécifiques. Il a été démontré que la transplantation de neurones embryonnaires corticaux dans le cortex moteur adulte immédiatement après la lésion permet la reconstruction anatomique des voies motrices lésées. En effet, les neurones embryonnaires transplantés développent des projections axonales point à point vers les cibles corticales appropriées, y compris sur de longue distance vers la moelle épinière (Gaillard et al., 2007). Ces résultats montrent la capacité de réparation de voies motrices endommagées par des précurseurs corticaux d'origine moteurs. Cette capacité de réparation des voies lésées n'est pas propre au système moteur. En effet, il a été démontré dans un modèle animal de la maladie de Parkinson, la reconstruction de la voie nigrostriée par la transplantation de neurones dopaminergiques embryonnaires issus de mésencéphale ventral directement dans la substance noire (Thompson et al., 2009; Gaillard et al., 2009; Barker et al., 2013). Peu d'études ont été consacrées aux possibilités des réparations des circuits moteurs endommagés par des neurones corticaux embryonnaires. Parmi les premières descriptions cytoarchitecturales du tissu greffé, il a été démontré une absence de l'organisation laminaire des neurones corticaux au sein des transplants. Les neurones greffés s'organiseraient plutôt en amas cellulaires séparés par des espaces comportant des faisceaux de fibres (Castro et al., 1985; Plumet et al., 1990; Garnier et al., 1995; Pinaudeau et al., 2000; Gaillard et Roger, 2000; Santos-Torres et al., 2009). L'étude morphologique des neurones corticaux embryonnaires transplantés après une lésion ischémique corticale chez le rat montre que les transplants contiennent des cellules pyramidales, non pyramidales et gliales (Belichenko et al., 2001). Par ailleurs il a été démontré que le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans les transplants de neurones corticaux embryonnaires implantés dans le cortex moteur lésé par aspiration (Santos-Torres et al., 2009) ainsi que la présence des neurones de type GABAergiques (Bragin et al., 1991).

Dans ce travail, nous avons effectué une étude dans le temps, allant de 2 à 30 jours post-transplantation, dans l'objectif d'étudier la maturation des neurones embryonnaires corticaux transplantés dans le cortex moteur lésé adulte ainsi que le développement de leurs projections axonales.

Pour cela, nous avons transplanté dans le cortex moteur lésé par aspiration de souris adultes des fragments de tissu embryonnaire cortical moteur prélevés à E14 chez des souris sur-exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de l'actine- β . Afin d'examiner le développement des cellules greffées dans le temps, les souris transplantées ont été sacrifiées à 2, 4, 7, 14 et 30 jours post-transplantation. Après le prélèvement des cerveaux, des immunomarquages ont été réalisés sur les coupes de cerveau. Afin de visualiser les cellules greffées et leurs prolongements axonaux, un immunomarquage contre la GFP a été réalisé. Afin de marquer les neuroblastes immatures présents dans les transplants, des immunomarquages contre la doublecortine (DCX) et la PSA-NCAM ont été réalisés. Les astrocytes ont été marqués par immunomarquage contre la GFAP. Les neurones matures ont été marqués par immunomarquage contre NeuN, et leur phénotype glutamatergique ou GABAergique a été évalué par immunomarquages contre le V-GLUT1 et le GABA respectivement. Les neurones de projection des couches profondes et des couches superficielles ont été marqués par immunomarquage contre les facteurs de transcription Ctip2, Foxp2, Tbr1 et Cux1. Afin d'étudier si, après la transplantation, les neurones embryonnaires corticaux se développent en respectant la séquence temporelle, l'injection de 2-bromo-déoxyuridine (BrdU) a été réalisée 2 et 4 jours après la transplantation. Enfin, des immunomarquages contre la BrdU couplée à Ctip2, Cux1 et Foxp2 ont été effectués.

L'étude de la croissance des transplants et du développement de leurs projections axonales GFP+ montre qu'à deux jours post-transplantation, les cellules greffées forment une fine couche de cellules dans la cavité lésionnelle au contact du cortex moteur de l'hôte. Dans certains cas, quelques rares projections axonales GFP+ sont présentes dans
le cortex de l'hôte à proximité du transplant. Quatre jours après la transplantation, le volume des transplants a presque triplé par rapport à deux jours post-transplantation et la quantité de fibres présente dans le cortex de l'hôte adjacent au transplant a augmenté. Sept jours post-transplantation, les transplants remplissent partiellement la cavité lésionnelle et de nombreuses fibres GFP+ sont présentes dans le cortex moteur et quelques fibres pionnières sont présentes au niveau du corps calleux et du striatum ipsilateral par rapport au transplant. Quatorze jours après la transplantation, les cellules transplantées remplissent la cavité lésionnelle, la densité des efférences axonales développées par les neurones transplantés a augmenté par rapport au 7^{ème} jour posttransplantation. Les fibres GFP pionnières sont présentes au niveau des régions corticales et sous corticales normalement connectées avec le cortex moteur, à l'exception des sites éloignés tel que la moelle épinière. Trente jours après la greffe, le volume des transplants a augmenté d'une fois et demie par rapport au 14^{ème} jour post-transplantation, et de nombreuses fibres GFP+ innervent le cortex ipsilatéral et controlatéral, le striatum, le thalamus ventrolateral et la capsule interne. Dans certains cas, des fibres GFP+ sont également présentes dans les noyaux du pont et la moelle épinière. Ces résultats indiquent que les neurones corticaux embryonnaires transplantés envoient des projections progressivement vers les cibles corticales et sous corticales appropriées suggérant la présence de facteurs de guidage axonales spécifiques permettant l'orientation de ces axones vers les régions appropriés.

L'étude de la maturation des cellules greffées montre que jusqu'à 4 jours posttransplantation, les transplants sont principalement composés de neuroblastes immatures, puisque les cellules transplantées expriment fortement la DCX et la PSA-NCAM. Sept jours après la transplantation, les cellules greffées montrent encore une forte immunoréactivité pour DCX et PSA-NCAM et dans certains cas, quelques cellules GFP expriment NeuN montrant le début de la maturation de ces cellules. Quatorze jours après la greffe, l'expression de DCX et de PSA-NCAM a fortement diminué dans les transplants, et de nombreux neurones matures NeuN+ sont présents dans tous les cas. Après 30 jours, les transplants sont principalement constitués de neurones matures. En ce qui concerne l'expression des cellules gliales au sein du transplant, à partir du 2^{ème} jour post-transplantation, l'expression des astrocytes, marqués par la GFAP, a été observée dans le transplant entre les amas neuronaux. Quatre jours après la greffe, de nombreuses cellules transplantées exprimaient GFAP et de nombreuses cellules GFAP+ ont été détectées à l'interface hôte transplant. Le niveau d'expression des astrocytes de l'hôte reste élevé jusqu'à 7 jours post-transplantation; il diminue à partir du 14^{ème} jour après la greffe. Les cellules GFAP+ réactives de l'hôte présentent une morphologie allongée et sont principalement orientées perpendiculairement au transplant, suggérant un rôle potentiel de ces cellules dans l'orientation des axones des neurones greffés (Gaillard et Jaber, 2007).

La caractérisation phénotypique des neurones transplantés montre que 30 jours post-transplantation, la majorité des neurones matures NeuN+ présents dans les transplants sont de type glutamatergique, et peu de neurones matures sont de type GABAergique. Ce qui indique que les neurones greffés se différencient conformément à la composition neuronale du cortex moteur sain. Cependant le pourcentage de neurones matures exprimant le GABA n'est que de 5%, largement inférieur au nombre de neurones GABA présent dans le cortex intact. Ceci peut s'expliquer par le fait que le tissu cortical utilisé pour la transplantation est prélevé au 14^{ème} jour de gestation et à ce stade du développement, peu d'interneurones sont présents au niveau de la plaque corticale. En effet, chez la souris les interneurones GABAergiques sont générés au niveau du télencéphale ventral, plus précisément au niveau de l'éminence ganglionnaire, puis ils migrent tangentiellement vers le cortex en développement (Tamamaki et al., 1997 ; de Carlos et al., 1996). Les neurones corticaux dérivés de cellules souches présentent une source fiable et illimitée de cellules pour la thérapie cellulaire. Dans le cadre de la transplantation corticale, il est important d'obtenir des neurones corticaux à partir de cellules exprimant les neurotransmetteurs spécifiques en proportions appropriées respectant la balance excitation inhibition.

De plus, les neurones au sein du transplant expriment les marqueurs moléculaires des couches corticales. En effet, nous avons montré que les facteurs de transcription des neurones de projection Cux1, Tbr1, Ctip2, Foxp2 sont exprimés par les cellules transplantées dès le 2^{ème} jour post-transplantation. Même si les neurones greffés ne s'organisent pas en couches, ils se groupent toutefois en amas cellulaires et nous avons

montré la présence de ces amas de cellules exprimant Cux1 ou CTIP2 au sein des greffes. En combinant le marquage BrdU et les marqueurs des couches corticales, nous avons montré également que les cellules greffées sont capables de proliférer et de se différencier en neurones corticaux exprimant des marqueurs des couches corticales même après la transplantation chez l'adulte.

Nos résultats montrent que les neurones embryonnaires corticaux transplantés immédiatement après la lésion du cortex moteur adulte se différencient en neurones matures conformément au phénotype du cortex normal. De plus, les neurones transplantés développent progressivement des projections vers les cibles corticales et sous corticales appropriées. Cette étude fournit ainsi des données de références auxquelles pourra être comparé le développement après la transplantation de neurones corticaux dérivés de cellules souches.

Development and maturation of embryonic cortical neurons grafted into the

damaged adult motor cortex

- Ballout N^{1,2,4,5,*}, Frappé I^{1,2,*}, Péron S^{1,2}, Jaber M^{1,2,3}, Zibara K^{4,5}, Gaillard A^{1,2,**}
- 1 INSERM, U1084, F-86022 Poitiers, France
- 2 Université de Poitiers, U1084, F-86022 Poitiers, France
- 3 CHU de Poitiers, F-86000 Poitiers, France
- 4 Faculty of Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon
- 5 ER045 Laboratory of Stem Cells, PRASE, DSST, Beirut, Lebanon
- * These two authors contributed equally to this work

** To whom all correspondence should be addressed

Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques-LNEC, INSERM U-1084,

Université de Poitiers, Bldg B36, 1 rue Georges Bonnet, BP 633, TSA 51106, 86073

POITIERS cedex 9 - France. Email: afsaneh.gaillard@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

Injury to the human central nervous system (CNS) can lead to devastating consequences due to the poor ability of the SNC to self-repair. Neural transplantation aimed at replacing lost neurons and restore functional damaged circuitry has proven to be a promising therapeutical avenue. We previously reported in adult rodent animal models with cortical lesions that grafted fetal cortical neurons could effectively re-establish specific patterns of projections and synapses. In this study, we aimed at better understanding the spatio-temporal development of different cell populations within the graft and their axonal outgrowth following transplantation. We show here that as early as two weeks after grafting, cortical neuroblasts transplanted into damaged adult motor cortex developed projections to most of the cortical and subcortical targets, normally innervated by motor cortex. In addition, grafted cells exhibited characteristics of immature neurons initially which then differentiated into mature neurons with appropriate cortical phenotypes. Indeed, most of the mature neurons were glutamatergic whereas few were GABAergic. The presence within the graft of BrdU+ cells co-expressing markers of cortical projection neuron identity, such as CTIP2, Cux1, FOXP2 and Tbr1, confirmed that all cortical subtypes were generated after grafting. These results provide a detailed characterization of the in vivo development of fetal-originating transplanted cells within the lesioned adult brain. As transplantation of cells originating from fetal neurons are accompanied by ethical and logistical burdens, the set of data provided here is of interest it sets biological standards for future studies aimed at replacing fetal cells with embryonic stem cells as a source of cortical neurons.

INTRODUCTION

The cerebral cortex is a six-layered structure composed of a large number of neurons classically divided into two major groups. In rodents, 70-80% of neurons are excitatory glutamatergic projection neurons and 15–20% are inhibitory GABAergic non-pyramidal interneurons (Hendry et al., 1987; Beaulieu, 1993). There is a correlation between the laminar position of cortical neurons and their connectivity (Jones, 1984; Douglas and Martin, 2004). As such, layer II/III callosal neurons project to the contralateral cortex, layer V neurons project to the striatum, midbrain pons and spinal cord whereas layer VI neurons project to the thalamus (Greig et al., 2013). Projection cortical neurons from different layers express specific molecular markers (Molyneaux et al., 2007; Gaspard and Vanderhaeghen, 2011, Gaspard et al., 2009). For instance, Cux1 (cut-like homeobox 1) is a specific marker for projection neurons of the superficial layers II/III and IV (Leone et al., 2008), while Ctip2 is used as a marker for a subset of subcerebral projection neurons of deep layer V (Arlotta et al., 2005) and Foxp2 is used as a marker of layer VI corticothalamic projection neurons (Ferland et al., 2003). The complexity of cerebral cortex in terms of cell diversity and specificity of projection pattern is translated into difficulties to appropriately repair damaged pathways following injury or disease.

The cerebral cortex is the target of many neurological conditions such as trauma, stroke, and neurodegenerative disorders all associated with cell death and irreversible functional deficits. In response to cell loss, the capacity of axonal regrowth and spontaneous regeneration within the central nervous system (CNS) are limited (for review see Schwab, 2004). Neuronal transplantation appears as a promising therapeutic strategy to replace neurons and damaged pathways (Gaillard et al., 2004, 2007). The effectiveness of

cortical transplantation depends on the capacity of grafted cells to develop into appropriate neurons expressing specific neurotransmitters and transcription factors and to reconnect damaged pathways. We have previously shown that transplantation of embryonic cortical neurons in the adult motor cortex immediately after injury allows the anatomical reconstruction of injured motor pathways and the development of efferent projections to appropriate cortical and subcortical host targets (Gaillard et al., 2007). While the full repertoire of projections by embryonic cortical grafted neurons appears to be produced after 6 weeks (Gaillard et al., 2007), no precise information about the dynamics of maturation and axonal projections development of transplanted neurons is currently available. This information should provide a control reference regarding appropriate development of cortical neurons derived from stem cells.

In this study, we aimed to characterize the spatio-temporal maturation of the different cell populations constituting the graft and their axonal outgrowth. For this, we performed lesions of the adult mouse motor cortex followed by cell transplantation of embryonic motor cortical tissues and undertook a time-course analysis 2, 4, 7, 14 and 30 days following transplantation. We performed BrdU labeling experiments in combination with labeling of cortical layer identity markers to determine the temporal and phenotypical outcome of grafted cells. Moreover, the progressive axonal outgrowth of grafted neurons up to 30 days post-transplantation was also examined. We reveal here the gradual neuronal differentiation and maturation of grafted neurons through the characterization of expression of markers of immature neurons, glutamatergic and GABAergic phenotypes and layers specific molecular markers of cortical and sub-cerebral projection neurons.

METHODS

Animals

Housing of animals and all animal experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 87849) and of the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals used and suffering.

Transplantation

Adult (4–6 months) C57BL/6 mice (n=34, R Janvier) were anaesthetized with avertin (250 mg per kg of body weight) and the motor cortex was aspirated from approximately 0.5–2.5 mm rostral to the Bregma and from 0.5–2.5 mm lateral to the midline with the corpus callosum left intact according to the protocol routinely used in our laboratory (Roger & Ebrahimi-Gaillard 1994; Gaillard et al., 1998; Gaillard et al., 2007). Motor cortical tissue was harvested from embryonic day 14 transgenic mice embryos overexpressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of a chicken beta-actin promotor (C57BL/6-TgN(beta-act-EGFP) Osb strain (Okabe et al., 1997). Motor cortical tissue was deposited immediately into the host lesion cavity (Gaillard et al., 2007).

BrdU injections

To assess cellular proliferation in the graft, transplanted mice were given a single intraperitoneally injection of BrdU (Sigma, 50mg/kg, 0.1M NaOH, NaCl 0.9%) 2 (n=3)

or 4 (n=3) days after transplantation. Animals were sacrificed 4 hours after BrdU injection.

Tissue preparation

Two, 4, 7, 14 and 30 days after transplantation, animals received a lethal dose of avertin and were perfused transcardially with 150 ml of saline (0.9%), followed by 250 ml icecold paraformaldehyde (PFA, 4%) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were removed and postfixed for a further 4h in 4% PFA. Brains were cut into 40µm coronal section in 6 series with a vibrating microtome (Microm HM650V, Thermo Scientific) and stored at -20°C in a cryoprotective solution (20% glucose, 40% ethylene glycol, 0.025% sodium azide, 0.05M phosphate buffer, pH 7.4).

Immunohistochemistry

Immunostainings were performed as previously described (Gaillard et al., 2007, 2009). Free-floating sections were rinsed in 0,05 M Tris-buffered saline (TBS, pH 7.6) and incubated in TBS solution containing 0,3% Triton X-100 and 5% donkey serum at room temperature (RT) for 90 min to block non specific binding sites. Primary antibodies, diluted in blocking solution, were applied overnight at 4°C. Primary antibodies and dilution factors were as follows: rabbit anti glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:500, Dako); guinea pig anti doublecortin (DCX), a microtubule-associated protein localized in somata and processes of migrating and differentiating neurons (1:100, Abcam); mouse anti polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) expressed by neuronal progenitors and by differentiating neurons (1:100, AbCys); mouse anti NeuN, a marker of mature neurons (1:500, Millipore); mouse or rabbit anti GFP (1:1000, Molecular Probes); rabbit anti CUX1, a marker of superficial cortical layers (1:800, Santa Cruz); rabbit or rat anti CTIP2, a marker of deep cortical layers V neurons (rabbit, 1:500, rat, 1:300, Abcam); rabbit anti FOXP2, a marker of deep cortical layer VI neurons (1:500, Abcam); Chicken anti Tbr1 (1:500, Millipore); rabbit anti γ -aminubutyric acid (GABA) (1:1000, Sigma); rabbit anti vesicular glutamate transporter 1 (1:2000, Synaptic System) and rat anti-BrdU (1:200, Serotec). Following primary antibody incubation, sections were washed three times in TBS for 15 min each and then incubated for 1h at RT with the appropriate secondary antibodies. Secondary antibodies generated in donkey and conjugated either with Alexa Fluor® (1:500; Invitrogen) or Dylight® (1:500; Jackson Immunoresearch) were used. In order to limit non-specific labeling, which can arise from secondary antibody detection, a zenon kit (Invitrogen) was used to directly reveal neuronal nuclei (NeuN) using a primary antibody conjugated with an Alexa Fluor 555 fluorophore. Finally, the sections were rinsed 3 times in TBS and cover slipped with a 10% solution of polyvinyl alcohol containing 2.5% 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane (PVA/DABCO, both from Sigma).

For BrdU staining, before incubation with the primary antibody, sections were pre-treated with 2N HCl, 0.5% Triton X-100 in PBS for 30 min at 37°C followed by incubation with Borax (pH 8.6) for 30 min at RT and blocking with 3% bovin serum albumin (Sigma), 0.3% Triton X-100 in PBS 0.1M, pH 7.4. Sections were covered with DePeX (VWR) mounting media.

Imaging

Immunofluorescence sections were examined using an Axio Imager.M2 (Carl Zeiss). Areas of interest were further analyzed and imaged with a confocal laser-scanning microscope FV1000 (Olympus, France). For double or triple-stained sections, sequential multiple channel fluorescence scanning was used to prevent cross talk between channels.

Determination of graft size

Graft volumes (V) were estimated at various times after transplantation (2, 4, 7, 14 and 30 days) by outlining graft areas on every six coronal section using fluorescent microscopy at low power magnification and an image analysis system (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France). Graft volumes (V) were calculated according to the formula for two truncated cones (V= A1 + 2A2 + 2A3 +...An)/2 x h) with h as the distance between two measured areas considering a section thickness of 40 μ m.

Fibers and cell counting

For each animal and in each area, using a high-magnification objective (X40), fibers density was quantified in 1 out of the 6 series of sections at various times after transplantation (2, 4, 7, 14 and 30 days). At 30 days post-transplantation, the percentage of transplanted neurons expressing cortical transcription factors (TF) or neurotransmitters was estimated through quantification within the GFP+ graft area in every 6 sections of the overlap between TF/NeuN, GABA/NeuN/ or glutamate/NeuN, respectively (>1000 NeuN+ cells counted/animal; n = 5).

