

## Les astrocytes, cellules relais des interactions neuro-immunes dans le système nerveux central

par Pascale Giraudon, Christophe Malcus\*, Aurélie Chalon, Peggy Vincent, Seng Khuth, Arlette Bernard, Marie-Françoise Belin

Inserm U433 Faculté de Médecine R Laënnec, 69372 Lyon Cedex 08

\* Laboratoire de Biologie, Immunologie, Hôpital Neurologique, Lyon

Correspondance P. Giraudon : e-mail giraudon@lyon.inserm.fr Fax 04 78 77 86 16

Reçu le 28 novembre 2002

### RÉSUMÉ

L'astrocyte joue un rôle prépondérant dans la régulation des réponses immunes au sein du système nerveux central. Afin d'analyser les cascades moléculaires complexes suspectées de conduire à des atteintes neuroinflammatoires, nous avons établi *in vitro* un modèle d'interaction de lymphocytes T chroniquement activés avec des astrocytes humains (Dev-Ast), des astrocytes et oligodendrocytes de Rat en culture primaire, ou bien des précurseurs nerveux multipotents (lignée Dev). Nous montrons que les astrocytes humains et de Rat ont un profil réactif après contact avec les lymphocytes T activés. Leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est élevée et se traduit par une augmentation de leur expression de métalloprotéases (MMP) et d'inhibiteurs endogènes spécifiques (TIMP). Ces modulations sont retrouvées dans les précurseurs nerveux. L'altération du système protéolytique MMP/TIMP est associée à une mort cellulaire induite par le contact lymphocytaire. Nous montrons que MMP et TIMP sont impliqués dans les cascades de signalisation de mort. Les

lymphocytes T activés induisent une apoptose des précurseurs nerveux, médiée par Fas et leur sensibilité à l'apoptose est potentialisée par des inhibiteurs de MMP. Une stabilisation de Fas en surface par une inhibition de son clivage via des TIMP est suspectée. Les lymphocytes T activés induisent également l'apoptose d'oligodendrocytes immatures présents dans la culture gliale mixte. Cette mort est associée à une altération du système MMP/TIMP dans les astrocytes et est médiée par Fas dont l'expression est augmentée sur les oligodendrocytes. Ainsi, le dialogue établi entre lymphocytes T activés et cellules nerveuses induit une cascade moléculaire impliquant les cytokines pro-inflammatoires et le système protéolytique MMP/TIMP. Dans ce dialogue, le relais astrocytaire apparaît comme crucial dans le processus qui conduit à la mort de cellules nerveuses. Une altération du système MMP/TIMP détectée chez des patients développant une atteinte neuroinflammatoire, la myélopathie associée à l'infection par le rétrovirus HTLV-1, renforce cette hypothèse.

### SUMMARY Role of astrocytes in neuroimmune interaction

The astrocyte, the major glial cell in the central nervous system, may influence many aspects of inflammation and immune reactivity within the brain. We have established a model of chronically activated T lymphocytes, interacting with neural cells of diverse origin to study the complex immune regulatory system suspected to lead to neuroinflammatory diseases. We show that human astrocytes became reactive following T cell contact, secreting proinflammatory cytokines, matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP). The altered MMP/TIMP system was shown to be involved in deleterious effects displayed by activated T cells towards human multipotent neural precursors by controlling their sensitivity to T cell-induced Fas-mediated apoptosis. MMP/TIMP was suspected to

stabilize Fas at the cell membrane. In a model of mixed rat glial cells in primary culture (astrocytes, oligodendrocytes), activated T lymphocytes induced the collapse of processes and the death of immature oligodendrocytes. These effects were associated with upregulation of Fas at the cell surface of oligodendrocytes and secretion of MMP and TIMP by astrocytes. By amplifying the expression of inflammatory molecules including the MMP/TIMP system, astrocytes appear to be a crucial relay in the deleterious molecular cascade triggered by activated T lymphocytes. Detection of altered MMP/TIMP in patients suffering from myelopathy associated with retroviral infection (HTLV-1) strongly suggests its involvement in the physiopathological process of the disease.

## INTRODUCTION

L'astrocyte, cellule « étoilée » décrite par Ramon y Cajal en 1913, a récemment acquis son statut de « star » grâce aux progrès en neurobiologie de ces décennies.