RESULTS

Morphological characteristics of the graft and projections

GFP immunoreactivity was used to characterize graft and graft-derived axonal projections. At 2 days post-grafting, transplants appeared as a thin layer of GFP+ cells covering partially the base and/or the lateral walls of the cortical cavity (Fig. 1A, B). The transplants were mainly located in the motor cortical areas I-II and the medial primary somatosensory cortical areas. The size of the grafts varied between 0.01- 0.14 mm³ with an average volume of 0.07 \pm 0.02 mm³. Three grafts out of a total of 5 showed short distance GFP+ projections in the adjacent motor and somatosensory cortices (Table 1).

At 4 days post grafting, transplants were 2.9 times larger than those at 2 days postgrafting (average volume \pm SEM: 0.2 \pm 0.06 mm³) (Fig. 1E, F). Three out of 5 transplants filled the lower third of the cortical cavity, whereas the remaining two grafts appeared only as thin layers of GFP+ cells lying at the base or the lateral wall of the cavity. Compared to 2 days post-grafting, the number of GFP+ fibers located in the adjacent motor and somatosensory cortices had slightly increased (Table 1) and GFP+ fibers were found in these cortical areas in 4 out of 5 transplants. In fact, GFP+ fibers were found in the ipsilateral corpus callosum (CC) proceeding towards the midline in 2 cases whereas, few GFP+ fibers already reached the dorsal part of the caudate putamen (CPu) in one case. One transplant was very small in size (0.03 mm³) without any GFP+ fibers identified outside the transplant.

At 7 days post grafting, transplants were 1.6 times larger than those at 4 days postgrafting (average volume \pm SEM: 0.33 \pm 0.06 mm³) (Fig. 1I, J) and most of the transplants filled the whole cortical cavity. In addition, the density of GFP+ fibers was considerably increased in the motor and somatosensory cortices (Table 1). In 4 out of 5 cases, the number of fibers running into the CC was increased compared to day 4 post-transplantation. In two cases GFP+ fibers crossed the midline and reached the contralateral CC. In three cases, increasing numbers of GFP+ fibers were identified in the dorsal CPu, and in one case rare fast developing fibers were also found within the ventrolateral part of the CPu.

At 14 days post grafting (Fig.1 M, N), the graft size further increased by ~2-fold (0.63 \pm 0.08 mm³) in comparison to 7 days. Transplants filled the whole cortical cavity and the density of GFP fibers innervating the host was significantly increased (Table 1). Graft-derived GFP+ fibers were found in most of brain areas normally innervated by the motor cortex, except distant areas such as the spinal cord. In 7 out of 8 cases, the number of fibers running into the contralateral CC was increased compared to day 7 post-transplantation. The number of GFP+ fibers was increased in the dorsal CPu in all cases (n=8) and fibers also innervated the contralateral Subventricular zone (SVZ), in the internal capsule in the ventrolateral thalamic nucleus, in the cerebral peduncle and in the olfactory bulbs.

At 30 days post grafting (Fig.1 Q, R), the graft size increased by ~1.6 times $(1 \pm 0.22 \text{ mm}^3)$ in comparison to 14 days. All cases (n=5) showed far-reaching graft-derived GFP+ axonal growth, following specific paths (corpus callosum, internal and external capsule, cerebral peduncles) and reaching the specific cortical and subcortical targets that are normally innervated by neurons of motor cortex (Table 1).

Development and maturation of the graft

We next focused on temporal maturation of the grafted cells. For this, we labeled neuronal progenitors and differentiating neurons using antibodies directed against DCX and PSA-NCAM as well as mature neurons and astrocytes using antibodies directed against NeuN and GFAP respectively.

At 2 days post-grafting, transplants appeared as densely packed GFP+ cell bodies. Many of the cells with neuroblast morphology in the transplant expressed both doublecortin (Fig.2 A, B) and PSA-NCAM (Fig.1 A, C). In all cases, a strong DCX expression was found in cells somatas and processes of the majority of the cells composing the transplants. In 4 out of 5 cases, PSA-NCAM expression appeared as a punctate membrane staining, mainly localized on the cell somata of most of the GFP+ cells. In all cases, sparse GFAP cells were found intermixed with neuroblasts within the whole transplants (Fig.1 A, D). At this stage, the grafted cells were systematically negative for the mature neuronal marker NeuN. The first, but rare, GFP+ fibers growing out of the transplant co-expressed DCX (Fig.3 A, C) but not PSA-NCAM.

At 4 days post-grafting, all transplants (n=5) showed a large proportion of grafted cells expressing both DCX (Fig.2 D, E) and PSA-NCAM (Fig.1 E, F). Many grafted cells expressed GFAP whereas sparse host GFAP+ cells were found at the graft-host border (Fig.1 E, H). At this time-point, many of the transplanted GFP neuronal axons highly expressed DCX and PSA-NCAM on their full-length processes (Fig.3 D, E). None of the grafted GFP+ cells expressed the mature phenotype NeuN. At 7 days post-grafting, grafted cells still strongly expressed both DCX (Fig.2 G, H) and PSA-NCAM (Fig.1 I, K). Mature neurons expressing NeuN were observed in two cases (Fig.4 A, B). At this stage, the density of GFP+ fibers was considerably increased in the host adjacent cortex and many of those expressed both DCX (Fig.3 G, I) and PSA-NCAM (Fig.3 J, K). The level of GFAP expressing astrocytes in the graft was still sustained (Fig.1 I, L) and astroglia appeared aligned at the periphery of the graft or within the septa separating PSA-NCAM highly stained lobules. Glial scar formation was never present at the host/transplant border (Fig.1 I, L), 7 days after grafting.

At 14 days post-transplantation, the expression of DCX and PSA-NCAM was strongly decreased in transplants (Fig.1 M, O) and the vast majority of the grafted cells highly expressed NeuN (Fig.4 C, D).

At 30 days post-transplantation, the grafts were almost exclusively populated by NeuN+ mature neurons (Fig.4 E, F). At this time point, immature GFP+ neurons co-expressing DCX and PSA-NCAM were not detected in the transplants, indicating the full maturation of transplanted neurons 30 days after grafting.

Cellular composition of the graft

The adult cerebral cortex consists of six layers. Neurons from different layers are produced at different developmental time points. Earliest generated cortical neurons populate deep cortical layers whereas late born neurons generate the upper layers. Our results show that that the grafted cells express the layer-specific cortical markers Ctip2 (Fig. 5 A-J), Foxp2 (Fig. 5 K-T) and CUX1 (Fig. 5 A-J) from the 2nd to the 30th day

post-transplantation. Despite absence of laminar organization within the transplant, neurons expressing either Ctip2, Foxp2 or CUX1 were organized into distinct clusters within the transplant (Fig. 5 G-J), suggesting some level of organization. In some transplants the expression of the transcription factors in the graft were in continuity with that of the host cortex. Indeed, Cux1+ cells within the graft were mostly located in the superficial part of the graft whereas CTIP2+ cells preferentially populated the deep part of the graft (Fig. 5 G-H).

We next performed BrdU nuclear labelling experiments in the grafted mice to determine the date of birth of neurons with deep and superficial layers identity. At 2 days post grafting, a similar proportion of BrdU+ cells co-expressed CTIP2 (38.7 ± 2.3) or Foxp2 (37.1 ± 6.9) and a smaller population co-expressed Cux1 (28.3 ± 6) (Fig. 6). At 4 days after grafting, the percentage of BrdU+ cells co-expressing CTIP2 increased compared to day 2 (55.3 ± 8.5), while the fraction of post-mitotic cells co-expressing Foxp2 remained unchanged (35.9 ± 1). Interestingly, the proportion of BrdU+ cells co-expressing the upper layer marker Cux1 tends to increase from day 2 to 4 post-grafting (44.7 ± 8.4) (Fig. 6), which is reminiscent of the delayed emergence of upper cortical layers during developmental corticogenesis. Together, this indicates a preserved diversity and differentiation potential of cortical progenitors following transplantation in the adult cortex.

Finally, the presence of both GABAergic interneurons and glutamatergic neurons within the grafts was evaluated by immunodetection of the neurotransmitter GABA and the vesicular glutamate transporter 1 (V-GLUT1), respectively. This analysis was performed at the latest time-point (day 30 post-transplantation) to allow maturation of the grafted neurons. Results showed that the vast majority of grafted cells in the transplant were glutamatergic (Fig. 7A-C) whereas only few of them were GABAergic (Fig. 7D-E). The quantification of the number of mature neuronal marker NeuN co-expressing V-GLUT-1 or GABA within the graft showed that 70% of the mature neurons in the transplant were glutamatergic whereas only 5% of NeuN+ neurons were GABAergic. The proportion of glutamatergic neurons within the graft matches the normal percentage of these neurons within the adult cortex.

DISCUSSION

In the past few years, the survival capacity of embryonic neurons transplanted in different regions of the adult brain has been demonstrated, and many studies have reported their repair potential at the neuroanatomical and functional levels (Lindvall et al., 1990; Plumet et al., 1993; Ebrahimi-Gaillard et al. 1995; Gaillard et al., 2007, 2009; Thompson et al., 2009, Lu et al., 2012; Klein et al., 2013). Here, we performed a time-course analysis, from 2 to 30 days following transplantation, in order to gain insight into the developmental course and maturation of cortical embryonic neurons after grafting into the damaged adult motor cortex.

In this study, we have shown that as early as two weeks after grafting, cortical neuroblasts transplanted into damaged adult motor cortex developed projections to most of the cortical and subcortical targets, normally innervated by motor cortex. In addition, transplanted embryonic cortical cells exhibited characteristics of immature neurons before differentiating into mature neurons with appropriate cortical phenotypes. Indeed,

the grafted neurons expressed molecular markers that characterize neurons of different cortical layers and most of the mature neurons were glutamatergic and few were GABAergic.

At early time points, the presence within the graft of GFP+ cells that co-expressed either DCX or PSA-NCAM suggests ongoing neurogenesis as part of dynamic growth properties of the grafts. On the contrary, at 30 days post grafting, the absence of GFP+ cells co-expressing DCX or PSA-NCAM is indicative of complete state of maturation.

GFP+ cells along with cortical layer markers confirmed the presence of all cortical layers neurons within the grafts. The presence within the graft of BrdU+ cells co-expressing markers of cortical projection neuron identity, such as CTIP2, Cux1, FOXP2 and Tbr1, confirmed that all cortical subtypes were generated after grafting. Overall, this data showed the generation of distinct and correct corticofugal neuron subtypes, even after transplantation in adult lesioned brain. The grafts also contained cells with mature neuronal and glial features as revealed by labelling with NeuN and GFAP. Importantly, the examination of neuronal phenotypes revealed a large population of glutamatergic neurons (70%) within the grafts. However, the density of GABAergic neurons within the cortical grafts was lower than in the intact cortex. This can be explained by the fact that the tissue for cortical transplantation was obtained from E14 embryos, a stage at which the majority of migrating GABAergic interneurons from the ventral telencephalon did not yet reach the cortical plate (Anderson et al., 1997; Marín and Rubenstein, 2003; Wonders and Anderson, 2006; Gelman et al., 2009). In other words, there were few GABA precursors within the E14 transplant. This is of importance when one considers that the ratio between excitatory and inhibitory neurons in the cortex is critical to guarantee normal functioning of cortical circuitries. Indeed, impaired GABA-mediated neurotransmission has been implicated in many neurologic diseases, including epilepsy and intellectual disability (de Lanerolle et al., 1989; Spreafico R, et al., 1998). Interestingly, mouse GABAergic interneurons grafted into the brain of mice with temporal lobe epilepsy decreased seizure activity (Maisano et al., 2012; Hunt et al., 2013).

For future development of cell replacement based therapies, there is a need for an unlimited on-demand source of transplantable cells that should be standardized and quality-tested prior to transplantation. Cortical neurons derived from embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) both offer great potential for cell therapy given their greater accessibility and standard use (Aboody et al., 2011, Gaspard et al., Nature 2008, Espuny et al., neuron 2013, Michelsen et al., 2015). The success of stem cell-based neural repair strategies for neuronal replacement treatment following cortical damage will critically depend on the ability to generate not only specific cortical cell populations but also the maintenance of their correct ratios within the graft.

Acknowledgments

This work was funded by grants from the Institut pour la Recherche sur la Moelle Epinière et l'Encéphale (IRME) to A.G., FEDER N°33552 and the CPER 5. NB was awarded a scholarship from Association of Scientific Orientation and Specialization (ASOS). We thank Dr M. Okabe for providing the GFP-expressing transgenic mice and the staffs of Image'UP platform (University of Poitiers).

REFERENCES

Aboody, K., Capela, A., Niazi, N., Stern, J.H., Temple, S. (2011). Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta stone. Neuron. 70(4): 597-613.

Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., Rubenstein, J. L. R.(1997). Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. Science 278(5337): 474-476.

Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., Macklis, J. D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. Neuron. 45(2): 207-221.

Beaulieu, C. (1993). Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. Brain Res. 609, 284–292.

de Lanerolle, N.C.,Kim, J.H., Robbins, R.J., Spencer, D.D. (1989). Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. Brain Res 495:387–395.

Douglas, R., Martin K. A. C. (2004). Neuronal circuits of the neocortex. Ann. Rev. Neurosci. 27(1), 419-451.Santos-Torres, J., Heredia, M., Riolobos, A. S., Jimenez-Díaz, L., Gómez-Bautista, V., de la Fuente, A., Criado, J. M., Navarr-López, J., Yajeya, J. (2009). J. Neurotrauma. 26: 1593-1607.

Ebrahimi-Gaillard A, Beck T, Gaillard F, Wree A, Roger M. Transplants of embryonic cortical tissue placed in the previously damaged frontal cortex of adult rats: local cerebral glucose utilization following execution of forelimb movements. Neuroscience. 1995 Jan;64(1):49-60.

Espuny-Camacho, I., Michelsen, K.A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., Lambert, N., Potier, D., Aerts, S., Gaspard, N., Péron, S., Schiffmann, S.N., Giugliano, M., Gaillard, A., Vanderhaeghen, P. (2013). Corticogenesis from human pluripotent stem cells leads to the generation of pyramidal neurons with diverse and complex hodological properties. Neuron 77(3): 440-456.

Ferland, R. J., Cherry, T. J., Preware, P. O., Morrisey, E. E., Walsh, C. A. (2003). Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. J. Comp. Neurol. 460(2): 266-279.

Gaillard, A., Gaillard, F., and Roger, M. (1998). Neocortical grafting to newborn and adult rats: developmental, anatomical and functional aspects. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 148, 1–86.

Gaillard, A., Decressac, M., Frappé, I., Fernagut, P. O., Prestoz, L., Besnard, S., Jaber, M. (2009). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. Neurobiol. Dis. 35: 477-488.

Gaillard, A., Prestoz, L., Dumartin, B., Cantereau, A., Morel, F., Roger, M., Jaber, M. (2007). Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. Nat. Neurosci. 10: 1294-1299.

Gaspard N, Bouschet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Ameele J, Espuny-Camacho I, Herpoel A, Passante L, Schiffmann SN, Gaillard A, Vanderhaeghen P. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. Nature. 2008 Sep 18;455(7211):351-7.

Gelman, D.M., Martini, F.J., Nobrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessaris, N. & Marin, O. (2009). The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. J. Neurosci. 29:9380–9389.

Greig, L. F., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. Nat. Rev. Neurosci. 14(11): 755-769.

Hendry, S. H., Schwark, H. D., Jones, E. G., and Yan, J. (1987). Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. J. Neurosci. 7, 1503–1519.

Hunt RF, Girskis KM, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Baraban SC. GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior. Nat Neurosci. 2013 Jun;16(6):692-7.

Jones, E. G. (1984). Laminar distribution of cortical efferent cells. In Cerebral Cortex, Vol. 1: Cellular Components of the Cerebral Cortex, A. Peters and E. G. Jones, eds., pp. 521-553, Plenum, New York.

Klein A, Lane EL, Dunnett SB. Brain repair in a unilateral rat model of Huntington's disease: new insights into impairment and restoration of forelimb movement patterns. Cell Transplant. 2013;22(10):1735-51.

Leone, D. P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., McConnell, S. K. (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. Curr. Opin. Neurobiol. 18: 28-35.

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

Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, Brock J, Blesch A, Rosenzweig ES, Havton LA, Zheng B, Conner JM, Marsala M, Tuszynski MH. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. Cell. 2012 Sep 14;150(6):1264-73.

Maisano X, Litvina E, Tagliatela S, Aaron GB, Grabel LB, Naegele JR. Differentiation and functional incorporation of embryonic stem cell-derived GABAergic interneurons in the dentate gyrus of mice with temporal lobe epilepsy. J Neurosci. 2012; 32:46–61.

Marín, O., Rubenstein, J.L. (2003). Cell migration in the forebrain. Annu Rev Neurosci 26: 441-483.

Michelsen, K.A., Acosta-Verdugo, S., Benoit-Marand, M., Espuny-Camacho, I., Gaspard, N., Saha, B., Gaillard, A., Vanderhaeghen, P. (2015). Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells. Neuron 85(5): 982-997.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nat. Rev. Neurosci. 8: 427-437.

Okabe M¹, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett. 407(3): 313-319.

Plumet, J., Ebrahimi, A., Guitet, J., Roger, M. (1993). Partial recovery of skilled forelimb reaching after transplantation of fetal cortical tissue in adult rats with motor cortex lesion - anatomical and functional aspects. Restor. Neurol. Neurosci. 6: 9-27.

Roger M, Ebrahimi-Gaillard A. Anatomical and functional characteristics of fetal neocortex transplanted into the neocortex of newborn or adult rats. Rev Neurosci. 1994 Jan-Mar;5(1):11-26

Schwab ME. Nogo and axon regeneration. Curr Opin Neurobiol. 2004 Feb;14(1):118-24

Spreafico, R., Battaglia, G., Arcelli, P., Andermann, F., Dubeau, F., Palmini, A., Olivier, A., Villemure, J.G., Tampieri, D., Avanzini, G., Avoli, M. (1998) Cortical dysplasia: An immunocytochemical study of three patients. Neurology 50:27–36.

Thompson, L. H., Grealish, S., Kirik, D., Björklund, A. (2009). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. Eur. J. Neurosci. 30: 625-638.

Wonders, C.P., Anderson, S.A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. Nat Rev Neurosci. 7(9):687-696.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: (**A-T**) Confocal images of GFP (green), PSA-NCAM (red), GFAP (blue) labeling from day 2 (D2) to day 30 (D30) after transplantation. (**A-P**) Grafts were composed of immature neural cell types as revealed by immunochemistry for GFP and PSA-NCAM. (**Q-S**) Grafted cells no longer expressed PSA-NCAM at day 30. (**A, D, E, H, I, L, M, P, Q, T**) Immunohistochemistry for glial marker (GFAP) showed that the

grafts also contained differentiated astrocytes. Note that not many GFAP expressing astrocytes were present at the host-graft interface. Scale bar: 130µm.

Figure 2: Confocal images of GFP/doublecortin (DCX) labeling from 2 to 7 days (D2 to D7) after transplantation. **(A-I)** Many of the GFP (green) grafted cells with neuroblast morphology expressed DCX (red). Scale bars: 130µm.

Figure 3: Development and maturation of axons of grafted GFP neurons from day 2 (D2) to day 30 (D30) post-transplantation. (**A-C, G-I**) Immunohistochemistry for GFP (green) and DXC (red) shows that many GFP+ fibers co-express DCX. (**D-F, J-O**) Immunohistochemistry for GFP (green) and PSA-NCAM (red) shows GFP axons co-expressing PSA-NCAM. GFP+ fibers co-expressing DCX or PSA-NCAM leave the graft and extend through the cortex and the corpus callosum ipsilateral to the transplant. Note that co-expression of DCX or PSA-NCAM by axons of grafted neurons decreased in relation with the post-transplantation time, indicative of the maturation of GFP axons. cc, corpus callosum; Cpu, caudate putamen; Cx, cortex; Scale bars: **A-C**: 55µm; **D-O**: 80µm.

Figure 4: (**A-G**) Confocal images of GFP (green) and NeuN (red) from 7 to 30 days after transplantation showing an increase of the density of mature neurons within the graft in function of the time post transplantation. Scale bar: 150µm.