Ces cellules gliales émettent de nombreux prolongements et, par leur intermédiaire, entrent en contact avec diverses cellules du système nerveux central (SNC). Les astrocytes ne sont donc pas cette « glue soutien de neurone », décrite par Virchow en 1846, mais apparaissent comme le carrefour obligé entre neurones, oligodendrocytes et cellules endothéliales.

### Astrocyte et fonction synaptique

Les astrocytes établissent avec les neurones des contacts étroits au niveau des corps cellulaires et des dendrites, déterminant ainsi l'environnement neuronal dont dépendent les fonctions cérébrales. Equipés de transporteurs (pompes ou échangeurs ioniques, transporteurs de neuromédiateurs), les astrocytes jouent un rôle important dans le fonctionnement des synapses (Schousboe *et al.*, 1992). Au cours de l'activité neuronale, ils ajustent en permanence l'homéostasie acido-basique du milieu extracellulaire. Ils favorisent également l'homéostasie des ions  $K^+$ , donc optimisent le potentiel d'action par leur recapture et leur diffusion au sein du réseau astrocytaire via des jonctions communicantes. Ils jouent également un rôle actif dans la recapture du glutamate et de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), participant ainsi à l'inactivation de ces principaux neuromédiateurs, respectivement excitateur et inhibiteur, et à la synthèse de précurseurs métaboliques du « pool » de ces neurotransmetteurs fournis alors aux neurones (Deitmer, 2001). Les astrocytes établissent aussi des contacts étroits avec les cellules endothéliales de la plupart des capillaires. Les pieds astrocytaires leur permettent de capturer le glucose sanguin afin de le stocker sous forme de glycogène. L'élévation de l'activité neuronale entraîne alors son métabolisme en lactate, substrat énergétique principal du neurone fourni par l'astrocyte (Dienel and Hertz, 2001). Enfin, la présence de récepteurs astrocytaires fonctionnels pour les neurotransmetteurs libérés par le neurone, et leur capacité de synthèse des neuropeptides, renforcent l'idée d'une boucle régulatrice entre neurone et astrocyte, confirmant l'astrocyte dans son rôle de neuromodulateur.

### Astrocyte et réponse inflammatoire

L'astrocyte a également un rôle d'immunorégulateur, influençant l'inflammation et la réactivité immunitaire au sein du SNC. Par sa position stratégique, en communication étroite avec la microvasculature, l'astrocyte est une cible privilégiée des cellules immunes qui traversent la barrière sang/cerveau. Quelle que soit leur spécificité, les lymphocytes T activés infiltrent en permanence le SNC et participent à sa surveillance immunitaire (Hickey, 2001). Cet influx est augmenté en condition patholo-

gique (infection, neurodégénération, ischémie...), et repose sur la synthèse locale de chimiokines, en particulier par les astrocytes qui ont la capacité de produire RANTES, IL-8, MCP-1 et IP10 (Ghazanfari and Stewart, 2001). Le caractère « privilégié » du SNC vis-à-vis du système immunitaire fait que les lymphocytes T infiltrant le tissu nerveux sont rapidement détruits par un système mettant en jeu le récepteur de mort Fas et son ligand, FasL, produit par l'astrocyte et le neurone. Chez les patients développant une atteinte neuroinflammatoire, en particulier la sclérose en plaques (SEP), le fait que les lymphocytes T infiltrés dans le SNC soient résistants au système Fas/FasL expliquerait leur persistance au sein du parenchyme cérébral (Sabelko-Downes *et al.*, 1999).

L'interaction de ces lymphocytes T avec les astrocytes conditionne leur fonction. A l'image du système immunitaire périphérique, les lymphocytes T présents dans le SNC peuvent être de trois types. De type Th1, les lymphocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , interleukine-1 (IL-1), interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), et conduisent à une activation astrocytaire et microgliale/macrophagique, entraînant des dommages tissulaires. De type Th2, les lymphocytes sécrètent les interleukines -4, -5, et -10, inhibant l'inflammation. De type Th3, les lymphocytes sécrètent IL-4 et -10 et/ou TGF- $\beta$ , inhibant également l'inflammation. Ces divers types lymphocytaires sont favorisés par les cytokines présentes dans leur microenvironnement, sécrétées notamment par les cellules gliales. IL-12 et IFN- $\gamma$  facilitent les Th1, IL-4 promeut les Th2 et inhibe les Th1 tandis que IL-4 en absence de IL-12 promeut les Th3. Les astrocytes produisent IL-1, IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , TNF- $\alpha$ , - $\beta$ , TGF- $\beta$  en fonction des signaux extracellulaires reçus. De ce fait, les astrocytes vont influencer les réponses Th1, pro-inflammatoires, versus les réponses Th2 et Th3, anti-inflammatoires, au sein du SNC (Dong and Benveniste, 2001). L'interaction entre lymphocytes T et astrocytes peut être donc être bénéfique ou délétère en fonction des cascades moléculaires mises en jeu.

Ainsi, les fonctions multiples de l'astrocyte dans le fonctionnement cérébral l'impliquent comme acteur d'un grand nombre d'atteintes neurologiques, mettant en jeu des mécanismes potentialisant ou annulant l'effet des attaques pathologiques induites lors d'une infection virale, d'une ischémie, d'une anomalie métabolique... (Belin *et al.*, 1997; Little and O'Callaghan, 2001; Ashner *et al.*, 2002).

### Astrocyte, inflammation et infection virale : cas de la myélopathie associée à l'infection par HTLV-1

Les atteintes neuroinflammatoires sont caractérisées par la présence constante de lymphocytes T dans le SNC des patients. Le fait que ces lymphocytes T soient activés leur confère une potentialité délétère vis-à-vis des cellules du SNC, non seulement par l'intermédiaire d'une réponse immunitaire spécifique (cytotoxicité MHC restreinte), mais aussi en mettant en jeu des molécules de l'inflammation de type cytokine et protéases (Giraudon

*et al.*, 1996; Giraudon *et al.*, 2000). L'étude des mécanismes physiopathogéniques mis en jeu peut être réalisée grâce à des modèles d'atteintes neuroinflammatoires où les perturbations immunes et cérébrales sont fortes et maintenues dans le temps. Les myélopathies associées à une infection virale en sont un exemple.

Le rétrovirus humain à tropisme lymphocytaire, HTLV-1, est l'agent étiologique, chez moins de 5 % des patients infectés, d'une leucémie à cellule T de l'adulte (ATL) ou d'une myélopathie, la paraparésie spastique tropicale associée à HTLV-1 (TSP/HAM) (Gessain *et al.*, 1985). Une dominance de la réponse lymphocytaire de type Th1 est observée chez ces patients. HTLV-1 infecte préférentiellement les lymphocytes de type CD4 et CD8. L'intégration du provirus dans le génome cellulaire entraîne une activation permanente de ces lymphocytes par l'intermédiaire d'une protéine virale, Tax, qui a la capacité de transactiver le promoteur de nombreux gènes cellulaires, en particulier les gènes impliqués dans la prolifération lymphocytaire (Hollberg, 1999). Tax a la capacité d'induire l'expression, dans les lymphocytes T, de IL-1- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-15, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, MIP-1- $\alpha$ , IP-10 et MCP-1 (Grant *et al.*, 2002). La sécrétion de ces cytokines et chimiokines est retrouvée à des taux élevés au niveau sanguin, mais aussi dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients TSP/HAM puisque les lymphocytes T infectés, chroniquement activés, infiltrent leur SNC (Umehara *et al.*, 1993). De plus, les cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1- $\alpha$  ont été détectées dans les astrocytes activés présents au sein des lésions (Umehara *et al.*, 1994).

Les lymphocytes T infiltrant le SNC sont suspectés de prendre part à des événements conduisant à l'infection de cellules résidentes du SNC, à l'activation des astrocytes et des cellules microgliales, à l'induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, et au recrutement des infiltrats inflammatoires retrouvés autour des vaisseaux et dans le parenchyme (Giraudon *et al.*, 1996 et articles dans la revue; Grant *et al.*, 2002). Ils seraient ainsi responsables de la dérégulation de l'homéostasie astrocytaire et oligodendrocytaire (Szymocha *et al.*, 2000c; Szymocha *et al.*, 2000a), de la démyélinisation et de la perte axonale caractéristiques de la TSP/HAM (Umehara *et al.*, 2000). L'établissement de modèle d'interaction entre ces lymphocytes T chroniquement activés et des astrocytes nous a permis de décrypter certains des mécanismes moléculaires susceptibles d'intervenir dans le processus délétère à la base de la TSP/HAM, processus potentiellement partagé par des myélopathies d'étiologie différente.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Modèle de neuro-inflammation : interaction entre lymphocytes T chroniquement activés et astrocytes