Figure 5: (**A-R**) Expression of cortical layer-specific transcription factors within the graft from D2 to D30. (**A-J**) Immunohistochemistry for GFP (green) and the transcription factors Ctip2 (red) and Cux1 (blue) within the graft and host cortex from D2 to D30. (**G**, **H**) The superficial and deep cortical layers of the host cortex are labeled by Cux1 (blue, layers II-IV) and Ctip2 (red, layers V-VI). (**G**, **H**, **I**, **J**). The grafts were organized in clusters in which Ctip2 and Cux1 expression tends to be mutually exclusive. (**K-T**) Immunohistochemistry for GFP (green) and the transcription factors Foxp2 (red) and

Tbr1 (blue) within the graft and host cortex from D2 to D30. (**K-T**) Tbr1+ and Foxp2+ cells were uniformly distributed through the grafts and the majority of the labeled cells co-expressed both markers corresponding to deep layer neurons (Tbr1, Foxp2). Scale bar: 150µm.

Figure 6: Quantification of the percentage of BrdU+ cells within the grafts co-expressing Cux1, Ctip2 or Foxp2 at day two and four post-grafting.

Figure 7: Differentiation of grafted GFP+ cells (green) in (**A-C**) glutamatergic neurons (red), or (**D-F**) GABAergic neurons (red) at 30 days post-transplantation. Arrows show grafted neurons expressing glutamate or GABA. Scale bar: 40µm.

Labelled structures	Days after transplantation				
	Day 2	Day 4	Day 7	Day 14	Day 30
Cortical projections					
Motor cortices	*	*	****	****/**	****/*
Somatosensory cortices	*	*	***	****/**	****/*
Cingulate cortex			*	****/*	****/*
Retrosplenial cortices				**	**
Orbital and Insular cortices			*	**/*	**/*
Prelimbic and infralimbic cortices				****/*	****/*
Auditory cortex				**	***
Telencephalic and diencephalic projections					
Corpus collasum		*	*/*	****/**	****/**
Caudate putamen			*	****/**	****/*
Internal capsule				*	*
Ventral lateral nucleus				*	*
Reticular thalamic nucleus				*	*
Cerebral peduncle				*	*

Table 1



<u>Figure 1</u>



Figure 2



Figure 3



<u>Figure 4</u>



<u>Figure 5</u>




<u>Figure 7</u>

Résumé de l'article 2 (en préparation)

Interleukine 33 favorise la croissance axonale des neurones embryonnaires greffés dans le cortex moteur

Les pathologies du système nerveux central (SNC), qu'elles soient d'origines traumatique, vasculaire ou dégénérative, sont associées à des déficits fonctionnels importants et irréversibles. Certains facteurs inhibiteurs de croissance rendent le SNC peu permissif à la repousse axonale (Davies et al., 1997 ; 1999 ; pour revue, Wang et al., 2012). Afin de pallier cette capacité limitée de régénération spontanée des neurones, la transplantation cellulaire de tissu embryonnaire présente une stratégie thérapeutique prometteuse pour le cerveau adulte endommagé. En effet, il a été démontré que la transplantation de neurones embryonnaires corticaux immédiatement après la lésion du cortex moteur adulte permet la reconstruction anatomique des voies motrices lésées, les neurones transplantés développent les projections axonales vers les cibles corticales appropriées y compris sur de longue distance vers la moelle épinière (Gaillard et al., 2007).

Différents facteurs peuvent influencer la survie, l'organisation cellulaire du transplant et le développement des projections par les neurones transplantés. Par exemple, l'âge du donneur et du receveur (Dunnett et Björklund, 1994; Gaillard et al., 1998; 2004), la présence ou l'absence d'une lésion (Castro et al, 1985 ; Gaillard et Jaber, 2007) ou l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation. En effet, il a été démontré que l'introduction d'un délai semble être bénéfique pour la survie (Nieto-Sampedro et al., 1983), la taille (Grabowski et al., 1994) et le développement du transplant (Gibbs and Cotman, 1987; Gonzalez and Sharp, 1987). Ainsi, nous avons récemment montré des effets bénéfiques de l'introduction d'un délai d'une semaine entre la lésion et la transplantation corticale aussi bien au niveau de la récupération fonctionnelle que neuroanatomique. En effet, la présence d'un délai d'une semaine augmente la taille du transplant, la prolifération cellulaire, la vascularisation et le nombre

de projections développées par les neurones greffés (Péron et al., 2015). Plusieurs facteurs peuvent être le support de ces observations tels que la libération de facteurs trophiques (Nieto-Sampedro et al., 1983), la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (Sköld et al., 2005, Dray et al., 2009), la diminution des niveaux des toxines (Gonzalez et Sharp, 1987) et le niveau de l'inflammation en réponse à la lésion et la transplantation.

Suite à toute lésion ou entrée d'un agent infectieux dans le SNC, une réaction inflammatoire est déclenchée induisant l'activation des médiateurs cellulaires de la neuro-inflammation, principalement les cellules gliales (Russo et al, 1991). La microglie, les astrocytes et les oligodendrocytes seront activés et recrutés au niveau du site de lésion. De plus, une lésion est associée à une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), permettant la migration des cellules hématopoïétiques du sang vers le site de lésion. Ce processus passe par l'intermédiaire des cytokines et des chimiokines secrétées après la lésion (Schmidt et al., 2005). On notera notamment la présence de cytokines proinflammatoires comme IL-1, IL-6, TNF- α et LIF et de cytokines anti-inflammatoires comme TGF-B, IL-4 and IL10 (Woodcock et al., 2013). L'IL-33, une nouvelle cytokine récemment découverte, est aussi exprimée dans le SNC. Cette cytokine également connue sous le nom d'« alarmine » appartenant à la famille d'IL-1. Elle est libérée par les cellules en nécrose et joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée (Hudson et al., 2008). Il a été démontré que l'IL-33 présente un effet bénéfique dans les modèles de lésion tels que la lésion ischémique (Korhonen et al., 2015) et la lésion de la moelle épinière (Gadani et al., 2015). Cependant, le rôle de l'IL-33 dans la régulation de l'inflammation après une lésion dans le SNC reste méconnu.

Beaucoup de travaux de recherches se sont consacrés à l'étude du rôle de l'inflammation post-lésionnelle et de ses conséquences sur la régénération axonale au niveau du cerveau adulte. Cependant, peu d'études se sont investis à déterminer le rôle bénéfique ou délétère de l'inflammation sur le développement des axones de neurones greffés dans le cerveau endommagé adulte.

Ainsi, l'objectif de notre étude était de savoir si l'inflammation post-lésionnelle est impliquée dans l'amélioration observée chez les animaux greffés avec un délai d'une semaine en comparaison des animaux transplantés immédiatement après la lésion corticale.

Autrement dit, l'objectif de notre étude était de comprendre comment l'inflammation post-lésionnelle peut influencer la survie des neurones greffés et le développement de leurs projections dans un modèle de lésion corticale ; et, inversement, comment les cellules transplantées peuvent influencer l'inflammation. De plus, nous avons étudié, en collaboration avec les Drs André Herbelin et Jean-Marc Gombert (IRTOMIT, INSERM U-1082, CHU de Poitiers), l'expression d'IL-33 après la lésion et la transplantation corticale ainsi que son rôle bénéfique ou délétère sur le développement du transplant.

Tout d'abord, l'étude a été réalisée dans un modèle de lésion unilatérale par aspiration du cortex moteur adulte. Après sacrifice à différents temps post-lésionnels, l'expression des cellules gliales et de l'IL-33 a été étudiée par des marquages immunohistochimiques et l'expression des cytokines a été analysée par l'hybridation in situ. Nous avons par la suite réalisé une transplantation homotopique de tissu embryonnaire cortical moteur prélevé à E14 surexprimant la GFP sous le contrôle du promoteur l'actine- β . Suite à la lésion corticale, des souris adultes ont été transplantées soit immédiatement après la lésion soit une semaine plus tard. Après sacrifice à différents temps post-transplantation, l'expression des cellules gliales et de l'IL-33 a été étudiée par des marquages immuno-histochimiques.

Nos résultats montrent que sept jours après la lésion, l'expression des astrocytes (GFAP), de la microglie (Iba1) et des oligodendrocytes (Olig2) est plus élevée par comparaison de celle observée dans le groupe contrôle et le groupe Jour 0 (lésé et perfusé immédiatement après la lésion) au niveau du site de lésion. Nous avons détecté un changement de morphologie des astrocytes et de la microglie entre le groupe contrôle et le groupe Jour 7 (perfusé 7 jours après la lésion). Dans le groupe contrôle, les astrocytes présentent une forme étoilée et 7 jours post-lésion, ils adoptent une forme hypertrophiée avec des filaments prolongés. Parallèlement, la microglie passe d'une forme ramifiée dans le groupe contrôle à une forme amiboïde activée 7 jours après la lésion.

En utilisant l'hybridation in situ, nous avons montré une augmentation du niveau d'expression de TGF- β 1, un facteur anti-inflammatoire, 24 heures après la lésion corticale avec un pic à 4 jours post-lésion. Cette expression diminue 7 jours après la lésion mais est toujours présente. De façon intéressante, nous avons montré qu'une partie des cellules exprimant TGF- β 1 co-expriment Iba1 un marqueur de cellules microgliales. De plus nous avons montré précédemment qu'un délai d'une semaine entre la lésion corticale et la transplantation favorise l'angiogenèse au sein du transplant. Il a été montré que TGF- β 1 est un facteur proangiogénique induisant l'angiogenèse (Madri et al., 1988; Roberts et al., 1986; Yang & Moses 1990; Evrard et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la vascularisation au sein du transplant peut être en partie provoquée par une activation des cellules microgliales secrétant TGF- β 1 qui à leurs tours favorisent l'angiogenèse.

Ce travail de thèse a également permis d'étudier l'expression d'IL-33 suite à une lésion corticale. En effet, de nombreux travaux se sont attelés à décrire l'importance de l'alarmine IL-33 dans des pathologies du SNC comme la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaques (Chapuis et al., 2009 ; Jiang et al., 2012). Nous avons montré, dans notre modèle, une augmentation immédiate de l'expression d'IL-33 après lésion corticale mettant en évidence son rôle d'alarmine. Cette augmentation persiste jusqu'au septième jour post-lésionel puis revient au niveau basal au 45^{ème} jour après la lésion.

Les travaux de Pomeshchik et ses collaborateurs ont montré que l'administration d'une source exogène d'IL-33 suite à une contusion de la moelle épinière induit une augmentation d'expression des marqueurs de la microglie/macrophages de type M2 comme Arginase-1 et Ym-1 (Pomeshchik et al., 2015). Ils ont également observé une réduction de la lésion secondaire ainsi qu'une amélioration de la réparation fonctionnelle révélant le rôle de neuroprotection que joue IL-33 dans leur modèle (Pomeshchik et al., 2015). De même, ce rôle protecteur a été mis en évidence, dans un modèle d'ischémie, en induisant la sécrétion de l'IL-4 (Korhonen et al., 2015). Il est possible d'envisager que l'augmentation endogène d'IL33 observée après la lésion corticale dans notre modèle correspond à une tentative de neuroprotection mise en place contre la lésion.

Il est important de connaître la source cellulaire à l'origine d'une augmentation de l'expression d'IL33 suite à une lésion corticale. Les résultats de la littérature à ce sujet sont controversés. Certains travaux rapportent que l'IL-33 est exprimée par les astrocytes (Yasuoka et al., 2011 ; Pomeshchik et al., 2015). Cependant, d'autres travaux montrent que l'IL-33 est exprimée principalement par les oligodendrocytes (Gadani et al., 2015). Nos travaux montrent que, 7 jours après la lésion, l'expression de l'IL-33 par les astrocytes, la microglie, les neurones et les cellules hématopoïétiques est faible. En revanche, cette expression est plus élevée par les oligodendrocytes. Ceci suggèrent que les cellules gliales résidentes et les cellules hématopoïétiques dans le cortex lésé ne seraient pas la source principale d'IL-33 en raison d'un pourcentage de co-localisation, tous types cellulaires confondu, n'excèdant pas les 25%.

Après la transplantation, nos résultats montrent que l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation n'altère pas l'expression de la microglie. En revanche, l'expression de GFAP est plus élevée aux alentours du transplant et dans le transplant dans le groupe transplanté une semaine après la lésion que le groupe transplanté sans délai. Les astrocytes hypertrophiques apparaissent juxtaposés aux bords de la greffe, en effet les astrocytes adoptaient une morphologie allongée et sont principalement orientés perpendiculairement aux axones issus des neurones greffés. Nous avons observé une augmentation de l'expression d'Olig2 dans le greffon transplanté avec délai par comparaison de groupe transplanté sans délai. L'immunoréactivité des cellules IL-33 est plus élevée dans le transplant avec délai par rapport au group transplanté sans délai. La caractérisation phénotypique des cellules IL-33+ montre que la majorité sont des oligodendrocytes Olig2+ et peu sont des astrocytes, microglie, neurones et cellules hématopoïétiques. Nous avons observé que la majorité des cellules IL-33+ dans le transplant n'expriment pas la GFP. Ceci suggèrent que le tissue hôte peux être l'origine des cellules IL-33+/GFP- dans le transplant. En effet, en utilisant des souris déficientes pour IL-33 comme receveur, nous avons montré une diminution importante des cellules IL-33+ dans le transplant montrant la migration de cellules IL-33+ depuis l'hôte vers le transplant. De façon intéressante, chez les souris déficientes pour IL-33 transplantées, nous avons montré une diminution importante du nombre de fibres innervant les régions corticales et sous corticales qui recoivent des projections du cortex moteur. De plus les projections observées ne se trouvent pas dans des régions sous corticales plus éloigné que le striatum. Ces résultats suggèrent que IL-33 joue un rôle favorable dans le développent des axones de neurones greffés et par la voie de conséquences son inactivation diminue les projections issues de neurone greffés.

Interleukin 33 promotes axonal outgrowth of embryonic cortical neurons grafted into injured adult motor cortex

Nissrine Ballout^{1,2,3,4}, Tristan Rochelle^{1,2}, Sebastien Brot^{1,2}, Maureen Francheteau^{1,2}, Jean-Marc Gombert⁵, Andre Herbelin⁵, Laetitia Prestoz^{1,2}, Kazem Zibara^{3,4}, Afsaneh Gaillard^{1,2*}

¹ INSERM, U1084, F-86022 Poitiers, France.

² Université de Poitiers, U1084, F-86022 Poitiers, France.

³ ER045 - Laboratory of Stem Cells, PRASE, DSST, Beirut, Lebanon.

⁴ Faculty of Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon.

⁵INSERM, U1082, Université de Poitiers, CHU de Poitiers, F-86021, Poitiers-France.

*To whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques-LNEC, INSERM U-1084, Université de Poitiers, Bldg B36, 1 rue Georges Bonnet, BP 633, TSA 51106, 86073 POITIERS cedex 9 – France. Email: <u>afsaneh.gaillard@univ-poitiers.fr</u>

ABSTRACT

Introducing a delay between cortical lesion and cell transplantation can significantly enhance graft vascularization, survival and the re-establishment of appropriate transplantto-host projections, all this being associated with better functional recovery. The purpose of the present study is to understand the extent to which post-traumatic inflammation following cortical lesion could influence the survival of grafted neurons and the development of their projections to target brain regions and conversely how transplanted cells can modulate post-traumatic inflammation. For this, we have used an adult animal model of cortical lesion that was homotopically transplanted with embryonic motor cortical tissue. We have then performed immunohistochemistry analysis to study the density and cell morphology of resident immune, peripheral infiltrating cells and in situ hybridization to analyze the distribution and temporal mRNA expression pattern of proinflammatory or anti-inflammatory cytokines following cortical lesion alone or following transplantation. Our results show that seven days after the lesion, the number of astrocytes, microglia, oligodendrocytes and CD45+ cells was significantly increased. Interestingly, a part of microglia co-expressed TGF- β 1, an anti-inflammatory cytokine, supporting the hypothesis that microglial activation is also neuroprotective. By using, IL-33 KO mice, we have shown for the first time that the absence of IL-33 decreased the axonal outgrowth of transplanted neurons. Therefore, cell transplantation with a oneweek delay in combination with IL-33 treatment may offer a novel therapeutic strategy following cortical injury.

INTRODUCTION

Loss of cortical neurons is a common characteristic of numerous neuropathological conditions. The inhibitory nature of the adult mammalian central nervous system (CNS) prevents spontaneous axonal regeneration following injury (Davies et al., 1997; 1999). One way to overcome the limited regenerative capacity of the adult CNS is transplantation of embryonic neurons. We have previously reported that embryonic cortical neurons grafted into the adult mouse motor cortex immediately after a cortical lesion allowed reestablishment of the damaged motor pathways. The transplanted neurons develop projections towards all cortical and subcortical targets of the motor cortex, including distant targets such as the spinal cord (Gaillard et al., 2007). While the results of this study were encouraging for CNS repair, a serious limitation to consider such approaches in a clinical setting is the delay of transplantation after injury. We have recently shown that a one-week delay between the cortical lesion and transplantation can significantly enhance graft vascularization, cell proliferation, survival and density of projections developed by grafted neurons, leading to a beneficial impact on functional repair and recovery (Péron et al., 2015 submitted). However, mechanisms responsible for this improvement are not well defined. It has been hypothesized that potential benefits of introducing a delay between the lesion and transplantation may be due to the release of trophic factors secreted by cells surrounding the lesion (Nieto-Sampedro et al., 1983), the secretion of pro-angiogenic factors (Sköld et al., 2005, Dray et al., 2009), or a decrease in toxin (Gonzalez and Sharp, 1987) and inflammation levels, characterized by activated microglia and astrocytes (Zhang et al., 2010). Microglia, the resident innate immune cells in the brain, is an active contributor to neuron damage in neurodegenerative diseases

(Block et al., 2007). In acute injury, microglial response generally reaches its maximum at 5-7 days after injury (Ladeby et al., 2005), before gradually disappearing. After activation, microglial cells proliferate and migrate to the site of injury where they contribute to cell damage by releasing pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 and 6 (IL-1, IL-6), tumor necrosis factor, (TNF) and leukaemia inhibitory factor (LIF) (Chao et al. 1995). Additionally, activated microglia may promote neuronal survival by removing cell debris (Rapalino et al. 1998) and releasing protective neurotrophic factors such as Nerve Growth Factor (NGF), Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) or Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Madinier et al., 2009, Neumann et al., 2006, Schwartz et al., 2006). Furthermore, microglia cells secrete anti-inflammatory cytokines such as Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1, Kiefer et al., 1995), interleukin 4 and 10 (IL-4, IL-10).

The astrocyte activation may also have antagonistic effects (Farina et al., 2007). For example, the production of neurotrophic factors by astrocytes may promote neuronal survival (Faulkner et al., 2004, Myer et al., 2006, Sofroniew, 2005, Vinters and Sofroniew, 2010). Conversely, glial scar formation impairs adult CNS regeneration (Itoh et al., 2007, Rolls et al., 2009, Wanner et al., 2008).

Interleukin 33 (IL-33), a new cytokine of the IL-1 superfamily, can function as an alarmin that is released following cell necrosis to alert the immune system to tissue damage or stress. Mouse CNS expresses IL-33 in astrocytes and endothelial cells (Hudson et al., 2008; Yasuoka et al., 2011). On the other hand, treatment with IL-33 induces proliferation of microglia and enhances production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF α , as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10

116

(Yasuoka et al., 2011). It was also demonstrated that IL-33 has a beneficial effect in stroke models such as ischemia (Korhonen et al., 2015) and spinal cord injury (Gadani et al., 2015). These results show that the pro or anti-inflammatory effects of IL-33 depend on the disease and the model.

The impact of the inflammatory response on neuronal survival seems to depend on a balance between pro- and anti-inflammatory mechanisms induced by different mediators (Bernardino et al., 2005, Vezzani et al., 2008). Considerable effort has been devoted to the study of changes occuring in the post-lesional environment and their effects on axonal regeneration in adult CNS. However, few studies have been dedicated to the roles of these changes in axonal growth of transplanted embryonic neurons in the injured adult brain. The purpose of the present study is to explore the effect of transplanted cells on the host local inflammatory environment and to understand the extent to which inflammation following cortical lesion could influence the survival of grafted neurons and the development of their projections. For this, following cortical lesion and transplantation, the density and morphology of resident immune and peripheral infiltrating cells were studied in addition to the distribution and temporal mRNA expression pattern of pro- or anti-inflammatory cytokines, including IL-33.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animal experimental procedures and housing were carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 87849) and the European Communities Council Directive (2010/63/EU). All experiments were

conducted in compliance with current Good Clinical Practice standards and in accordance with relevant guidelines and regulations and the principles set forth under the Declaration of Helsinki (1989). All efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering. A total of 84 C57BL/6 and 20 IL-33 KO mice were used in this study, of which 12 mice were used as controls (without a lesion), 36 mice were lesioned and 56 mice were lesioned and transplanted.