Notre modèle d'interaction cellulaire est constitué de lymphocytes T infectés par HTLV-1, les lignées lym-

phocytaires C91PL et C8166/45, respectivement productrices ou non de virus (Popovic *et al.*, 1983). Ces lymphocytes sont chroniquement activés comme l'indique leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, quantifiée par ELISA (R&D system : IL-1 $\beta$  : 40-120 pg/ml; IL-6 : 3000-32000 pg/ml; TNF- $\alpha$  : 150-820 pg/ml; TNF- $\beta$  : 7500-17500 pg/ml), et l'expression élevée du marqueur d'activation lymphocytaire CD25 détecté par cytométrie de flux. Ces lymphocytes sont cultivés en suspension (5 % CO<sub>2</sub> à 37°C) en milieu RPMI-1640 complété par 10 % de sérum de veau fœtal. Après leur irradiation pour éviter leur prolifération, ils sont mis en contact transitoire (20 heures) avec des cellules nerveuses d'origine diverse. Ce sont i) des astrocytes en primoculture issus de cortex cérébral de raton nouveau-nés (Szymocha *et al.*, 2000c), seuls ou en culture mixte avec des oligodendrocytes; ii) des précurseurs nerveux humains multipotents, la lignée Dev (Derrington *et al.*, 1998, Buzanska *et al.*, 2001) établie à partir d'une tumeur neuroectodermique indifférenciée; iii) des astrocytes humains provenant d'un clone différencié de cette lignée (Dev-Ast). Ces cellules nerveuses sont cultivées en milieu DMEM-Glutamax complété par 10 % de sérum de veau fœtal. L'expression de la GFAP (glial fibrillary acidic protein), élément du cytosquelette spécifique de l'astrocyte, est détectée dans les astrocytes humains et de rat. Les oligodendrocytes sont détectés par des anticorps spécifiques de leur stade de maturation (OL immatures : CNPase, GalCer; OL matures : MBP; pré-OL : NG2)

Les anticorps spécifiques anti-CNPase/Sigma, anti-GalCer, anti-NG2/Chemicon, anti-GFAP/ Dako, anti-vimentine/Dako, anti-caspase-3 active/Santa Cruz et anti-caspase-9 active/PharMingen sont utilisés en immunofluorescence, identifient les astrocytes et oligodendrocytes et détectent l'activation des caspases comme précédemment décrit (Szymocha *et al.*, 2000b). Les anticorps anti-PARP/Roche, anti-tBid/Santa Cruz sont utilisés en WesternBlot comme précédemment décrit (Giraudon *et al.*, 2000). Les molécules Fas-Fc/R&D, les anticorps anti-Fas ZB4/Immunotech, anti-MMP-9; anti-ADAM-17/Santa Cruz; anti-TIMP-1, anti-TIMP-2, anti-TIMP-3, et anti-TIMP-4/Chemicon, sont utilisés à raison de 1-10  $\mu$ g/5.10<sup>4</sup> cellules pour moduler la mort des cellules nerveuses.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Les astrocytes en contact avec les lymphocytes T activés acquièrent un profil d'astrocytes réactifs

Dans les astrocytes primaires de Rat exposés aux lymphocytes T activés C91PL ou C8166/45, l'expression de la GFAP, détectée par immunofluorescence (protéine) ou RT-PCR (mRNA) est augmentée tandis que celle de la vimentine, autre élément du cytosquelette, et celle d'un « gène de ménage », cyclophiline (Cyp-A), restent inchangées (Figure-1A, RT-PCR). Cette modification

morphologique est associée à une augmentation de l'expression des mRNA codant pour les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1- $\alpha$  et IL-12 détectés par RT-PCR (Figure 1B). Dans les astrocytes humains (DevAst) issus de la lignée de précurseurs nerveux humains multipotents (Dev), la sécrétion à des taux élevés de TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$  et IL-6 est détectée par ELISA (Figure 1C). Ainsi, après contact avec les lymphocytes T chroniquement activés, les astrocytes acquièrent un phénotype caractéristique d'une gliose réactionnelle, semblable à celle détectée chez les patients TSP/HAM dans les lésions du SNC (Umehara *et al.*, 1994).

Dans un contexte inflammatoire, les astrocytes répondent à des stimuli variés par une augmentation de sécrétion de protéases (revue : Rosenberg, 2002). Les protéases matricielles (MMP), impliquées dans le clivage de molécules de la matrice extracellulaire et de molécules transmembranaires (Vu and Werb, 2000), ont la capacité

d'être régulées dans leur expression par les cytokines. La présence dans le promoteur de leur gène, des séquences régulatrices ciblées par les facteurs de transcription mis en jeu par les cytokines (sites NFkB, Sp-1, TIE), est responsable de cette modulation (Borden and Heller, 1997). La présence de MMP sécrétée par les astrocytes humains et de Rat a été recherchée par zymographie, une technique qui permet de détecter les MMP par leur activité, par ELISA (Amersham, BioTrack) et par RT-PCR (détection des mRNA). Nous avons observé que l'expression de MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 et TIMP-3 est augmentée dans les astrocytes de Rat et humains après contact avec les lymphocytes T activés (Giraudon *et al.*, 1996 ; Giraudon *et al.*, 1997 ; Giraudon *et al.*, 2000). Pour exemple, la sécrétion de MMP-9 et MMP-2, détectée par zymographie, est induite dans les astrocytes humains (Figure 1Da,c) après contact avec les lymphocytes T activés. Nous avons démontré que les

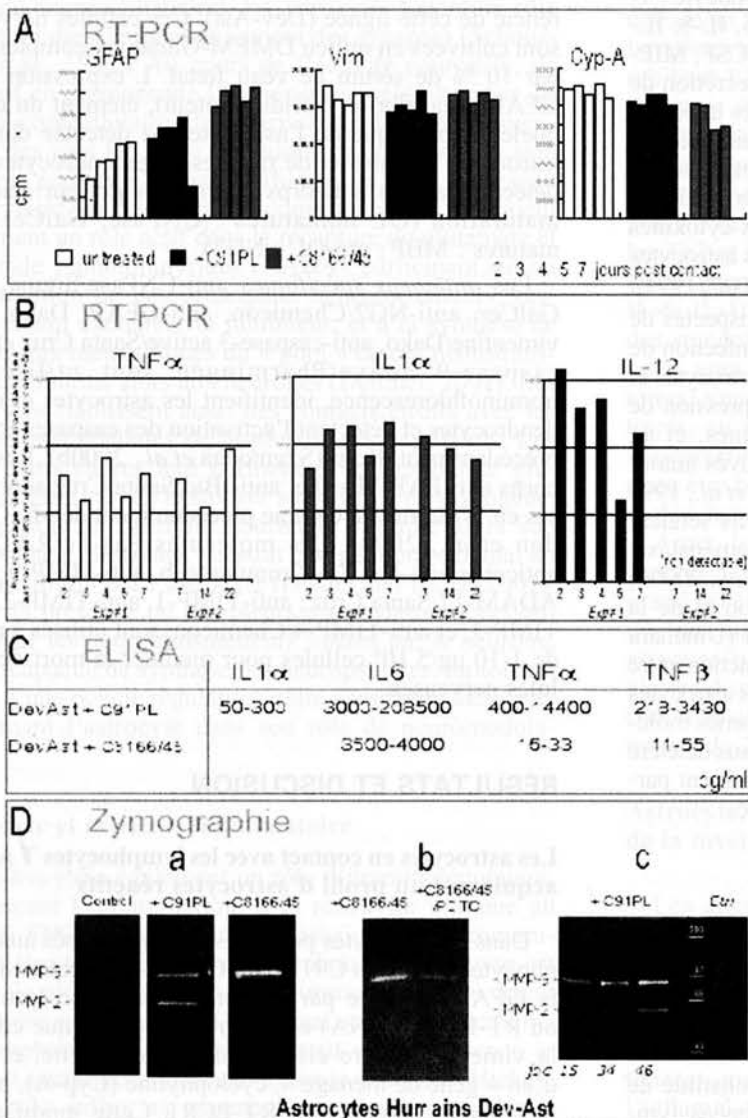


FIG. 1. – Les astrocytes acquièrent un profil réactif après contact avec des lymphocytes T activés.