Lesion and transplantation procedures

Adult (4-6 months old) C57BL/6 mice (n=72, Janvier, France) and IL-33 KO mice (n=20, Pichery et al., 2012) were lesioned. Briefly, animals were anaesthetized with avertin (intra-peritoneal, ip., 250 mg per kg of body weight) and the motor cortex was aspirated from 0.5-2.5 mm rostral to the Bregma and from 0.5-2.5 mm lateral to the midline, with the corpus callosum left intact. Among these mice, 36 were transplanted as described previously (Ebrahimi-Gaillard et al., 1995; Gaillard et al., 1998). Motor cortical tissue was obtained from embryonic day 14 transgenic mice embryos overexpressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of a chicken beta-actin promotor (C57BL/6-TgN(beta-act-EGFP) Osb strain (Okabe et al., 1997). Motor cortical tissue was deposited into the host lesion cavity either immediately (n=28) or 7 days (n=28) after the lesion. Care was taken to maintain the original dorso-ventral and anteroposterior orientations of the cortical fragments during the transplantation procedure.

Tissue processing

Mice were injected with a lethal dose of avertin and perfused transcardiacally with 150 ml of saline (0.9%), followed by 300 ml of ice-cold paraformaldehyde (PFA, 4%) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were removed, post-fixed in 4% PFA overnight at 4°C, cryoprotected in 30% (w/v) sucrose, 0.1 M sodium phosphate solution (pH 7.4). For immunohistochemistry experiments, brains were cut in 6 series on a freezing microtome (Microm HM450, Thermo Scientific) in 40 μ m-thick coronal sections and stored in a cryoprotective solution (20% glucose, 40% ethylene glycol, 0.025% sodium azide, 0.05M phosphate buffer, pH 7.4). For in situ hybridization (ISH), brains were collected the day of lesion (D0, n=6), 4 days (D4, n=6) or 7 days (D7, n=6) after the lesion and cryoprotected by quickly freezing in isopentane (2-methylbutane, VWR) cooled at -45°C. Brains were then cut in 6 series on a cryostat (HM550, Microm) in 16 μ m-thick coronal sections, mounted on super frost slides (Superfrost Plus, VWR) and stored at -80 °C.

Immunohistochemistry (IHC)

Free-floating sections were incubated in a blocking solution (3% bovine serum, 0.3% triton X-100 in PBS 0.1M, pH 7.4) for 90 minutes at room temperature (RT). Primary antibodies, diluted in blocking solution, were applied overnight at 4°C. Appropriate secondary antibodies were diluted in blocking solution and applied for 1h at RT. The following antibodies were used in this study to label activated microglia, hematopoietic cells, astrocytes, oligodendrocytes and neurons, respectively: rabbit anti-Iba1 (1:500, Wako), rat anti-CD45 (1:500, Abcam), chicken anti-GFAP (1:1000, Abcam), rabbit anti-

olig2 (1:500, Millipore) and mouse anti-NeuN (1:500, Millipore), Chicken anti-GFP (1:1000, Abcam) or Rabbit anti-GFP (1:1000, Invitrogen). For IL-33 staining, goat anti-IL-33 (1:500, R&D systems) was used, and nuclei were labelled with DAPI (1:2000, Sigma). The sections were covered with DePeX (VWR) mounting medium.

In situ hybridization (ISH)

ISH was performed in order to characterize the spatiotemporal expression of proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , and LIF and anti-inflammatory cytokines: TGF^β1, IL-4 and IL-10, several days after cortical lesion. Specific digoxygenin-labeled cRNA probes were prepared from cDNA fragments (450bp to 800bp) of these murine cytokines. cDNAs were amplified by PCR using specific primers from cDNA banks obtained from different sources (Brain, liver, spleen, skin, adipose tissue and LPS-treated Bone marrow-derived macrophages). cDNA fragments were then cloned in pGEM®-T Easy vectors (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and verified by sequencing. Complementary (antisense) and non-complementary (sense) RNA probes were produced using T7 or SP6 RNA polymerase (Riboprobes® System-T7, Promega Corporation, Madison, USA). Before being exposed to the probes, sections were digested by proteinase K (5µg/ml) for 10 min at 37°C followed by an acetylation step in triethanolamine buffer (100mM triethanolamine, 0.25% acetic anhydride) to reduce non-specific binding. Hybridization was carried out overnight at 65°C in a humidified chamber using probes at a final concentration of 500 ng/ml diluted in hybridization buffer containing 50% formamide, 1X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 1mg/ml yeast tRNA in salt solution (200mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5,

10mM phosphate buffer pH 7.4, 5mM EDTA pH 8). The following day, sections were washed in 1X sodium saline citrate (SSC), 50% formamide, 0.1% Tween 20 at 65 °C, and in MABT buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M Maleic acid, 0.2 M NaOH, 0.1% Tween 20, pH 7.5) at RT. After blocking in 10% B10 reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 10% sheep serum, sections were incubated overnight at RT with an alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin antibody (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) diluted 1:2000 in blocking buffer. Sections were finally washed with NTMT buffer (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.05 M MgCl2, 0.1 M Tween 20, pH 9.5) before being incubated in detection buffer containing 0.045% nitroblue tetrazolium, 0.35% 5-bromo-4-chloro-3-idolyl phosphate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.1% levamisole (Sigma) in NTMT buffer. Slides were then dried and mounted with Depex (BDH Laboratories, Poole, England). All results with antisense probes were compared with sense probes and were confirmed by testing six animals for each group. Anti-Iba1 antibody was used to define whether macrophage/microglia could be the source of IL-1 β and TGF- β 1. Briefly, after ISH, sections were incubated in blocking solution (3% bovine serum, 0.3% triton X-100 in PBS 0.1M, pH 7.4) at RT for 90 minutes. Anti-Iba1 primary antibody (1:500, Wako) diluted in blocking solution was applied overnight at 4°C. Sections were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:200; Vector Burlingame, CA) at RT for 1h30 minutes. After washing, sections were treated with 0.3% hydrogen peroxide (Sigma, Seelze, Germany) to quench endogenous peroxidases and were reacted with avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain® ABC Kit, Vector, Burlingame, CA) at RT for 1h. The sections were subsequently incubated in 0.1 M PB containing 0.33 mg/ml 3-3-diaminobenzidine

tetrahydrochloride (Sigma, St Louis, USA) and 0.0006% hydrogen peroxide. Mounted sections were dried and covered with Depex (BDH, Poole, England).

Data acquisition and quantification

For each mouse, mosaic images of injury area were acquired with a Zeiss Axio Imager.M2 Apotome microscope at x20 magnification, at the rostral middle and caudal part of the lesion or the graft. On mosaic acquisition, six images corresponding to the areas of interest were used for all quantifications using ZEN software (Zeiss). For control mice, equivalent sections were selected at the same antero-posterior coordinates as the lesioned sections. Areas of interest were further analyzed and photographed with a confocal laser-scanning microscope FV1000 (Olympus, France).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a two-tailed student's t test or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni correction. Data are expressed as mean \pm SEM. Differences were considered statistically significant when p<0.05, p<0.001, p<0.0001 (*, **, ***; respectively).

RESULTS

Cortical lesion increases brain resident immune and peripheral infiltrating cells

To examine the effects of cortical lesion on the number of resident immune cells and peripheral infiltrating cells in the injured cortex, IHC was used to identify GFAP+ astrocytes, Iba-1+ microglial cells/macrophages, Olig2+ oligodendrocytes and CD45+ hematopoietic cells. Mice were divided into 3 groups: control group (without lesion), Day 0 of lesion group or Day 7 after the lesion group, corresponding to the time of grafting after initiation of the lesion. As expected, the basal level of number of GFAP+ cells in the cortex of control group was low (13 ± 2) (Fig. 1D, P) and immunoreactivity was also low for Iba1 (279±29; Fig. 1G, P); Olig2+ (240±17; Fig. 1J, P) and CD45 (17± 2; Fig. 1M, P). At the day of lesion (day 0), the number of cells slightly increased around the cortical lesioned area (GFAP: 31±6; Iba1: 415±34; Olig2: 277±28; CD45: 32±3) (Figs. 1E, H, K, N, P). At day 7, the number of astrocytes (721±43), microglia (1907±82), oligodendrocytes (925 ± 36) and hematopoietic CD45+ cells (683 ± 51) was significantly increased in comparison to control and day 0 groups (***, p<0.0001) (Fig. 1F, I, L, O, P). In addition, microglia showed morphological changes, became activated and presented an amoeboid morphology (Fig. 11). Thus, a delay of one week after cortical lesion results in the recruitment and activation of inflammatory brain resident mediators and peripheral infiltrating cells.

Cortical transplantation modified brain resident immune and peripheral infiltrating cells

The effects of cortical transplantation, with or without delay after the lesion, was then examined on the number of resident and peripheral infiltrating immune cells, 7 days after transplantation in the injured cortex as well as in the graft. To achieve this, the same previous markers were used in two groups of transplanted animals.

The number of microglial and hematopoietic cells were not significantly different between the two groups of transplanted animals whether in the host cortex adjacent to the transplant (Iba1+ cells, No delay: 1329±57; delay: 1349±47) (Fig. 2I-P, 4) (CD45+ cells, No delay: 666 ± 38 ; delay: 596 ± 30) (Fig. 3I-P, 4) or in the transplant (Iba1+ cells, No delay: 196±15; delay: 191±11) (Fig. 2I-P, 4), (CD45+ cells, No delay: 191±15; delay: 149 ± 11) (Fig. 2I-P, 4). Furthermore, a significant increase in the number of astrocytes was observed in the host cortex adjacent to the transplant in the group of animals transplanted with a one-week delay, compared to the group without delay (GFAP cells, No delay: 632±75; delay: 1047±61) (Fig. 2A-H, 4). A similar significant increase in astrocytes was also detected in the transplant (No delay: 68 ± 16 ; delay: 610 ± 109) (Fig. 2A-H, 4). Moreover, while numerous oligodendrocytes were detected in the host cortex adjacent to the transplant, no significant difference was found between the two groups (Olig2, No delay: 740±50; delay: 729±58) (Fig. 3A-H, 4). However, a significant increase was observed in the transplant for the group of mice transplanted with a oneweek delay, in comparison to that without delay (Olig2, No delay: 209±20; delay: 1163±84) (Fig. 3A-H, 4). Our results showed that a one-week delay between lesion and transplantation enhanced the number of astrocytes in the host adjacent cortex as well as in the graft, whereas oligodendrocytes increased only within the graft.

Expression of IL-33 following cortical lesion

IL-33 was found to be expressed in control adult cortex without any lesion $(126\pm14;$ Fig. 5A, B, I) whereas cortical lesion induced a significant increase in the number of IL-33+ cells immediately after lesion (Day 0 group) (381±50; ***, p<0.0001; Fig. 5C, D, I) indicating the alarmin role of IL-33 in the CNS. Moreover, the expression of IL-33 was further significantly increased after 7 days of lesion (543±36, Fig. 5E, F, I), in comparison to lesion at day 0 (*, p<0.05) and control groups (***, p<0.0001). On the other hand, the number of IL-33+ cells returned to basal levels after 45 days of cortical lesion (130±6, Fig. 5G, H, I).

In order to investigate the cellular sources of IL-33 in the cortex, its immunolabelling was combined with markers for astrocytes (GFAP), microglia/macrophages (Iba-1), oligodendrocytes (Olig2), neurons (NeuN) and hematopoietic cells (CD45). Results showed that at day 7 post-lesion, only few IL33+ cells co-expressed GFAP ($0.88\pm0.06\%$, Fig. 6A-D, U), Iba1 (1.76 ± 0.2 ; Fig. 6E-H, U) and NeuN ($0.40\pm0.08\%$; Fig. 6M-P, U). However, about 18% of Olig2+ ($18.13\pm2.42\%$, Fig. 6I-L, U) and 4% CD45+ cells ($4\pm0.43\%$, Fig. 6Q-T, U) co-expressed IL-33.

IL-33 expression increases in the transplant, but not in the host, in the group with delay following cortical transplantation

The effects of transplantation on the number IL33+ cells in the host cortex as well as within the graft was then investigated in two groups of transplanted animals, seven days post-grafting. In both transplanted groups, the mean number of IL-33+ cells decreased in the host cortex adjacent to the transplant (Fig. 7) and was comparable to the level in the control group (126 ± 14 ; Fig. 2A, B, I). There was no significant difference in the expression of IL-33+ cells in the host cortex between the two groups of transplanted animals (No delay: 249 ± 14 ; delay: 200 ± 16 ; Fig. 7A-H, Q). Moreover, we observed the presence of IL-33+ cells in the transplant in both groups, however, the number of IL-33+ cells were significantly higher in the transplant in the group with delay, compared to that without delay (No delay: 65 ± 6 ; delay: 101 ± 3 ; Fig. 7A-H, Q).

Moreover, the majority of IL-33+ cells within the graft did not express GFP, indicating probably their host origin. To investigate graft-versus-host origin of IL-33 cells observed within the graft, E14 GFP motor cortical tissues were transplanted into the lesioned motor cortex of IL-33 KO mice, with or without delay of 7 days. Results showed that IL-33+ cells within the grafts, but not significantly different, in both transplanted groups (No delay: 14 ± 3 ; delay: 18 ± 2 ; Fig. 7I-P, Q). Furthermore, the number of IL-33+ cells within the transplant of wild type were compared to those of IL-33 KO mice. A significant decrease in the number of IL-33+ cells was observed in IL-33 KO mice, in comparison to wild type, suggesting that a part of IL-33+ cells observed within the grafts originated from host IL-33+ cell migration into the graft.

In order to reveal the cellular sources of IL-33 after cortical transplantation, the phenotype of IL-33+ cells was then determined. There was no difference in the percentage of IL-33+ cells co-expressing the markers of astrocyte $(1.2\pm 0.37\%;$ Fig. 8A-H, 9Q), microglia $(2.66\pm0.49\%;$ Fig. 8I-P, 9Q), neurons $(0.33\pm0.06\%;$ Fig. 9A-H, Q) or hematopoietic cells $(4.5\pm0.15\%;$ Fig. 9I-P, Q) between the lesioned and transplanted groups, showing again that none of these cells was the main source of IL-33 detected following transplantation. Strikingly, the percentage of oligodendrocytes co-expressing IL-33 increased in both groups of transplanted animals (No delay: $64\pm3\%$; delay: $72\pm3\%$; Fig. 8Q-X, 9Q).

Absence of IL-33 alters axonal outgrowth of grafted neurons

Given the increased expression of IL-33 after cortical injury, the effect of IL-33 removal on axonal outgrowth of transplanted cortical neurons was analysed. Therefore, to address the role of IL-33 in axonal outgrowth of transplanted neurons, we grafted embryonic cortical tissue obtained from E14 GFP mice into lesioned cortex of IL-33 KO mice, immediately or 7 days following the lesion. Analysis of the projections of grafted neurons 14 and 30 days after transplantation showed a substantial decrease in the number of projections in the group with delay, in comparison to no delay group (Fig.10). Moreover, we have not observed any projections beyond the striatum.

Differential expression kinetics of IL-1β and TGF-β1 following cortical lesion

To evaluate the level of neuroinflammation following cortical lesion, we investigated the spatiotemporal mRNA expression profile of pro- and anti-inflammatory cytokines. IL-1β

and TGF- β 1 exhibited a differential expression at the lesion site, whereas they were neither present in the contralateral side nor outside the lesion site (data not shown).

Expression of IL-1 β and TGF- β 1, using ISH, was not detected in the control cortex without lesion or in the cortex at the day of lesion (Fig. 11A-D, K). However, a strong expression of IL-1 β was observed 4 days after lesion, within the cortex around the lesion cavity (Fig. 11E, K), while IL-1 β expression was undetectable 7 days after the lesion, (Fig. 11I, K). In addition, TGF- β 1 mRNAs were found to be concentrated in the vicinity of the cortical lesion and to a lesser extent in the corpus callosum adjacent to the lesion site, 4 days after injury (Fig. 11F, K). Seven days after the lesion, TGF- β 1 expression decreased, in comparison to day 4, but was still present in the cortex adjacent to the lesion cavity (Fig. 11J, K). Furthermore, microglial/macrophagic phenotype of the cells expressing IL-1 β and TGF- β 1 was analyzed 4 days after the lesion, using anti- Iba1 IHC in combination with ISH, and found that only TGF- β 1+ cells expressed Iba1 marker (Fig. 11G, H). Finally, it's important to note that IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, TNF α and LIF transcripts were not detected at any time point tested (data not shown).

DISCUSSION

We have recently shown that a 7- days delay between the lesion of motor cortex in the adult mouse and homotopic cortical transplantation of embryonic cells can significantly enhance graft vascularization of grafted cells proliferation and survival as well as density projections developed by grafted neurons. Moreover, we have also shown that this delay has beneficial impacts on functional repair and recovery (Péron et al., 2015 submitted). However, the mechanism of action that leads to these positive outcomes is not defined.

We hypothesized that potential benefits of introducing a delay between the lesion and the transplantation may be due, at least in part, to the modulation of neuroinflammation. The present study was designed to determine how a delay between lesion and transplantation could modulate post-traumatic inflammation and whether these modulations have beneficial or deleterious effects.

It has been postulated that potential benefits of introducing a delay between the lesion and the transplantation may result from the release of trophic factors secreted by cells surrounding the lesion (Nieto-Sampedro et al., 1983), the secretion of pro-angiogenic factors (Sköld et al., 2005, Dray et al., 2009), the decrease of toxin levels (Gonzalez and Sharp, 1987) or the modulation of inflammation level.

Here we show that, the number of astrocytes, microglia, oligodendrocytes and CD45+ cells was significantly increased seven days after the lesion, in comparison to the control (without lesion) and day of lesion (D0) groups. In fact, microglial response to cortical injury reaches its maximum level at 7 days after cortical lesion and then gradually disappears, in agreement with a previous study by Ladeby et al. (2005). While activated microglial cells express pro- and anti-inflammatory cytokines, we have found that the expression of pro-inflammatory cytokine IL-1 β starts 1 day after the lesion (unpublished data), increased at day 4 and became undetectable 7 days after the lesion. In addition, we have found a robust expression of anti-inflammatory cytokine TGF- β 1, 4 days after lesion, which decreased significantly seven days after the lesion, but was still detected. Interestingly, 19% of TGF- β 1+ cells co-expressed Iba1, which supports the hypothesis that microglial activation is also neuroprotective (Lai et al., 2006).

We have recently reported that a delay of one week between cortical lesion and transplantation leads to a transient but significant increase in graft vascularization. Increasing evidences have demonstrated that TGF- β 1 is pro-angiogenic in vivo and induces angiogenesis (Madri et al., 1988; Roberts et al., 1986; Yang & Moses 1990; Evrard et al., 2012). Our results suggested that an increase in graft vascularization observed in delay group could be in part the consequence of an increase of the expression of TGF- β 1 promoting graft vascularisation.

Surprisingly, this study demonstrated, for the first time, that IL-33 is implicated in the development of axons of grafted neurons where its absence was shown to alter the axonal outgrowth of transplanted neurons.

There are several possible explanations for this. First, IL-33 may have a role in the expression of pro-inflammatory cytokines. Indeed, it has been reported that IL-33 treatment, after spinal cord contusion, reduced the expression of pro-inflammatory TNF- α and promoted the activation of anti-inflammatory arginase-1 positive M2 microglia/macrophages (Pomeshchik et al., 2015). We observed that host IL-33 deletion impaired axonal outgrowth of transplanted neurons, which suggests that absence of IL-33 increases the levels of proinflammatory cytokines thus creating an environment hostile for axonal outgrowth of grafted neurons. Second, previous studies have suggested that IL-33 signalling induces angiogenesis (Choi, et al., 2009; Maywald et al., 2014). We hypothesize that deletion of IL-33 may decrease the vascularization of the graft therefore decreasing the survival of the grafted neurons. Finally, two recent reports showed that IL-33 treatment is protective in mouse brain after cerebral ischemia, through induction of IL-

4 secretion (Korhonen et al., 2015), or in mice subjected to middle cerebral artery occlusion (Lu et al., 2015).

A major problem in cell transplantation is low cell survival rate following implantation, (Emgard et al., 2003; Hicks et al., 2009). As IL-33 may have a protective effect against cell loss of grafted cells, its absence may decrease grafted cells survival.

Collectively, these results suggest a beneficial effect of IL-33 in axonal outgrowth of grafted neurons. Cell transplantation in combination with IL-33 treatment may offer a novel therapeutic strategy for cortical injury.