Les ARNm codant GFAP détectés par RT-PCR sont augmentés dans les astrocytes de Rat (A). Les ARNm codant l'expression de cytokines proinflammatoires sont augmentés dans les astrocytes de Rat (B, RNAm) et humains, DevAst (C, protéine détectée par ELISA). Les métalloprotéases MMP-9 et MMP-2 détectées par zymographie sont induites dans les astrocytes humains (D, a,c). La réduction de sécrétion de TNF $\alpha$  par le PDTC réduit le niveau de MMP9 induit (b).

cytokines sécrétées par les lymphocytes T activés, ainsi que le contact lymphocyte/astrocyte via des intégrines, sont impliqués dans la modulation de l'expression astrocytaire de MMP. D'une part, l'effet des lymphocytes T sur la modulation de l'expression de MMP-9 et MMP-3 est mimé par le traitement des astrocytes par TNF- $\alpha$  et IL-1 (Giraudon *et al.*, 2000). Le traitement des lymphocytes T C8166/45 par le PDTC (pyrimidoldithiocarbamate), inhibiteur de la sécrétion de TNF- $\alpha$  par ces cellules (diminution de 22 %), réduit fortement leur capacité d'induire l'expression de MMP-9 par les astrocytes humains (Figure 1Db). D'autre part, le traitement des lymphocytes T par des anticorps spécifiques des intégrines impliquées dans le contact cellulaire, en particulier  $\alpha 1\text{-}\beta 1$  et  $\alpha 1\text{-}\beta 5$ , réduit fortement l'expression astrocytaire induite de MMP-9. Ces modifications de sécrétion de MMP sont maintenues au moins pendant 8 jours après contact transitoire avec les lymphocytes non infectieux et au moins 30 jours après contact avec les lymphocytes infectieux (Figure 1Dd). Dans les deux cas, ces expressions sont associées à une sécrétion maintenue de cytokines pro-inflammatoires, en particulier TNF- $\alpha$  (Szymocha *et al.*, 2000b). En parallèle, l'expression de molécules inhibitrices endogènes des MMP, TIMP-1 et TIMP-3 (pour *Tissue Inhibitor of MetalloProtease*) est augmentée, traduisant une perturbation de la balance MMP/TIMP dans ces cellules nerveuses.

L'ensemble de ces observations indiquaient que le contact de lymphocytes T activés induisait une profonde modification des astrocytes (gliose, cytokines pro-inflammatoires), semblable à celle observée dans le SNC des patients TSP/HAM. Nous avons par la suite démontré la présence de MMP-9 et de TIMP-3 associée à des taux élevés de néoptérine (marqueur de l'inflammation), dans le LCR de patients infectés par HTLV-1 et développant une TSP/HAM, et non dans celui des patients infectés restés asymptomatiques (Giraudon *et al.*, 1996; Giraudon *et al.*, 1997; Giraudon *et al.*, 1998; Lezin *et al.*, 2000). MMP-9 a également été détecté dans le SNC de patients TSP/HAM, dans les régions lésionnelles montrant une gliose réactionnelle (Giraudon *et al.*, 2000). D'autre part, dans un modèle murin d'infection cérébrale par un morbillivirus, nous avons démontré qu'une infiltration lymphocytaire au sein des régions cérébrales ciblées par le virus, est associée à une expression régionale spécifique de MMP et TIMP (Khuth *et al.*, 2001).

Ces différents travaux et ceux d'autres équipes, nous ont ainsi conduits à considérer les MMP comme des effecteurs secondaires des cytokines pro-inflammatoires au sein du SNC.

L'implication de ces protéases dans les altérations neurologiques associées à la neuroinflammation est suspectée en raison de l'activité pléiotropique de ces molécules (Yong *et al.*, 1998). Les métalloprotéases ont en effet des substrats très divers. Par leur capacité de cliver les molécules matricielles présentes dans le SNC, en particulier les collagènes, la laminine, la fibronectine ou la tenascine, les MMP participent au remodelage du microenvironnement neuronal et glial (Lukashev and Werb, 1998), donc aux interactions neurone-glie. Les MMP partici-

pent également à la maturation et à la régulation de l'activité de récepteurs membranaires. Ainsi ADAM-17, MMP-7 et MT4-MMP mûrent par clivage le TNF- $\alpha$  membranaire en TNF- $\alpha$  actif (English *et al.*, 2000). Il en est de même pour le récepteur du TNF, IL-6, L-sélectine et FasLigand. Ainsi, les MMP participent activement à la modulation de l'inflammation et de l'activité de systèmes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire. Une augmentation de MMP mal contrôlée par un taux non adapté de leurs inhibiteurs endogènes peut être délétère au sein du SNC.

Afin d'analyser l'implication du système protéasique MMP/TIMP dans les effets délétères mis en jeu par une inflammation, nous avons établi des modèles de mort de cellules nerveuses en présence de lymphocytes T activés. Nous avons alors examiné le rôle des MMP et TIMP dans les cascades moléculaires qui sous-tendent la mort cellulaire.

### Les lymphocytes T activés induisent une apoptose médiée par Fas des précurseurs nerveux

Un premier modèle concerne les précurseurs nerveux humains multipotents Dev (Beurton-Marduel, *soumis*). Un contact transitoire avec les lymphocytes T activés C8166/45 induit la mort des cellules Dev. Cette mort est détectable au deuxième jour après le contact lymphocytaire (mort de 15-20 % des cellules) et culmine au troisième jour (mort de 60-80 % des cellules). Cette mort tardive suggère qu'une cascade moléculaire inductrice de mort est progressivement mise en place dans les cellules nerveuses. Le contact avec des lymphocytes T non activés ne modifie pas le taux de mort naturelle de la culture (5-10 % au troisième jour de culture). La mort cellulaire induite par les lymphocytes T activés concerne essentiellement les précurseurs non différenciés majoritairement présents dans la culture. Elle est identifiée comme apoptotique par i) la formation de corps apoptotiques détectée par microscopie et coloration Dapi; ii) la fragmentation de l'ADN détectée par la méthode TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) en microscopie ( $14,9 \pm 5,3$  cellules TUNEL<sup>+</sup> par champ *versus*  $4,5 \pm 2,7$  dans la culture non traitée) et en cytométrie de flux (Figure 2A); iii) le clivage de la PARP [poly(ADP-ribose)polymerase] détectée par Western-blot. L'induction d'apoptose par les lymphocytes T activés a également été observée dans des primocultures provenant de la zone sous-ventriculaire (SVZ) d'un cortex cérébral humain fœtal, riche en précurseurs nerveux (Figure 2B). L'implication de molécules sécrétées par les lymphocytes T activés est objectivée par l'induction d'apoptose des précurseurs nerveux après leur traitement par le surnageant de culture provenant des lymphocytes T activés C8166/45.

Le récepteur de mort Fas est requis pour l'apoptose médiée par les lymphocytes T activés (Figure 2C). Un traitement des cocultures cellules nerveuses/lymphocyte T par l'anticorps bloquant Fas, ZB4, réduit de façon significative la mort des précurseurs nerveux :  $15,8 \pm 7,7$  et  $9,3 \pm 4,7$  cellules TUNEL<sup>+</sup> par champ au jour 2 post-

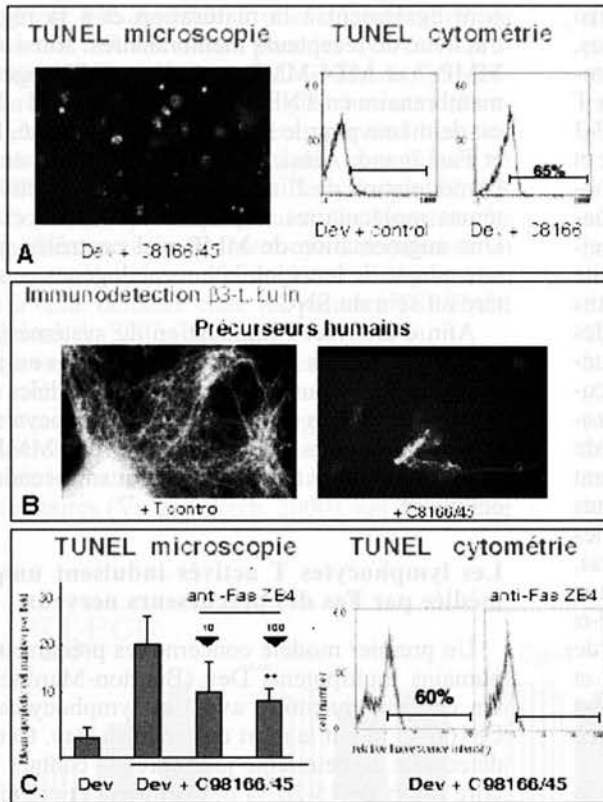


FIG. 2. – Les lymphocytes T activés induisent une apoptose des précurseurs nerveux médiée par Fas.