Acknowledgements:

We thank M. Okabe for the GFP mice, Drs. Serge Rivest and Steve Lacroix for the gift of IL1 β , TNF α , IL-6, LIF plasmids and the staffs of Image'UP platform (University of Poitiers). This work was funded by grants from the Institut pour la Recherche sur la Moelle Epinière et l'Encéphale (IRME), the INSERM, Poitiers University, FEDER N°33552, the CPER 5 to A.G. and grants from Lebanese University to ER045 to K.Z. NB was awarded a scholarship from Association of Scientific Orientation and Specialization (ASOS).

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

Baird AL, Meldrum A, Dunnett, SB. The staircase test of skilled reaching in mice. Brain Res Bull. 2001;54, 243-250.

Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim J, Kim YM, Kwon YG. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. Blood 2009;114(14): 3117–3126

Emgard M, Hallin U, Karlsson J, Bahr BA, Brundin P, Blomgren K. Both apoptosis and necrosis occur early after intracerebral grafting of ventral mesencephalic tissue: a role for protease activation. J Neurochem. 2003; 86:1223–32.

Evrard SM, d'Audigier C, Mauge L, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM. The profibrotic cytokine transforming growth factor- β 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. J Thromb Haemost. 2012 Apr;10(4):670-9.

Gaillard A., Jaber M. Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. Trends Neurosci. 2011;34, 124-133.

Gaillard A., Roger M. Early commitment of embryonic neocortical cells to developp area-specific thalamic connections. Cereb Cortex. 2000;10, 443-453.

Gaillard A, Decressac M, Frappé I, Fernagut PO, Prestoz L, Besnard S, Jaber M. Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. Neurobiol Dis. 2009;35, 477-488.

Gaillard A, Prestoz L, Dumartin B, Cantereau A, Morel F, Roger M, Jaber M. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. Nat Neurosci. 2007;10, 1294-1299.

Gibbs RB, Cotman CW. Factors affecting survival and outgrowth from transplants of entorhinal cortex. Neuroscience. 1987 Jun;21(3):699-706.

Gonzalez MF, Sharp FR. Fetal frontal cortex transplanted to injured motor/sensory cortex of adult rats. I. NADPH-diaphorase neurons. J Neurosci. 1987 Oct;7(10):2991-3001.

Grabowski M, Johansson BB, Brundin P. Survival of fetal neocortical grafts implanted in brain infarcts of adult rats: the influence of postlesion time and age of donor tissue. Exp Neurol. 1994 May;127(1):126-36.

Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. J Leukoc Biol. 2008 Sep;84(3):631-43.

Johansson BB, Grabowski M. Functional recovery after brain infarction: plasticity and neural transplantation. Brain Pathol. 1994;581, 156-160.

Hicks AU, Lappalainen RS, Narkilahti S, Suuronen R, Corbett D, Sivenius J, Hovatta O, Jolkkonen J. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. Eur J Neurosci. 2009; 29:562–74.

Kurowska-Stolarska M, Hueber A, Stolarski B, McInnes IB. Interleukin-33: a novel mediator with a role in distinct disease pathologies. J Intern Med. 2011; 269(1):29–35.

Lai AY, Todd KG. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. Can J Physiol Pharmacol 2006, 84:49-59Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. Nat Rev Immunol. 2010; 10(2):103–10.

Madri JA, Pratt BM, Tucker AM. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. J Cell Biol. 1988;106(4):1375–1384.

Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, Lanza DG, Berger NA, Markowitz SD, Lenz HJ, Nadeau JH, Pizarro TT, Heaney JD. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. PNAS. 2015 May 12; 112(19): 2487-96.

Miyoshi Y, Date I, Ohmoto, T. Three-dimensional morphological study of microvascular regeneration in cavity wall of the rat cerebral cortex using scanning electron microscope: implications for delayed neural grafting into brain cavities, Exp. 1995 Neurol. 131, 69-82.

Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB. The « staircase test »: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. J Neurosci Methods. 1991 36:219-228.

Nieto-Sampedro M, Manthrope M, Barbin G, Varon S, Cotman CW. Injury-induced neuronotrophic activity in adult rat brain: correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. J Neurosci. 1983 Nov;3(11):2219-29.

Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett. 1997 May 5;407(3):313-9.

Péron S, Droguerre M, Debarbieux F, Ballout N, Benoit-Marand M, Francheteau M, Brot S, Rougon G, Jaber M, Gaillard A. A delay between lesion and transplantation enhances graft integration and ameliorates repair and recovery. (Submitted)

Pomeshchik Y, Kidin I, Korhonen P, Savchenko E, Jaronen M, Lehtonen S, Wojciechowski S, Kanninen K, Koistinaho J, Malm T. Interleukin-33 treatment reduces secondary injury and improves functional recovery after contusion spinal cord injury. Brain, Behavior, and Immunity 2015;44:68-81.

Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, Girard JP. Endogenous IL-33 highly expressed on mouse endothelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: In situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain. JImmunol 2012 Feb: 188:3488-3495.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(12):4167–4171.

Russo I, Barlati S, Bosetti F. Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. J Neurochem. 2011 Mar;116(6):947-56.

Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Protective Role of IL-33/ST2 Axis in Con A-Induced Hepatitis. J Hepatol. 2011.

Wicher G, Husic E, Nilsson G, Forsberg-Nilsson K. Developmental expression of IL-33 in the mouse brain. Neurosci Lett. 2013 Oct 25;555:171-6.

Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. Front Neurol. 2013 Mar 4;4:18.

Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. J Cell Biol. 1990;111(2):731–741.

Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Production and functions of IL-33 in the central nervous system. Brain Res. 2011 Apr 18;1385:8-17.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of the environment surrounding cortical lesion

The effect of cortical lesion on the number of resident immune cells and peripheral infiltrating cells in the injured cortex was evaluated in 3 groups of mice: control without lesion, Day 0 of lesion or Day 7 after lesion. Black squares show area of interest in Control (A), Day 0 (B) or Day 7 (C) groups. Immunostaining using antibodies against GFAP (D, E, F), Iba1 (G, H, I), Olig2 (J, K, L) or CD45 (M, N, O) allowed the detection of astrocytes, microglia, oligodendrocytes or hematopoietic cells in control, day 0, and day 7 after cortical lesion; respectively. (P) Histogram showing the quantification of the number of Iba1+, GFAP+, Olig2+ or CD45+ cells in different group. Results showed a significant increase in the number of astrocytes, microglia and oligodendrocyte inflammatory cells in mice one week after lesion, compared to Day 0 and control groups.

determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Values for p<0.0001 (***) were considered significant. Results are expressed as mean±SEM. Results are representatives of n=6 animals per group. Scale bar: 80µm.

Figure 2: Expression of astrocytes and microglia after cortical transplantation.

Low magnification photomicrographs of coronal sections illustrating the immunolabelled immune cells (red) in the GFP+ transplants (green) at day 7 after transplantation (**A**, **E**, **I**, **M**). Astrocytes (**A**, **E**), microglia (**I**, **M**) after transplantation without delay (**A**, **I**) or with delay (**E**, **M**) after the cortical lesion. High magnification images from regions of interest showing immunolabelled astrocytes (**B**-**D**, **F**-**H**), microglia (**J**-**L**, **N**-**P**), in the GFP+ transplants (in green) after transplantation without delay (**B**-**D**, **J**-**L**) or with delay (**F**-**H**, **N**-**P**) after the cortical lesion. Scale bars: (**A**, **E**, **I**, **M**) 480µm, (**B**-**D**, **F**-**H**, **J**-**L**, **N**-**P**) 80µm.

Figure 3: Expression of oligodendrocytes and hematopoietic cells after cortical transplantation.

Low magnification photomicrographs of coronal sections illustrating the immunolabelled immune cells (red) in the GFP+ transplants (green) at day 7 after transplantation (**A**, **E**, **I**, **M**). Oligodendrocytes (**A**, **E**) and hematopoietic cells (**I**, **M**) after transplantation without delay (**A**, **I**) or with delay (**E**, **M**) after the cortical lesion. High magnification images from regions of interest showing immunolabelled oligodendrocytes (**B-D**, **F-H**) and hematopoietic cells (**J-L**, **N-P**) in the GFP+ transplants (in green) after transplantation without delay (**B-D**, **J-L**) or with delay (**F-H**, **N-P**) after the cortical lesion. Scale bars: (**A**, **E**, **I**, **M**) 480μm, (**B-D**,**F-H**,**J-L**,**N-P**) 80μm.

Figure 4: Histogram showing the quantification the number of GFAP+, Iba1+, Olig2+ or CD45+ cells after cortical transplantation in different groups.

Results are expressed as mean±SEM, asterisk indicates statistically significant differences (Student's T test, ***p<0.0001).

Figure 5: Expression of IL-33 in the cortex following cortical lesion.

Low magnification photomicrographs of coronal sections illustrating IL-33+ cells (red) in control (**A**), day 0 (**C**), day 7 (**E**) and day 45 (**G**) groups. High magnification images from regions of interest (white squares) showing IL-33+ cells (in red) in control (**B**), day 0 (**D**), day 7 (**F**) and day 45 (**H**) groups. Quantification of the number of IL-33+ cells in different groups is shown in histogram **I**. Arrows show IL-33+ cells. The p value was determined using student's t test. *, *** represent significance for for p<0.05, p<0.0001. Cx: cortex. Scale bars: (**A**, **C**, **E**, **G**) 480 µm, (**B**, **D**, **F**, **H**) 90 µm.

Figure 6: Identity of IL-33 expressing cells.

Double immunofluorescence of IL-33 and astrocytes (GFAP, **A-D**), microglia, (Iba1, **E-H**), Oligodendrocytes (Olig2, **I-L**), Neurons (NeuN, **M-P**), and Hematopoietic cells, (CD45, **Q-T**). DAPI labeled nuclei are shown in blue. Arrows indicate co-localization. Histogram showing the percentage of IL-33+ double-labeled cells in different group (**U**).

Data are presented as mean±SEM and asterisk indicates statistically significant differences (Student's T test, *p<0.05; ***p<0.0001). Scale Bar: 80µm.

Figure 7: Expression of IL-33 following cortical transplantation

Images from regions of interest showing IL-33+ cells (red) in the GFP+ transplants (green) at day 7 after transplantation in the motor cortex of wild type (**A-D**) or IL-33 KO mice (**I-L**) without delay (**A-D**) and with delay (**E-H**). Images from regions of interest showing IL-33+ cells (red) in the GFP+ transplants (green) at day 7 after transplantation in the motor cortex of IL-33 KO mice without delay (**I-L**) and with delay (**M-P**). Histogram showing the number of IL-33+ cells into the host cortex, grafts placed into motor cortex of wild type or IL-33KO mice (**Q**). The p value was determined using t-test. Values for p<0.001 (**) were considered significant. Results are expressed as mean \pm SEM. Scale bar: 80µm.

Figure 8: Co-expression of IL-33+ cells and brain resident immune cells after cortical transplantation

Images from regions of interest showing co-staining of IL-33+ cells (red, **B**, **F**, **J**, **N**, **R**, **V**) and GFAP+ (astrocytes, white, **C**, **G**), Iba1+ (microglia, white, **K**, **O**) or Olig2+ (oligodendrocytes, white, **S**, **W**) after transplantation without delay (**A-D**, **I-L**, **Q-T**) or with delay (**E-H**, **M-P**, **U-X**). DAPI was used to label the nucleus. Arrows show co-localization. Scale bar: 80µm.
Figure 9: Phenotype of IL-33 immunoreactive cells after cortical transplantation

Images from regions of interest showing co-staining of IL-33+ cells (red, **B**, **F**, **J**, **N**) and NeuN+ (neurons, white, **C**, **G**) or CD45 (hematopoietic cells, white, **K**, **O**) after transplantation without delay (**A-D**, **I-L**) or with delay (**E-H**, **M-P**). DAPI was used to label the nucleus. Arrows show co-localization. Quantification analysis for the percentage of co-localization of IL-33 with the brain resident immune and peripheral infiltrating cells was calculated (**Q**). Data are presented as group mean \pm SEM. Scale bars: 80µm.

Figure 10: Axonal projections developed by transplanted neurons

Low magnification photomicrographs of coronal sections illustrating the GFP+ (green) grafted neurons projections after transplantation with delay in the motor cortex of wild type (A,C) or IL-33 KO (B,D) mice. Scale bars: (A,B) 120µm (C,D) 90µm.

Figure 11: Differential expression of IL-1ß and TGF-ß1 following lesion of the motor cortex

The presence of IL-1ß and TGF-ß1 mRNAs was tested in unlesioned cortex (Ctrl) (**A**, **B**), at the day of lesion (D0) (**C**, **D**), 4 days (D4) (**E-H**) and 7 days (D7) (**I**, **J**) after lesion (in blue, black arrowheads). Co-labeling of IL-1ß (**G**) or TGF-ß1 (**H**) transcripts (in blue) with Iba1 macrophage/microglia marker (in brown) 4 days after lesion (black arrowheads). Quantification analysis of the mean number of IL-1ß and TGF-ß1-expressing cells, in Ctrl, D0, D4 and D7 groups (**K**). Data are presented as group mean±SEM and asterisk indicates statistically significant differences (Student's T test, ***p<0.0001). Scale bar: 20µm.



Figure 1



Figure 2



Figure 3



Figure 4



Figure 5





Figure 6



Figure 7



Figure 8



Figure 9



Figure 10



Figure 11

DISCUSSION

La mort neuronale est une caractéristique commune de nombreuses conditions neuropathologiques telles que les lésions (traumatisme, accident vasculaire cérébral) ou maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique, les maladies d'Huntington, d'Alzheimer...). Les capacités de régénération axonale spontanées du SNC adulte étant limitées, des approches thérapeutiques sont à l'étude. Parmi elles, se trouvent la thérapie cellulaire, qui occupe à ce jour, une place prometteuse. Le principe de cette thérapie est de substituer les neurones dégénérés par des neurones sains du même type. Actuellement, il existe deux possibilités : soit 1) la transplantation neuronale à partir d'une source cellulaire exogène (Gaillard et al., 2007, 2009; Magavi et Lois, 2008; Thompson et al., 2009) soit 2) la mobilisation vers la région endommagée, de cellules souches neurales endogènes, présentes dans quelques régions précises du cerveau (Hippocampe, SVZ) (pour revue, Saha et al., 2012; Saha et al., 2013).

L'objectif de notre travail était d'étudier, dans un modèle de lésion par aspiration du cortex moteur chez la souris adulte, le potentiel thérapeutique de remplacement cellulaire par la transplantation de neurones embryonnaires corticaux et plus particulièrement, la modulation du profil inflammatoire observé suite à la lésion corticale.

Dans notre premier travail, nous avons réalisé une étude dans le temps, de 2 à 30 jours après la transplantation, afin de décrire le développement et la maturation de neurones embryonnaires corticaux transplantés dans le cortex moteur lésé chez la souris adulte.

En ce qui concerne la composition cellulaire de neurones corticaux transplantés dans le cortex moteur lésé chez l'adulte, nous avons montré que les cellules greffées dans un premier temps, expriment les marqueurs de précurseurs neuronaux tels que DCX et PSA-NCAM et se différentient progressivement en neurones matures exprimant NeuN. Nous avons montré que 30 jours post-transplantation, 70% de neurones matures NeuN+ co-expriment V-GLUT1 un marqueur de neurones glutamatergiques. La densité des interneurones GABAergiques dans le transplant était inférieure à celle observée dans le cortex intact. En effet seulement 5% de neurones NeuN+ co-expriment GABA un marqueur de neurones GABAergiques. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le tissu cortical transplanté est obtenu à partir d'embryons de souris au quatorzième jour

embryonnaire (E14) et qu'à ce stade, la majorité des interneurones GABAergiques ne sont pas encore arrivés au niveau de la plaque corticale. En effet, les interneurones GABAergiques sont générés dans le télencéphale ventral et migrent vers la plaque corticale (Anderson et al., 1997; Marín and Rubenstein, 2003; Wonders and Anderson, 2006; Gelman et al., 2009). De plus, le ratio de neurones excitateurs inhibiteurs dans le cortex est important afin de garantir la fonction des circuits corticaux. Il a été montré qu'une altération de la neurotransmission GABAergique peut être impliquée dans des maladies neurologiques comme l'épilepsie (de Lanerolle et al., 1989). Les neurones greffés expriment des facteurs de transcription spécifiques des différentes couches corticales et se regroupent en bandes ou en amas. Cependant, de nombreux travaux mettent en avant l'absence d'organisation laminaire des neurones corticaux au sein des transplants. Les neurones corticaux se présentent souvent sous forme diffus ou organisés en bandes ou en amas (rosettes, clusters), séparés par des espaces comportant des faisceaux de fibres (Castro et al., 1985 ; Plumet et al., 1990 ; Garnier et al., 1995 ; Pinaudeau et al., 2000 ; Gaillard et Roger, 2000 ; Santos-Torres et al., 2009).

En ce qui concerne le développement des projections, nous avons mis en évidence un développement progressif des axones issus de neurones greffés, dont les premiers axones quittent le transplant 2 jours après la transplantation. A partir de deux semaines post-transplantation, la majorité des cibles corticales et sous-corticales du cortex moteur sont contactées par les axones des neurones greffés à l'exception des sites éloignés tels que le noyau du pont et la moelle épinière. Ces résultats sont en accord avec nos travaux antérieurs montrant la présence de projections axonales issus de neurones transplantés vers les cibles corticales et sous-corticales appropriées du cortex moteur (Gaillard et al., 2007). La possibilité de restauration des voies neuronales endommagées par greffe de neurones embryonnaires n'est pas spécifique au cortex moteur. En effet, notre équipe et d'autres ont rapporté dans un modèle animal de la maladie de Parkinson, la reconstruction de la voie nigrostriée lésée par la transplantation dans la substance noire de neurones dopaminergiques embryonnaires issus du mésencéphale ventral (Thompson et al., 2009; Gaillard et al., 2009). De plus, la transplantation de neurones embryonnaires dopaminergiques du MV a montré que le sous-type neuronal utilisé doit être approprié puisque seul les neurones dopaminergiques du type substance noire sont capables

d'innerver le striatum (pour revue, Lindvall et Björklund, 2004 ; Thompson et al., 2009). La réparation anatomique et fonctionnelle de la voie nigrostriée suggère la présence de facteurs de guidage axonale spécifiques dans le cerveau adulte et leur capacité d'orienter les axones des cellules embryonnaires transplantées vers leurs cibles spécifiques chez l'hôte (Gaillard et al., 2009 ; Thompson et al., 2009, pour revue Gaillard et Jaber, 2011).

ensemble, nos résultats présentent une description détaillée Pris du développement des neurones corticaux embryonnaires transplantés dans le cortex moteur lésé chez la souris adulte. Ces résultats fournissent des données de références auxquelles pourraient être comparés le développement après transplantation de neurones corticaux dérivés de cellules souches embryonnaires ou des cellules souches pluripotentes induites. En effet, il est peu probable que les neurones fœtaux deviennent une source de cellules pour la transplantation en raison de problèmes éthiques, d'approvisionnement ou de standardisation de tissus pour la transplantation. L'avenir de cette thérapie cellulaire dépend d'une autre source de cellule pour la transplantation telle que les neurones corticaux dérivés des cellules souches embryonnaire ou dérivés de cellules souches pluripotentes induites. Ainsi, de nombreux protocoles ont été développés afin de générer in vitro des neurones corticaux à partir de cellules souches embryonnaires de souris (Gaspard et al., 2008; Espuny-Camacho et al., 2013; Michelsen et al., 2015). Toutefois, l'utilisation de cellules souches embryonnaires souffre également de certaines limites. D'une part, il existe une grande variabilité entre les lignées de cellules souches embryonnaires humaines dans leur capacité à générer du tissu neural (Osafune et al., 2008). D'autre part, la dérivation de cellules souches embryonnaires humaines dépend de la disponibilité de blastocystes humains surnuméraires ce qui peut poser des limites éthiques. De ce fait, les cellules souches pluripotentes induites représentent potentiellement une source cellulaire inépuisable dotée des mêmes capacités de différentiation que les cellules souches embryonnaires mais ne nécessitant pas la destruction d'un embryon (Takahashi et Yamanaka, 2006). Il a été rapporté que les cellules souches pluripotentes induites humaines sont capables, sans ajout de morphogènes, de se différencier et de générer une population de neurones corticaux en respectant les principales étapes de la corticogenèse (Espuny-Camacho et al., 2013). Cependant, l'utilisation des cellules souches pluripotentes induites est toujours à un stade expérimental et certains obstacles majeurs doivent encore être maitrisés, notamment leur potentiel tumorigène après inoculation à un stade trop précoce de différenciation.

De même, dans l'optique d'une application thérapeutique de la greffe neuronale, il paraît difficile de réaliser la transplantation de neurones immédiatement après lésion du cerveau. Ainsi, en utilisant un modèle identique à celui de la première étude, une étude pilote a été réalisée dans notre laboratoire afin de déterminer la fenêtre de temps appropriée au cours de laquelle la transplantation neuronale est bénéfique. Les résultats obtenus à des délais post-lésionnels de 5 jours, 7 jours ou 1 mois nous ont permis de mettre en évidence qu'un délai de 7 jours était le plus approprié. En effet, nous avons récemment démontré qu'introduire un délai d'une semaine entre la lésion corticale et la transplantation de neurones embryonnaires avait un effet bénéfique au niveau de la récupération fonctionnelle et neuroanatomique. En outre, la taille du transplant est augmentée après la transplantation avec un délai de 7 jours entre la lésion et la greffe, de plus la prolifération cellulaire au sein du transplant est augmentée ce qui peut être à l'origine d'une augmentation de la taille du transplant. Nous avons également montré, 4 jours après la transplantation, une augmentation significative des vaisseaux sanguins chez le groupe délai, ainsi qu'une différence d'origine des vaisseaux. En effet, chez le groupe avec délai, les vaisseaux provenaient non seulement de la régénération des vaisseaux sanguins de l'hôte mais également de celle du tissu transplanté à l'inverse du groupe sans délai. Nous avons également montré que le nombre de projections développées par les neurones greffés se voit augmenté quand la transplantation est effectuée avec un délai d'une semaine (Péron et al., 2015). De façon intéressante, nous avons montré que l'introduction d'un délai permet une amélioration des performances motrices. Nous avons voulu par la suite connaitre le support de ces améliorations. Il faut noter qu'un certain nombre de travaux antérieurs soulignent l'importance de plusieurs facteurs dans le développement des neurones transplantés, comme la sécrétion de facteurs proangiogéniques (Sköld et al., 2005, Dray et al., 2009), la diminution des niveaux de toxines (Gonzalez et Sharp, 1987), la sécrétion de facteurs trophiques (Nieto-Sampedro et al., 1983) et le niveau de l'inflammation.

En effet, des réactions neuroinflammatoires ont été observées dans les maladies neurodégénératives ainsi que dans des conditions neuropathologiques comme les lésions traumatiques ou vasculaires (pour revue, Amor et al., 2010; 2014). Beaucoup de travaux de recherche se sont consacrés à déterminer le rôle de l'inflammation post-lésionnelle et ses conséquences sur la régénération axonale au niveau du cerveau adulte. Cependant peu d'études se sont consacrées au rôle bénéfique ou délétère de l'inflammation sur le développement des axones de neurones greffés dans le cerveau adulte endommagé.

Dans un deuxième temps, l'objectif de notre deuxième étude était de déterminer si l'inflammation post-lésionnelle est impliquée dans l'amélioration observée chez les animaux greffés avec un délai d'une semaine en comparaison des animaux transplantés immédiatement après la lésion corticale.

Nos résultats montrent une augmentation du nombre d'astrocytes, de la microglie, des oligodendrocytes et des cellules hématopoïétique CD45+ aux alentours du site de lésion 7 jours après la lésion corticale par comparaison au groupe lésé sacrifié immédiatement après la lésion et au groupe contrôle sans lésion. Nous avons également observé un changement de morphologie des astrocytes et de la microglie montrant un état d'activation. En effet, les astrocytes réactifs sont hypertrophiques et marqués par l'expression accrue de la protéine GFAP (Raivich et al., 1999). La microglie active est caractérisée par la rétraction de ses branches, l'hypertrophie de son corps cellulaire et adopte un morphotype amiboïde, proche de celui des macrophages facilitant sa migration vers le site de lésion (Raivich, 2005). Ces résultats confirment des études antérieures réalisées dans différents modèles de lésion dans le système nerveux montrant que les cellules gliales prolifèrent et expriment des marqueurs moléculaires différents que ceux observés dans le système nerveux intact (Faulkner et al., 2004 ; Buffo et al., 2005 ; Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005 ; Ertürk et al., 2011).

En effet, 7 jours après une lésion corticale, il a été observé une augmentation du nombre d'astrocytes hypertrophiques (Hampton et al., 2004). De même, il a été également constaté par Villapol et ses collaborateurs la présence d'une astrogliose s'étendant de 7 jours à 2 mois après la lésion corticale. De plus, cette équipe a démontré la présence d'un contact entre les astrocytes et les vaisseaux, à la frontière de la cavité

lésionnelle, à partir de 7 jours après la lésion (Villapol et al., 2014). La cicatrice gliale formée par les astrocytes autour de la lésion a pour principal objectif de protéger les neurones intacts des dommages incontrôlés (Silver and Miller, 2004). Elle permet également une limitation de l'extravasation leucocytaire et une promotion de la réparation de la BHE (Faulkner et al., 2004).

Plusieurs études récentes cherchent à élucider l'hétérogénéité de l'activation microgliale dans des modèles de maladies neurodégénératives et de lésions cérébrales afin de comprendre le rôle bénéfique ou délétère de ces cellules. En particulier, il a été décrit que dans le cas des maladies neurodégénératives, l'activation microgliale peut se propager et se prolonger pour amplifier la destruction des neurones (Gao et Hong., 2008) en secrétant des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1ß et IL-6 (Sairanen et al., 1997). De façon contradictoire, d'autres études suggèrent un rôle protecteur de la microglie sur les cellules environnantes à travers la sécrétion de cytokines antiinflammatoires, l'IL-10 et TGF- β (Masliah et al., 2005) et des molécules neurotrophiques participant à la survie neuronale et à la réparation tissulaire comme le NGF (Nerve Growth Factor), le NT3 (Neurotrophine 3) et le BDNF (Elkabes et al., 1996; Batchelor et al., 2002). Ces données suggèrent donc que la microglie est extrêmement plastique de par son programme d'activation selon ses différents phénotypes et fonctions. Ainsi, la cinétique de polarisation de la microglie dans un modèle d'accident vasculaire cérébral a été analysée. Elle s'oriente vers un phénotype M2 lors de la phase précoce puis changent vers un phénotype M1 progressivement (Hu et al., 2012). De même dans un modèle murin de CCI, les résultats montrent qu'une réponse de type M2 est transitoire avant d'être remplacée par une réponse de type M1 7 jours après la lésion (Wang et al., 2013). De ce fait, il serait intéressant d'étudier cette plasticité microgliale en fonction du temps dans notre modèle, afin de cibler une fenêtre thérapeutique pour agir sur la neuroinflammation.

En utilisant l'hybridation in situ, nous avons montré une augmentation du niveau d'expression de TGF-β1 24 heures après la lésion corticale avec un pic à 4 jours postlésion. Cette expression diminue 7 jours après la lésion mais est toujours présente. De façon intéressante, nous avons montré qu'une partie des cellules exprimant TGF-β1 coexpriment Iba1 un marqueur de cellules microgliales. De plus nous avons montré précédemment qu'un délai d'une semaine entre la lésion corticale et la transplantation favorise l'angiogenèse au sein du transplant. Il a été montré que TGF- β 1 est un facteur proangiogénique induisant l'angiogenèse (Madri et al., 1988; Roberts et al., 1986; Yang & Moses 1990; Evrard et al., 2012). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la vascularisation au sein du transplant peut être en partie provoquée par une activation de cellules microgliales sécrétant TGF- β 1 qui à leurs tours favorisent l'angiogenèse.

Ce travail de thèse a également permis d'étudier l'expression de l'IL-33 suite à la lésion corticale. En effet, de nombreux travaux se sont attelés à décrire l'importance de l'alarmine IL-33 dans des pathologies du SNC comme la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques (Chapuis et al., 2009 ; Jiang et al., 2012). Nous avons montré, dans notre modèle, une augmentation immédiate de l'expression d'IL-33 après la lésion corticale mettant en évidence son rôle d'alarmine. Cette augmentation persiste jusqu'au 7^{ème} jour post-lésionnel puis revient au niveau basal au 45^{ème} jour après la lésion.

Il est important de connaître la source cellulaire à l'origine d'une augmentation de l'expression d'IL-33 suite à la lésion corticale. Les résultats dans la littérature sont controversés. Certains travaux rapportent que l'IL-33 est exprimée par les astrocytes (Yasuoka et al., 2011 ; Pomeshchik et al., 2015). Cependant, d'autres travaux montrent que l'IL-33 est exprimée principalement par les oligodendrocytes (Gadani et al., 2015). Nos travaux montrent que, 7 jours après la lésion, l'expression de l'IL-33 par les astrocytes, la microglie, les neurones et les cellules hématopoïétiques est faible. En revanche, cette expression est plus élevée par les oligodendrocytes. Cependant les cellules gliales résidentes et les cellules hématopoïétiques dans le cortex lésé ne semblent pas être la source principale d'IL-33 en raison d'un pourcentage de co-localisation, tous types cellulaires confondu, n'excèdant pas les 25%.

L'un des objectifs de nos travaux sera de déterminer le rôle de l'IL-33 suite à une lésion corticale afin de déterminer si une source exogène d'IL-33 peut avoir un effet bénéfique ou néfaste sur la lésion, puis sur le développement du transplant. En effet, la signalisation extracellulaire d'IL-33 dépend de ses récepteurs heterodimériques, ST2 et IL-1RAcP (Liew et al., 2010). Les neurones expriment uniquement IL-1RAcP tandis que les astrocytes et la microglie expriment ST2 et IL-1RAcP (Yasuoka et al., 2011). L'ensemble de ces informations indique que les astrocytes et la microglie peuvent être les cibles principales de l'IL-33. Les travaux de Pomeshchik et ses collaborateurs ont révélé que l'administration d'IL-33 suite à une contusion de la moelle épinière induit l'augmentation de l'expression des marqueurs de la microglie/macrophages de type M2 comme Arginase-1 et Ym-1 (Pomeshchik et al., 2015). De même, dans un modèle d'ischémie, l'administration d'IL-33 ne modifie pas le nombre de microglie/macrophages mais induit une polarisation vers le type M2 (Korhonen et al., 2015). Ces données suggèrent donc que l'administration d'IL-33 peut avoir un rôle bénéfique en polarisant la microglie/macrophages vers un phénotype M2 impliqué dans la réparation.

Nous avons voulu étudié l'expression d'autres cytokines pro- et antiinflammatoire suite à la lésion corticale. Dans les 3 groupes lésés, jour 0, jour 4 et jour 7, parmi les 8 cytokines testées, seule l'expression de l'IL-1ß et du TGF-ß1 a été détectée, suggérant que ces deux cytokines jouent un rôle majeur dans le processus de neuroinflammation de notre modèle. Nous avons montré que l'expression de l'IL-1ß est fortement détectable dès 24h post-lésion alors que celle du TGF-B1 débute plus faiblement à 48h. De nombreuses études ont démontré le rôle délétère de l'IL-1 β suite à une lésion du SNC. Par opposition, il a été récemment suggéré un rôle prépondérant de l'IL-1β dans la phagocytose, un processus physiologique considéré comme bénéfique suite à une lésion du SNC. En effet, Ferreira et ses collaborateurs ont démontré que l'augmentation de l'activité de phagocytose de la microglie suite à une co-stimulation LPS/ATP, est inhibée par l'ajout d'un antagoniste du récepteur de l'interleukine-1. Les auteurs ont par la suite validé que l'ajout d'IL-1β stimule la phagocytose (Ferreira et al., 2011). De manière intéressante, il a été montré que l'ingestion de débris cellulaires par phagocytose par les macrophages et la microglie entraine la production et la sécrétion de TGF-β1 (Huynh et al., 2002; Fadok et al., 1999). Ces résultats sont en adéquation avec les cinétiques d'apparition des transcriptions de l'IL-1ß et du TGF-ß1 que nous observons. Par la suite, nous avons montré que 4 jours après la lésion, le nombre de cellules exprimant le TGF-\beta1 est fortement augmenté, et bien supérieur au nombre de cellules exprimant l'IL-1\beta. 7 jours après la lésion, au contraire de l'IL-1\beta, quelques cellules exprimant le TGF- β 1 restaient détectables. Nous avons ensuite observé que les cellules qui expriment fortement le TGF- β 1 présentent une morphologie similaire aux leucocytes. Cette morphologie a été associée à l'activité de phagocytose. Nous avons finalement mis en évidence que ces cellules co-expriment le CD68 et Iba1 démontrant que ce sont des microglie / macrophages. Ainsi, ces résultats semblent indiquer que l'activité de phagocytose des microglie / macrophages est plus importante à 4 jours qu'à 7 jours après la lésion. Nous pouvons donc supposer que 7 jours après la lésion la plupart des débris ont été phagocytés au niveau du site de lésion rendant l'environnement plus propice au développement des cellules greffées.

Ensuite, nous avons voulu étudier l'influence des cellules transplantées sur la modulation de la réponse inflammatoire chez l'hôte. Nous avons observé une augmentation du nombre d'astrocytes après la transplantation. Il a été montré que, suite à une transplantation, les astrocytes de l'hôte retiennent la capacité de réexprimer des facteurs de développement suffisant pour diriger la croissance axonale du transplant (Gaillard et Jaber, 2007). De plus, les astrocytes conservent la capacité de réexprimer un phénotype précoce qui peut partiellement être à la base de la migration active des neurones transplantés et des précurseurs neuronaux (Leavitt et al., 1999). Les astrocytes peuvent également secréter différents facteurs de croissance comme le BDNF (Schwartz et al., 1994) et le VEGF (Rosenstein et Krum, 2004). Au total, sur la base de nos travaux et des données de la littérature, nous pouvons supposer que l'expression des facteurs trophiques par les astrocytes après la transplantation crée un environnement plus favorable au développement du transplant. Aucune différence au niveau de l'expression de la microglie et des cellules hématopoïétiques n'a été détectée entre le groupe transplanté avec délai et celui transplanté sans délai. De plus le nombre de microglie a diminué après la transplantation. Ces données suggèrent donc que la microglie agirait principalement suite à la lésion afin de se débarrasser des débris et améliorer la réceptivité du tissu après la transplantation. Cependant, nous avons observé que le nombre d'oligodendrocytes est plus élevé dans le transplant greffé avec délai de 7 jours en comparaison du groupe transplanté sans délai. Il est important de vérifier en microscopie électronique, la présence d'un plus grand nombre d'axones myélinisés dans le cas de transplantation avec délai en comparaison de la transplantation sans délai.

Enfin, nous avons montré que l'expression d'IL-33 est plus élevée dans le transplant greffé avec délai en comparaison du transplant du groupe sans délai. De manière intéressante, nous avons montré, 7 jours après transplantation, 70% des cellules qui expriment IL-33 sont des oligodendrocytes, laissant supposer un rôle de neuroprotection de ces cellules dans une fenêtre de temps précise. En effet comme énoncé précédemment, l'administration d'une source exogène d'IL-33 a révélé un rôle de neuroprotection en réduisant la lésion secondaire et une amélioration de la réparation fonctionnelle (Pomeshchik et al., 2015). De même, le rôle protecteur de l'IL-33 a été mis en évidence, dans un modèle d'ischémie, en induisant la sécrétion d'IL-4 (Korhonen et al., 2015). De plus, l'IL-33 nucléaire peut interagir avec le facteur de transcription nucléaire kappa-B (NF-kB) et attenue l'activité de ce dernier (Carriere et al., 2007), ce qui entraîne l'inhibition de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires (Ali et al., 2011). L'utilisation des souris IL-33KO par Gadani et ses collaborateurs a montré que, suite à une contusion de la moelle épinière, la récupération chez les souris IL-33KO est réduite en comparaison des souris sauvages (Gadani et al., 2015). De ce fait, il semble intéressant d'utiliser les souris IL-33KO afin de confirmer le rôle de l'IL-33 suite à la lésion et la transplantation corticale au niveau neuroanatomique et fonctionnelle.

En conclusion, nous avons montré qu'IL-33 joue un rôle favorable dans le développement des axones de neurones greffés. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes dans le cadre de la réparation de lésion corticale. La transplantation cellulaire en combinaison avec un traitement avec IL-33 peut offrir une nouvelle approche thérapeutique pour la lésion corticale chez l'adulte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
- Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB (1996). Loss of Occludin and Functional Tight Junctions, but Not ZO-1, during Neural Tube Closure—Remodeling of the Neuroepithelium Prior to Neurogenesis. Developmental Biology 180:664-679.
- Akhtar AA et Breunig JJ (2015). Lost highway(s): barriers to postnatal cortical neurogenesis and implications for brain repair. Frontiers in Cellular Neuroscience 9:216.
- Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU (2011). The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-κB to dampen NF-κB-stimulated gene transcription. J Immunol.187(4):1609-1616.
- Amor S, Peferoen LAN, Vogel DYS, Breur M, Valk P, Baker D, Noort JM (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases – an update. Immunology 142:151-166.
- Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. Immunology 129:154-169.
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? Nat Med 7:393-395.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR(1997). Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. Science 278(5337): 474-476.
- Asanuma H, Sakata H (1967). Functional organization of a cortical efferent system examined with focal depth stimulation in cats. J Neurophysiol 30: 35-54.
- Ayala R, Shu T, Tsai L-H (2007). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. Cell 128:29-43.
- Ayoub AE, Oh S, Xie Y, Leng J, Cotney J, Dominguez MH, Noonan JP, Rakic P (2011). Transcriptional programs in transient embryonic zones of the cerebral cortex defined by high-resolution mRNA sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences 108:14950-14955.
- Azmitia EC, Björklund A (1987). Cell and Tissue Transplantation into the Adult Brain, Annals of the New York Academy of Science. Vol. 495, New York Academy of Science, New York.

- Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L (1985). Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. J Neurosurg 62:169-173.
- Baldwin KT et Giger RJ (2015). Insights into the physiological role of CNS regeneration inhibitors. Frontiers in Molecular Neuroscience 8:23.

- Barker RA, Barrett J, Mason SL, Björklund A (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. The Lancet Neurology 12:84-91.
- Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA, Howells DW (2002). Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. Molecular and Cellular Neuroscience 21:436-453.
- Belichenko PV, Mattsson B, Johansson BB (2001). Neuronal and Fibre Organization in Neocortical Grafts Placed in Post-ischaemic Adult Rat Brain: a Threedimensional Confocal Microscopy Study. Journal of Comparative Pathology 124:142-148.
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. Glia 55:233-238.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM (2007). Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. Trends in Neurosciences 30:596-602.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. Nat Neurosci 8:1002-1012.
- Bishop KM, Garel S, Nakagawa Y, Rubenstein JLR, O'Leary DDM (2003). Emx1 and Emx2 cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding. The Journal of Comparative Neurology 457:345-360.
- Björklund A et Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. Trends in Neurosciences 30:194-202.
- Björklund A, Dunnett SB, Brundin P, Stoessl AJ, Freed CR, Breeze RE, Levivier M, Peschanski M, Studer L, Barker R (2003). Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. The Lancet Neurology 2:437-445.
- Bjorklund A et Stenevi U (1979). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. Brain Res 177:555-560.
- Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH (1982). Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. Nature 298:652-654.
- Block ML, Zecca L, Hong J-S (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nat Rev Neurosci 8:57-69.
- Borrell V et Marin O (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. Nat Neurosci 9:1284-1293.
- Bradl M et Lassmann H (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol 119:37-53.
- Bragin A, Takács J, Vinogradova O, Hámori J (1991). Quantitative Estimation of the Ratio of GABA-Immunoreactive Cells in Neocortical Grafts. Journal of Neural Transplantation & Plasticity 2:235-242.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S (2010). Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. Biochemical Pharmacology 79:77-89.
- Buffo A, Vosko MR, Ertürk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Götz M (2005). Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries:

Implications for neuronal repair. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:18183-18188.

Burda JE et Sofroniew MV (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. Neuron 81:229-248.

~C~

- Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre D-A, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard J-P (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatinassociated nuclear factor in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:282-287.
- Casper D, Engstrom SJ, Mirchandani GR, Pidel A, Palencia D, Cho PH, Brownlee M, Edelstein D, Federoff HJ, Sonstein WJ (2002). Enhanced Vascularization and Survival of Neural Transplants With Ex Vivo Angiogenic Gene Transfer. Cell Transplantation 11:331-349.
- Castro AJ, Tønder N, Sunde NA, Zimmer 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.
- Castro AJ, Zimmer J, Sunde NA, Bold EL (1985). Transplantation of fetal cortex to the brain of newborn rats: A retrograde fluorescent analysis of callosal and thalamic projections from transplant to host. Neuroscience Letters 60:283-288.
- Caviness Jr VS (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: A developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. Developmental Brain Research 4:293-302.
- Cayrol C et Girard J-P (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. Proceedings of the National Academy of Sciences 106:9021-9026.
- Chang F-LF, Steedman JG, Lund RD (1984). Embryonic cerebral cortex placed in the occipital region of newborn rats makes connections with the host brain. Developmental Brain Research 13:164-166.
- Chang F-LF, Steedman JG, Lund RD (1986). The lamination and connectivity of embryonic cerebral cortex transplanted into newborn rat cortex. The Journal of Comparative Neurology 244:401-411.
- Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S, Hubans C, Maurage CA, Huot L, Bensemain F, Laumet G, Ayral AM, Fievet N, Hauw JJ, DeKosky ST, Lemoine Y, Iwatsubo T, Wavrant-Devrièze F, Dartigues JF, Tzourio C, Buée L, Pasquier F, Berr C, Mann D, Lendon C, Alpérovitch A, Kamboh MI, Amouyel P, Lambert JC (2009). Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. Mol Psychiatry. 14(11):1004-16
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré M-V, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävman K, Mallard C, Gressens P, Fleiss B (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. Brain, Behavior, and Immunity 32:70-85.

- Chung ES, Chung YC, Bok E, Baik HH, Park ES, Park J-Y, Yoon S-H, Jin BK (2010). Fluoxetine prevents LPS-induced degeneration of nigral dopaminergic neurons by inhibiting microglia-mediated oxidative stress. Brain Research 1363:143-150.
- Chung IY, Benveniste EN (1990). Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. J of immunol 144(8): 2999-3007.
- Ciceri G, Dehorter N, Sols I, Huang ZJ, Maravall M, Marin O (2013). Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. Nat Neurosci 16:1199-1210.
- Cicirata F, Serapide MF, Nicotra G, Raffaele R (1992). Homotopic transplant of fetal cortex to lesioned motor cortex of adult rats. A comportamental and anatomical study. Arch Ital Biol 130:101-111.
- Clark WELG (1940). NEURONAL DIFFERENTIATION IN IMPLANTED FŒTAL CORTICAL TISSUE. Journal of Neurology and Psychiatry 3:263-272.
- Clarke LE et Barres BA (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nat Rev Neurosci 14:311-321.
- Collier TJ, Sortwell CE, Daley BF (1999). Diminished Viability, Growth, and Behavioral Efficacy of Fetal Dopamine Neuron Grafts in Aging Rats with Long-Term Dopamine Depletion: An Argument for Neurotrophic Supplementation. The Journal of Neuroscience 19:5563-5573.
- Contreras D (2004). Electrophysiological classes of neocortical neurons. Neural Networks 17:633-646.
- Cowan AI et Stricker C (2004). Functional Connectivity in Layer IV Local Excitatory Circuits of Rat Somatosensory Cortex. Journal of Neurophysiology 92:2137-2150.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J (2014). Functional regeneration beyond the glial scar. Experimental Neurology 253:197-207.
- Czigner A, Mihály A, Farkas O, Büki A, Krisztin-Péva B, Dobó E, Barzó P (2007). Kinetics of the cellular immune response following closed head injury. Acta Neurochir (Wien) 149:281-289.

~D~

- Dalgard CL, Cole JT, Kean WS, Lucky JJ, Sukumar G, McMullen DC, Pollard HB, Watson WD (2012). The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. Frontiers in Molecular Neuroscience 5:6.
- Darling WG, Pizzimenti MA, Morecraft RJ (2011). Functional recovery following motor cortex lesions in non-human primates: experimental implications for human stroke patients. Journal of integrative neuroscience 10:353-384.
- Dardiotis E, Karanikas V, Paterakis K, Fountas K, Hadjigeorgiou GM (2012). Traumatic brain injury and inflammation: emerging role of innate and adaptive immunity. Brain Injury – Pathogenesis, Monitoring, Recovery and Management 23-38.

- Das GD et Altman J (1971). Transplanted Precursors of Nerve Cells: Their Fate in the Cerebellums of Young Rats. Science 173:637-638.
- Das GD, Hallas BH, Das KG (1980). Transplantation of brain tissue in the brain of rat. I. Growth characteristics of neocortical transplants from embryos of different ages. American Journal of Anatomy 158:135-145.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W-B (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci 8:752-758.
- Davies SJA, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997). Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. Nature 390:680-683.
- Davies SJA, Goucher DR, Doller C, Silver J (1999). Robust Regeneration of Adult Sensory Axons in Degenerating White Matter of the Adult Rat Spinal Cord. The Journal of Neuroscience 19:5810-5822.
- de Lanerolle, N.C.,Kim, J.H., Robbins, R.J., Spencer, D.D. (1989). Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. Brain Res 495:387–395.
- Dent KA, Christie KJ, Bye N, Basrai HS, Turbic A, Habgood M, Cate HS, Turnley AM (2015). Oligodendrocyte Birth and Death following Traumatic Brain Injury in Adult Mice. PLoS ONE 10:e0121541.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. Science 321:1218-1221.
- Dong Y et Benveniste EN (2001). Immune function of astrocytes. Glia 36:180-190.
- Dray C, Rougon G, Debarbieux F (2009). Quantitative analysis by in vivo imaging of the dynamics of vascular and axonal networks in injured mouse spinal cord. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:9459-9464.
- Dunn EH (1917). Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in the albino rat. The Journal of Comparative Neurology 27:565-582.
- Dunnett SB, Björklund A (1994a). Mechanisms of function of neural grafts in the injured brain. in Functional neural transplantation, eds Dunnett SB, Björklund A Raven, New York: 531–567.
- Dunnett SB, Ryan CN, Levin PD, Reynolds M, Bunch ST (1987). Functional consequences of embryonic neocortex transplanted to rats with prefrontal cortex lesions. Behavioral Neuroscience 101:489-503.

- Ebert AD, Yu J, Rose FF, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature 457:277-280.
- Ebrahimi-Gaillard A, Beck T, Gaillard F, Wree A, Roger M (1995). Transplants of embryonic cortical tissue placed in the previously damaged frontal cortex of adult rats: Local cerebral glucose utilization following execution of forelimb movements. Neuroscience 64:49-60.
- Ebrahimi-Gaillard A, Guitet J, Garnier C, Roger M (1994). Topographic distribution of efferent fibers originating from homotopic or heterotopic transplants: heterotopically transplanted neurons retain some of the developmental characteristics corresponding to their site of origin. Developmental Brain Research 77:271-283.
- Edward Dixon C, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. Journal of Neuroscience Methods 39:253-262.
- Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. Cell Stem Cell 3:519-532.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom E, Black I (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. The Journal of Neuroscience 16:2508-2521.
- Engelhardt B et Ransohoff RM (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. Trends in Immunology 26:485-495.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. The Journal of Neuroscience 25:247-251.
- Eriksdotter-Nilsson M et Olson L (1989). Growth of brain tissue grafts is dependent upon host age. Mechanisms of Ageing and Development 49:1-22.
- Espuny-Camacho I, Michelsen Kimmo A, Gall D, Linaro D, Hasche A, Bonnefont J, Bali C, Orduz D, Bilheu A, Herpoel A, Lambert N, Gaspard N, Péron S, Schiffmann Serge N, Giugliano M, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2013). Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. Neuron 77:440-456.
- Evrard SM, d'Audigier C, Mauge L, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM (2012). The profibrotic cytokine transforming growth factor-β1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. J Thromb Haemost. 10(4):670-679.

- Färber K et Kettenmann H (2005). Physiology of microglial cells. Brain Research Reviews 48:133-143.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. The Journal of Neuroscience 24:2143-2155.
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, Del Rio T, Fonseca M (1990). Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. Neuroscience 39:451-458.
- Ferreira R, Santos T, Viegas M, Cortes L, Bernardino L, Vieira OV, Malva JO (2011). Neuropeptide Y inhibits interleukin-1β-induced phagocytosis by microglial cells. J Neuroinflammation. 8:169.
- Finlay B et Darlington R (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. Science 268:1578-1584.
- Floeter M et Jones E (1984). Connections made by transplants to the cerebral cortex of rat brains damaged in utero. The Journal of Neuroscience 4:141-150.
- Frappé I, Roger M, Gaillard A (1999). Transplants of fetal frontal cortex grafted into the occipital cortex of newborn rats receive a substantial thalamic input from nuclei normally projecting to the frontal cortex. Neuroscience 89:409-421.
- Frotscher M (1997). Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. Cell Tissue Res 290:315-322.

~G~

- Gadani Sachin P, Walsh James T, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J The Glia-Derived (2015). Alarmin IL-33 Orchestrates the Immune Response and Promotes Recovery following CNS Injury. Neuron 85:703-709.
- Gadisseux J et Evrard P (1985). Glial-Neuronal Relationship in the Developing Central Nervous System. Developmental Neuroscience 7:12-32.
- Gaillard A, Decressac M, Frappé I, Fernagut PO, Prestoz L, Besnard S, Jaber M (2009). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. Neurobiology of Disease 35:477-488.
- Gaillard A et Jaber M (2011). Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. Trends in Neurosciences 34:124-133.
- Gaillard A et Jaber M (2007). Is the Outgrowth of Transplant-Derived Axons Guided by Host Astrocytes and Myelin Loss? Cell Adhesion & Migration 1:161-164.
- Gaillard A et Jaber M (2008). Réparation du cortex adulte lésé par transplantation de neurones embryonnaires. Med Sci (Paris) 24:132-134.

- Gaillard A, Gaillard F, Roger M (1998). Neocortical grafting to newborn and adult rats: developmental, anatomical and functional aspects. Adv Anat Embryol Cell Biol 148: 1-86.
- Gaillard A, Nasarre C, Roger M (2003). Early (E12) cortical progenitors can change their fate upon heterotopic transplantation. European Journal of Neuroscience 17:1375-1383.
- Gaillard A, Prestoz L, Dumartin B, Cantereau A, Morel F, Roger M, Jaber M (2007). Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. Nat Neurosci 10:1294-1299.
- Gaillard A et Roger M (2000). Early Commitment of Embryonic Neocortical Cells to Develop Area-specific Thalamic Connections. Cerebral Cortex 10:443-453.
- Gaillard F, Domballe L, Gaillard A (2004). Fetal cortical allografts project massively through the adult cortex. Neuroscience 126:631-637.
- Galea MP et Darian-Smith I (1997). Manual dexterity and corticospinal connectivity following unilateral section of the cervical spinal cord in the macaque monkey. The Journal of Comparative Neurology 381:307-319.
- Gelman, D.M., Martini, F.J., Nobrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessaris, N. & Marin, O. (2009). The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. J. Neurosci. 29:9380–9389.
- Gao H-M et Hong J-S (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. Trends in Immunology 29:357-365.
- Garden G et Möller T (2006). Microglia Biology in Health and Disease. Jrnl NeuroImmune Pharm 1:127-137.
- Garnier C, Arnault P, Ebrahimi-Gaillard A, Létang J, Roger M (1995). The topographic distribution of the efferents from neocortical neurons is not only dependent upon where in the neocortex the cells develop. A transplantation study within one single neocortical region. Developmental Brain Research 89:1-10.
- Gaspard N, Bouschet T, Herpoel A, Naeije G, van den Ameele J, Vanderhaeghen P (2009a). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Protocols 4:1454-1463.
- Gaspard N, Bouschet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Ameele J, Espuny-Camacho I, Herpoel A, Passante L, Schiffmann SN, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. Nature 455:351-357.
- Gaspard N, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2009b). Making cortex in a dish: in vitro corticopoiesis from embryonic stem cells. Cell Cycle 8:2491-2496.
- Gelman DM, Martini FJ, Nóbrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marín O (2009). The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. J Neurosci. 29(29):9380-9389.
- Gibbs RB et Cotman CW (1987). Factors affecting survival and outgrowth from transplants of entorhinal cortex. Neuroscience 21:699-706.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013). Origin and differentiation of microglia. Frontiers in Cellular Neuroscience 7:45.

- Gonzalez M et Sharp F (1987). Fetal frontal cortex transplanted to injured motor/sensory cortex of adult rats. I. NADPH-diaphorase neurons. The Journal of Neuroscience 7:2991-3001.
- Gotz M et Huttner WB (2005). The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 6:777-788.
- Grabowsi M, Johansson BB, Brundin P (1995). Neocortical Grafts Placed in the Infarcted Brain of Adult Rats: Few or No Efferent Fibers Grow from Transplant to Host. Experimental Neurology 134:273-276.
- Grabowski M, Brundin P, Johansson BB (1993). Functional integration of cortical grafts placed in brain infarcts of rats. Annals of Neurology 34:362-368.
- Grabowski M, Johansson BB, Brundin P (1994). Survival of Fetal Neocortical Grafts Implanted in Brain Infarcts of Adult Rats: The Influence of Postlesion Time and Age of Donor Tissue. Experimental Neurology 127:126-136.
- Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. Nat Rev Neurosci 14:755-769.
- Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ (2008). Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. Trends in Neurosciences 31:154-162.
- Guerrini R et Parrini E (2010). Neuronal migration disorders. Neurobiology of Disease 38:154-166.
- Guitet J, Garnier C, Ebrahimi-Gaillard A, Roger M (1994). Efferents of frontal or occipital cortex grafted into adult rat's motor cortex. Neuroscience Letters 180:265-268.

~H~

- Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJM, Fawcett JW (2004). The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. Neuroscience 127:813-820.
- Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, Yow A, Soldner F, Hockemeyer D, Hallett PJ, Osborn T, Jaenisch R, Isacson O (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:15921-15926.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M (2001). Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. Developmental Biology 229:15-30.
- Haydon PG (2001). Glia: listening and talking to the synapse. Nat Rev Neurosci 2:185-193.

- Hébert JM, Mishina Y, McConnell SK (2002). BMP Signaling Is Required Locally to Pattern the Dorsal Telencephalic Midline. Neuron 35:1029-1041.
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde Y-A, Gotz M (2002). Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. Nat Neurosci 5:308-315.
- Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV (2013). Microglia Activation as a Biomarker for Traumatic Brain Injury. Frontiers in Neurology 4:30.
- Hevner RF, Hodge RD, Daza RAM, Englund C (2006). Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: Conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. Neuroscience Research 55:223-233.
- Hooks BM, Mao T, Gutnisky DA, Yamawaki N, Svoboda K, Shepherd GMG (2013). Organization of Cortical and Thalamic Input to Pyramidal Neurons in Mouse Motor Cortex. The Journal of Neuroscience 33:748-760.
- Hotta N, Aoyama M, Inagaki M, Ishihara M, Miura Y, Tada T, Asai K (2005). Expression of glia maturation factor beta after cryogenic brain injury. Molecular Brain Research 133:71-77.
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. Stroke. 43(11):3063-3070.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest. 109(1):41-50.

~I~

Ideguchi M, Palmer TD, Recht LD, Weimann JM (2010). Murine Embryonic Stem Cell-Derived Pyramidal Neurons Integrate into the Cerebral Cortex and Appropriately Project Axons to Subcortical Targets. The Journal of Neuroscience 30:894-904.

~J~

- Jaber M et Gaillard A (2012). Cell transplantation: relevance in understanding brain development and prospects in brain repair. Frontiers in Cellular Neuroscience 6:56.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP (2005). TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. J Immunol 175(7): 4320-4330.

Johansson BB et Grabowski M (1994). Functional Recovery after Brain Infarction: Plasticity and Neural Transplantation. Brain Pathology 4:85-95.

Judson RL, Babiarz J, Venere M, Blelloch R (2009). Embryonic stem cell specific microRNAs promote induced pluripotency. Nature biotechnology 27:459-461.

~K~

- K L Allendoerfer a et Shatz CJ (1994). The Subplate, A Transient Neocortical Structure: Its Role in the Development of Connections between Thalamus and Cortex. Annual Review of Neuroscience 17:185-218.
- Kato H et Walz W (2000). The Initiation of the Microglial Response. Brain Pathology 10:137-143.
- Kawaguchi Y et Kubota Y (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. Cerebral Cortex 7:476-486.
- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A (2011). Physiology of Microglia. Physiological Reviews 91:461-553.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. Neuron 77:10-18.
- Kipp M, Norkute A, Johann S, Lorenz L, Braun A, Hieble A, Gingele S, Pott F, Richter J, Beyer C (2008). Brain-Region-Specific Astroglial Responses In Vitro After LPS Exposure. J Mol Neurosci 35:235-243.
- Korhonen P, Kanninen KM, Lehtonen Š, Lemarchant S, Puttonen KA, Oksanen M, Dhungana H, Loppi S, Pollari E, Wojciechowski S, Kidin I, García-Berrocoso T, Giralt D, Montaner J, Koistinaho J, Malm T (2015). Immunomodulation by interleukin-33 is protective in stroke through modulation of inflammation. Brain, Behavior, and Immunity 49:322-336.
- Kreutzberg GW (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends in Neurosciences 19:312-318.
- Kumar A, Stoica BA, Sabirzhanov B, Burns MP, Faden AI, Loane DJ (2013). Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. Neurobiology of aging 34:1397-1411.
- Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T (2009). Two Types of Thalamocortical Projections from the Motor Thalamic Nuclei of the Rat: A Single Neuron-Tracing Study Using Viral Vectors. Cerebral Cortex 19:2065-2077.

- Lacroix S, Havton LA, McKay H, Yang H, Brant A, Roberts J, Tuszynski MH (2004). Bilateral corticospinal projections arise from each motor cortex in the macaque monkey: A quantitative study. The Journal of Comparative Neurology 473:147-161.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Dalmau I, Gregersen R, García-Ovejero D, Babcock A, Owens T, Finsen B (2005a). Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury. Glia 50:121-131.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005b). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. Brain Research Reviews 48:196-206.
- Leavitt BR, Hernit-Grant CS, Macklis JD (1999). Mature Astrocytes Transform into Transitional Radial Glia within Adult Mouse Neocortex That Supports Directed Migration of Transplanted Immature Neurons. Experimental Neurology 157:43-57.
- Lee HJ, Kim KS, Park IH, Kim SU (2007). Human Neural Stem Cells Over-Expressing VEGF Provide Neuroprotection, Angiogenesis and Functional Recovery in Mouse Stroke Model. PLoS ONE 2:e156.
- Lee HJ, Lim IJ, Lee MC, Kim SU (2010). Human neural stem cells genetically modified to overexpress brain-derived neurotrophic factor promote functional recovery and neuroprotection in a mouse stroke model. Journal of Neuroscience Research 88:3282-3294.
- Lee HJ, Park IH, Kim HJ, Kim SU (2009). Human neural stem cells overexpressing glial cell line-derived neurotrophic factor in experimental cerebral hemorrhage. Gene Ther 16:1066-1076.
- Lee JK et Zheng B (2012). Role of myelin-associated inhibitors in axonal repair after spinal cord injury. Experimental Neurology 235:33-42.
- Leone DP, Srinivasan K, Chen B, Alcamo E, McConnell SK (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. Current opinion in neurobiology 18:28-35.
- Lev DL et White EL (1997). Organization of Pyramidal Cell Apical Dendrites and Composition of Dendritic Clusters in the Mouse: Emphasis on Primary Motor Cortex. European Journal of Neuroscience 9:280-290.
- Li C-X et Waters RS (1991). Organization of the Mouse Motor Cortex Studied by Retrograde Tracing and Intracortical Microstimulation (ICMS) Mapping. Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques 18:28-38.
- Liew FY, Pitman NI, McInnes IB (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. Nat Rev Immunol 10:103-110.
- Lin C, Nicolelis M, Schneider J, Chapin J (1990). A major direct GABAergic pathway from zona incerta to neocortex. Science 248:1553-1556.

- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders K, Sawle G, Rothwell J, Marsden C, al. e (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. Science 247:574-577.
- Liu F et McCullough LD (2011). Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011:9.
- London A, Cohen M, Schwartz M (2013). Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. Frontiers in Cellular Neuroscience 7:34.
- Lotocki G, de Rivero Vaccari J, Alonso O, Sanchez Molano J, Nixon R, Dietrich WD, Bramlett HM (2011). Oligodendrocyte Vulnerability Following Traumatic Brain Injury in Rats: Effect of Moderate Hypothermia. Therapeutic Hypothermia and Temperature Management 1:43-51.
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature 523:337-341.
- Lübke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D (2000). Columnar Organization of Dendrites and Axons of Single and Synaptically Coupled Excitatory Spiny Neurons in Layer 4 of the Rat Barrel Cortex. The Journal of Neuroscience 20:5300-5311.

~M~

- Madri JA, Pratt BM, Tucker AM (1988). Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. J Cell Biol. 106(4):1375-1384.
- Magavi SSP et Lois C (2008). Transplanted neurons form both normal and ectopic projections in the adult brain. Developmental Neurobiology 68:1527-1537.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. Neuron 41:535-547.
- Marín O et Rubenstein JLR (2003). Cell migration in the forebrain. Annual Review of Neuroscience 26:441-483.
- Masliah E, Hansen L, Adame A, Crews L, Bard F, Lee C, Seubert P, Games D, Kirby L, Schenk D (2005). Aβ vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. Neurology 64:129-131.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D (2005). Effects of alphasynuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. Neuron. 46(6):857-868.
- McConnell S et Kaznowski C (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. Science 254:282-285.

- McGeorge AJ et Faull RLM (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. Neuroscience 29:503-537.
- Medawar PB (1948). Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. British Journal of Experimental Pathology 29:58-69.
- Meinecke DL et Peters A (1987). GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. The Journal of Comparative Neurology 261:388-404.
- Mérot Y, Rétaux S, Heng JI-T (2009). Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex. Seminars in Cell & Developmental Biology 20:726-734.
- Métin C, Baudoin J-P, Rakić S, Parnavelas JG (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. European Journal of Neuroscience 23:894-900.
- Michelsen Kimmo A, Acosta-Verdugo S, Benoit-Marand M, Espuny-Camacho I, Gaspard N, Saha B, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2015). Area-Specific Reestablishment of Damaged Circuits in the Adult Cerebral Cortex by Cortical Neurons Derived from Mouse Embryonic Stem Cells. Neuron 85:982-997.
- Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, ffrench-Constant C (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. Nat Neurosci 16:1211-1218.
- Mizutani K-i et Saito T (2005). Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. Development 132:1295-1304.
- Molofsky AV, Krenick R, Ullian E, Tsai H-h, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. Genes & Development 26:891-907.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 8:427-437.
- Molyneaux Bradley J, Goff Loyal A, Brettler Andrea C, Chen H-H, Brown Juliana R, Hrvatin S, Rinn John L, Arlotta P (2015). DeCoN: Genome-wide Analysis of In Vivo Transcriptional Dynamics during Pyramidal Neuron Fate Selection in Neocortex. Neuron 85:275-288.
- Moore KW, Malefyt RdW, Coffman RL, O'Garra A (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual Review of Immunology 19:683-765.
- Morel M, Dusart I, Sotelo C (2002). Sprouting of adult Purkinje cell axons in lesioned mouse cerebellum: "Non-permissive" versus "permissive" environment. J Neurocytol 31:633-647.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. Current Opinion in Critical Care 8:101-105.
- Moussion C, Ortega N, Girard J-P (2008). The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells <italic>In Vivo</italic>: A Novel 'Alarmin'? PLoS ONE 3:e3331.

- Muldoon LL, Alvarez JI, Begley DJ, Boado RJ, del Zoppo GJ, Doolittle ND, Engelhardt B, Hallenbeck JM, Lonser RR, Ohlfest JR, Prat A, Scarpa M, Smeyne RJ, Drewes LR, Neuwelt EA (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood–brain barrier. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 33:13-21.
- Muzio L, Di Benedetto B, Stoykova A, Boncinelli E, Gruss P, Mallamaci A (2002). Emx2 and Pax6 Control Regionalization of the Pre-neuronogenic Cortical Primordium. Cerebral Cortex 12:129-139.

~N~

- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong ROL, Pearlman AL (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat Neurosci 4:143-150.
- Neafsey EJ (1991). Chapter 7 Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: Anatomical and physiological observations. In: Progress in Brain Research, vol. Volume 85 (H.B.M. Uylings, C. G. V. E. J. P. C. D. B. M. A. C. and Feenstra, M. G. P., eds), pp 147-166: Elsevier.
- Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR (1986). The organization of the rat motor cortex: A microstimulation mapping study. Brain Research Reviews 11:77-96.
- Neafsey EJ, Sørensen JC, Tønder N, Castro AJ (1989). Fetal cortical transplants into neonatal rats respond to thalamic and peripheral stimulation in the adult. An electrophysiological study of single-unit activity. Brain Research 493:33-40.
- Neafsey EJ et Sievert C (1982). A second forelimb motor area exists in rat frontal cortex. Brain Research 232:151-156.
- Nieto-Sampedro M, Lim R, Hicklin DJ, Cotman CW (1988). Early release of glia maturation factor and acidic fibroblast growth factor after rat brain injury. Neuroscience Letters 86:361-365.
- Nieto-Sampedro M, Manthrope M, Barbin G, Varon S, Cotman C (1983). Injury-induced neuronotrophic activity in adult rat brain: correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. The Journal of Neuroscience 3:2219-2229.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. Science 308:1314-1318.
- Nishimura K, Nakagawa T, Ono K, Ogita H, Sakamoto T, Yamamoto N, Okita K, Yamanaka S, Ito J (2009). Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. NeuroReport 20:1250-1254.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409:714-720.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002). Dividing Precursor Cells of the Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological and Molecular Characteristics of Radial Glia. The Journal of Neuroscience 22:3161-3173.

- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7:136-144.
- Nudo RJ, Milliken GW, Jenkins WM, Merzenich MM (1996b) Usedependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. J Neurosci 16: 785-807.

~()~

- O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A, Freedman MS (2011). Randomized Trial of Oral Teriflunomide for Relapsing Multiple Sclerosis. New England Journal of Medicine 365:1293-1303.
- O'Leary DDM (1989). Do cortical areas emerge from a protocortex? Trends in Neurosciences 12:400-406.
- Olson L, Seiger A, Stromberg I (1982). Intraocular transplantation in rodents: a detailed account of the procedure and example of its use in neurobiology with special reference to brain tissue grafting. In S. Federoff and L. Hertz (Eds.), Advances in Cellular Neurobiology, Vol. 4, Academic Press, New York, 407-442.
- Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. Nat Biotech 26:313-315.
- Osakada F, Jin Z-B, Hirami Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takahashi M (2009). In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. Journal of Cell Science 122:3169-3179.
- Oswald MJ, Tantirigama ML, Sonntag I, Hughes SM, Empson RM (2013). Diversity of Layer 5 Projection Neurons in the Mouse Motor Cortex. Frontiers in Cellular Neuroscience 7.

~P~

- Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC (2011). CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. Journal of Neuroinflammation 8:9-9.
- Paglinawan R, Malipiero U, Schlapbach R, Frei K, Reith W, Fontana A (2003). TGFβ directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. Glia 44:219-231.

- Perlow M, Freed W, Hoffer B, Seiger A, Olson L, Wyatt R (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. Science 204:643-647.
- Perry VH, Anthony DC, Bolton SJ, Brown HC (1997). The blood-brain barrier and the inflammatory response. Molecular Medicine Today 3:335-341.
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. Nat Rev Immunol 7:161-167.
- Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K (2009). The subcellular organization of neocortical excitatory connections. Nature 457:1142-1145.
- Pimeisl I-M, Tanriver Y, Daza RA, Vauti F, Hevner RF, Arnold H-H, Arnold SJ (2013). Generation and characterization of a tamoxifen-inducible EomesCreER mouse line. genesis 51:725-733.
- Pinaudeau C, Gaillard A, Roger M (2000). Stage of specification of the spinal cord and tectal projections from cortical grafts. European Journal of Neuroscience 12:2486-2496.
- Plumet J, Cadusseau J, Roger M (1990). Fetal cortical transplants reduce motor deficits resulting from neonatal damage to the rat's frontal cortex. Neuroscience Letters 109:102-106.
- Plumet J, Ebrahimi A, Roger M (1993). Partial recovery of skilled forelimb reaching after transplantation of fetal cortical tissue in adult rats with motor cortex lesion. Anatomical and functional aspects. Restor Neurol Neurosci 6: 9-27.
- Pomeshchik Y, Kidin I, Korhonen P, Savchenko E, Jaronen M, Lehtonen S, Wojciechowski S, Kanninen K, Koistinaho J, Malm T (2015). Interleukin-33 treatment reduces secondary injury and improves functional recovery after contusion spinal cord injury. Brain, Behavior, and Immunity 44:68-81.
- Pratt BM et McPherson JM (1997). TGF-β in the central nervous system: Potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. Cytokine and Growth Factor Reviews 8:267-292.
- Pronichev IV et Lenkov DN (1998). Functional mapping of the motor cortex of the white mouse by a microstimulation method. Neurosci Behav Physiol 28:80-85.
- Przedborski S (2004). Programmed Cell Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Importance. The Neurologist 10:1-7.

~R~

- Raivich G (2005). Like cops on the beat: the active role of resting microglia. Trends in Neurosciences 28:571-573.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999). Neurological activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. Brain Res Rev 30: 77.
- Rakic P (1988). Specification of cerebral cortical areas. Science 241:170-176.
- Rakic P (2003). Developmental and Evolutionary Adaptations of Cortical Radial Glia. Cerebral Cortex 13:541-549.

- Rakic P (2007). The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. Brain research reviews 55:204-219.
- Rakic P et Lombroso PJ (1998). Development of the Cerebral Cortex: I. Forming the Cortical Structure. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry 37:116-117.
- Redell JB, Moore AN, Grill RJ, Johnson D, Zhao J, Liu Y, Dash PK (2013). Analysis of Functional Pathways Altered after Mild Traumatic Brain Injury. Journal of Neurotrauma 30:752-764.
- Reiner A, Hart NM, Lei W, Deng Y (2010). Corticostriatal Projection Neurons Dichotomous Types and Dichotomous Functions. Frontiers in Neuroanatomy 4.
- Reiner A, Jiao Y, Del Mar N, Laverghetta AV, Lei WL (2003). Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. The Journal of Comparative Neurology 457:420-440.
- Rezaie P, Trillo-Pazos G, Everall IP, Male DK (2002). Expression of β -chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: Potential role of chemokines in the developing CNS. Glia 37:64-75.
- Riolobos AS, Heredia M, de la Fuente JA, Criado JM, Yajeya J, Campos J, Santacana M (2001). Functional Recovery of Skilled Forelimb Use in Rats Obliged to Use the Impaired Limb after Grafting of the Frontal Cortex Lesion with Homotopic Fetal Cortex. Neurobiology of Learning and Memory 75:274-292.
- Riva-Depaty I, Fardeau C, Mariani J, Bouchaud C, Delhaye-Bouchaud N (1994). Contribution of Peripheral Macrophages and Microglia to the Cellular Reaction after Mechanical or Neurotoxin-Induced Lesions of the Rat Brain. Experimental Neurology 128:77-87.
- Roger M et Ebrahimi-Gaillard A (1994). Anatomical and Functional Characteristics of Fetal Neocortex Transplanted into the Neocortex of Newborn or Adult Rats. In: Reviews in the Neurosciences, vol. 5, p 11.
- Rosenstein JM et Krum JM (2004). New roles for VEGF in nervous tissue—beyond blood vessels. Experimental Neurology 187:246-253.

- Saha, B., Jaber, M., Gaillard, A. (2012). Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. Front. Cell. Neurosci. 6: article 14.
- Saha B, Peron S, Murray K, Jaber M, Gaillard A (2013). Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. Stem Cell Res. 11(3):965-77
- Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Siren A-L (1997). Global Forebrain Ischemia Results in Differential Cellular Expression of Interleukin-1[beta] (IL-1[beta]) and its Receptor at mRNA and Protein Level. J Cereb Blood Flow Metab 17:1107-1120.

- Sandor R, Gonzalez MF, Moseley M, Sharp FR (1991). Motor Deficits Are Produced By Removing Some Cortical Transplants Grafted Into Injured Sensorimotor Cortex of Neonatal Rats. Journal of Neural Transplantation & Plasticity 2:221-233.
- Santos-Torres J, Heredia M, Riolobos AS, Jiménez-Díaz L, Gómez-Bautista V, de la Fuente A, Criado JM, Navarro-López J, Yajeya J (2009). Electrophysiological and Synaptic Characterization of Transplanted Neurons in Adult Rat Motor Cortex. Journal of Neurotrauma 26:1593-1607.
- Schlaggar B et O'Leary D (1991). Potential of visual cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex. Science 252:1556-1560.
- Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF (2005). Closed head injury—an inflammatory disease? Brain Research Reviews 48:388-399.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA (2005). IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. Immunity 23:479-490.
- Schubert D, Kötter R, Luhmann HJ, Staiger JF (2006). Morphology, Electrophysiology and Functional Input Connectivity of Pyramidal Neurons Characterizes a Genuine Layer Va in the Primary Somatosensory Cortex. Cerebral Cortex 16:223-236.
- Schwartz JP, Nishiyama N, Wilson D, Taniwaki T (1994). Receptor-mediated regulation of neuropeptide gene expression in astrocytes. Glia 11:185-190.
- Sharp FR et Gonzalez MF (1984). Fetal frontal cortex transplant (14C) 2-deoxyglucose uptake and histology: Survival in cavities of host rat brain motor cortex. Neurology 34:1305.
- Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HPC, Livesey FJ (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. Nat Neurosci 15:477-486.
- Shibata M, Gulden FO, Sestan N (2015). From trans to cis: transcriptional regulatory networks in neocortical development. Trends in Genetics 31:77-87.
- Shimogori T, Banuchi V, Ng HY, Strauss JB, Grove EA (2004). Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. Development 131:5639-5647.
- Silver J, Miller JH (2004). Regeneration beyond the glial scar. Nat Rev Neurosci. 5(2):146-156. Review
- Sköld MK, Gertten CV, Sandbergnordqvist A-C, Mathiesen T, Holmin S (2005). VEGF and VEGF Receptor Expression after Experimental Brain Contusion in Rat. Journal of Neurotrauma 22:353-367.
- Sloan SA et Barres BA (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. Current opinion in neurobiology 27:75-81.
- Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G (2009). Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. Stem cells 27:543-549.
- Song W-J et Murakami F (1998). Development of Functional Topography in the Corticorubral Projection: An In Vivo Assessment Using Synaptic Potentials Recorded from Fetal and Newborn Cats. The Journal of Neuroscience 18:9354-9364.

- Stenevi U, Bjo[°]rklund A, Svendgaard N-A (1976). Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: Techniques and conditions for survival. Brain Research 114:1-20.
- Stein DG, Palatucci C, Kahn D, Labbe R (1988). Temporal factors influence recovery of function after embryonic brain tissue transplants in adult rats with frontal cortex lesions. Behav Neurosci 102: 260-267, 325-326.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999). Reactive microgliosis. Progress in Neurobiology 57:563-581.
- Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T (1993). Transforming growth factor- β suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. J Immunol 151: 2150-2158.

~T~

- Tabata H (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. Frontiers in Neuroscience 9.
- Takahashi K et Yamanaka S (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell 126:663-676.
- Takahashi T, Nowakowski R, Caviness V (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. The Journal of Neuroscience 15:6046-6057.
- Tennant KA, Adkins DL, Donlan NA, Asay AL, Thomas N, Kleim JA, Jones TA (2011). The Organization of the Forelimb Representation of the C57BL/6 Mouse Motor Cortex as Defined by Intracortical Microstimulation and Cytoarchitecture. Cerebral Cortex 21:865-876.
- Thompson LH, Grealish S, Kirik D, Björklund A (2009). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. European Journal of Neuroscience 30:625-638.
- Thorburne SK et Juurlink BHJ (1996). Low Glutathione and High Iron Govern the Susceptibility of Oligodendroglial Precursors to Oxidative Stress. Journal of Neurochemistry 67:1014-1022.
- Tissir F et Goffinet AM (2003). Reelin and brain development. Nat Rev Neurosci 4:496-505.

Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB (1991). Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. Neuroscience 44:613-625.

- Vallières L et Sawchenko PE (2003). Bone Marrow-Derived Cells that Populate the Adult Mouse Brain Preserve Their Hematopoietic Identity. The Journal of Neuroscience 23:5197-5207.
- Villapol S, Byrnes KR, Symes AJ (2014). Temporal Dynamics of Cerebral Blood Flow, Cortical Damage, Apoptosis, Astrocyte–Vasculature Interaction and Astrogliosis in the Pericontusional Region after Traumatic Brain Injury. Frontiers in Neurology 5:82.
- Vitarbo EA, Chatzipanteli K, Kinoshita K, Truettner JS, Alonso OF, Dietrich WD (2004). Tumor Necrosis Factor α Expression and Protein Levels after Fluid Percussion Injury in Rats: The Effect of Injury Severity and Brain Temperature. Neurosurgery 55:416-425.

~W~

- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009). Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. The Journal of Neuroscience 29:3974-3980.
- Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, Liou AK-F, Leak RK, Gao Y, Chen J (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 33:1864-1874.
- Wang T, Xiong J-Q, Ren X-B, Sun W (2012). The role of Nogo-A in neuroregeneration: A review. Brain Research Bulletin 87:499-503.
- Wang Y, Lin S-Z, Chiou A-L, Williams LR, Hoffer BJ (1997). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Protects against Ischemia-Induced Injury in the Cerebral Cortex. The Journal of Neuroscience 17:4341-4348.
- Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. Nat Neurosci 8:288-296.
- Wernig M, Zhao J-P, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:5856-5861.
- Wicher G, Husic E, Nilsson G, Forsberg-Nilsson K (2013). Developmental expression of IL-33 in the mouse brain. Neuroscience Letters 555:171-176.
- Wilson SI et Edlund T (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. Nat Neurosci.

- Won C, Lin Z, Kumar T P, Li S, Ding L, Elkhal A, Szabó G, Vasudevan A (2013). Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. Nat Commun 4.
- Wonders CP, Anderson SA(2006). The origin and specification of cortical interneurons. Nat Rev Neurosci. 7(9):687-696.
- Woodcock T et Morganti-Kossmann MC (2013). The Role of Markers of Inflammation in Traumatic Brain Injury. Frontiers in Neurology 4:18.
- Woodroofe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, Cuzner ML (1991). Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. Journal of Neuroimmunology 33:227-236.

~X~

Xiong Y, Mahmood A, Chopp M (2010). Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000) 11:298-308.

~Y~

- Yang EY, Moses HL (1990). Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. J Cell Biol. 111(2):731-41.
- Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2011). Production and functions of IL-33 in the central nervous system. Brain Research 1385:8-17.
- Yiu G et He Z (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. Nat Rev Neurosci 7:617-627.
- Young Kaylene M, Psachoulia K, Tripathi Richa B, Dunn S-J, Cossell L, Attwell D, Tohyama K, Richardson William D (2013). Oligodendrocyte Dynamics in the Healthy Adult CNS: Evidence for Myelin Remodeling. Neuron 77:873-885.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2008). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived From Human Somatic Cells. Obstetrical & Gynecological Survey 63:154-155.

- Zaman V et Shetty AK (2002). Combined neurotrophic supplementation and caspase inhibition enhances survival of fetal hippocampal CA3 cell grafts in lesioned CA3 region of the aging hippocampus. Neuroscience 109:537-553.
- Zeng H, Guo M, Martins-Taylor K, Wang X, Zhang Z, Park JW, Zhan S, Kronenberg MS, Lichtler A, Liu H-X, Chen F-P, Yue L, Li X-J, Xu R-H (2010). Specification of Region-Specific Neurons Including Forebrain Glutamatergic Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells. PLoS ONE 5:e11853.
- Zhang R, Chopp M, Zhang ZG (2013). Oligodendrogenesis after cerebral ischemia. Frontiers in Cellular Neuroscience 7:201.
- Zhang Z-W et Deschênes M (1997). Intracortical Axonal Projections of Lamina VI Cells of the Primary Somatosensory Cortex in the Rat: A Single-Cell Labeling Study. The Journal of Neuroscience 17:6365-6379.
- Zhang ZW et Deschênes M (1998). Projections to layer VI of the posteromedial barrel field in the rat: a reappraisal of the role of corticothalamic pathways. Cerebral Cortex 8:428-436.
- Zhou J-M, Chu J-X, Chen X-J (2008). An improved protocol that induces human embryonic stem cells to differentiate into neural cells in vitro. Cell Biology International 32:80-85.
- Zhu Y, Roth-Eichhorn S, Braun N, Culmsee C, Rami A, Krieglstein J (2000). The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. Brain Research 866:286-298.
- Ziebell J et Morganti-Kossmann M (2010). Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. Neurotherapeutics 7:22-30.
- Zilles K, Wree A (1995) Cortex: areal and laminar structure. In: The rat nervous system (Paxinos G, ed) San Diego, CA Academic Press: 649-685.