Détection de la fragmentation de l'ADN (méthode TUNEL) par microscopie et cytométrie de flux dans les précurseurs Dev (A). Les lymphocytes T activés induisent la mort de précurseurs nerveux humains en primoculture (détectés par  $\beta$ -3 tubuline, B). L'apoptose des précurseurs nerveux Dev est réduite par un traitement par l'anticorps bloquant Fas, ZB4 (microscopie, cytométrie de flux).

contact dans les cocultures traitées par 10 et 100 ng/ml d'anticorps *versus*  $20,8 \pm 5,7$  dans les cocultures non traitées. Le traitement par la molécule recombinante Fas-Fc, bloqueur de l'activation de Fas, a un effet semblable ( $23,3 \pm 8,3$  *versus*  $48,9 \pm 3,2$  cellules TUNEL<sup>+</sup> au jour 3 post-contact). Cette apoptose médiée par Fas implique la cascade des caspases. Le traitement des cocultures par les peptides DEVD, IETD ou LEHD, inhibiteurs respectivement des caspases-3, -8 et -9, diminue significativement le nombre de cellules en apoptose ( $3,8 \pm 2,8$ ,  $4,8 \pm 2,6$  et  $7,8 \pm 3,8$  cellules TUNEL<sup>+</sup> *versus*  $20,8 \pm 5,7$ ). Nous avons alors analysé la signalisation intracellulaire mise en jeu par l'activation de Fas.

Les travaux de Scaffidi (Scaffidi *et al.*, 1999) ont montré que l'activation de Fas par son ligand conduit à la formation d'un complexe inducteur de mort (DISC) au sein duquel la procaspase-8 est activée en caspase-8 active. Dans la signalisation de type 1, le niveau de caspase-8 est suffisant pour conduire directement à l'activation des caspases exécutrices, dont celle de caspase-3. Si le niveau de caspase-8 active est faible, une boucle d'amplification est mise en place. Ainsi, la signalisation Fas de type 2 implique la mitochondrie et l'apoptosome (libération d'APAF-1, clivage de Bid), conduisant à l'activation de pro-caspase-9 qui active en retour caspase-3. Diverses approches ont montré que dans notre modèle de mort des précurseurs nerveux, une signalisation de type 2 est mise en jeu après contact avec les lymphocytes T activés. La forme active de caspase-3 est détectée dans

les cultures apoptotiques par immunofluorescence ( $25,5 \pm 8,8$  cellules positives *versus*  $11,3 \pm 3,7$  dans la culture non traitée) (Figure 3A) et par un test d'activité dans le lysat cellulaire. Caspase-9 active est également immunodétectée (Figure 3A). Son expression est associée au clivage de Bid, et à la perte du potentiel de membrane mitochondrial (DFm) objectivée par la transition rouge-vert du colorant JC1 comme décrit par Cossarizza (Cossarizza *et al.*, 1993) (Figure 3B).

### Le système protéolytique MMP/TIMP est impliqué dans l'apoptose des précurseurs nerveux

L'implication des MMP et TIMP dans les cascades moléculaires conduisant à l'apoptose des précurseurs nerveux a été suspectée en raison, d'une part de l'activité pléiotropique de ces molécules, d'autre part, de la perturbation de la balance MMP/TIMP induite dans les cellules nerveuses par les lymphocytes T activés (paragraphe 2). Diverses observations nous ont permis de conclure que la balance MMP/TIMP module la susceptibilité à la mort des précurseurs nerveux. En effet, l'inhibition de MMP potentialise l'apoptose des précurseurs nerveux induite par les lymphocytes T activés. Un traitement de la coculture lymphocytes/cellules nerveuses soit i) par des anticorps anti-MMP (anti-MMP-9, anti-ADAM-17) (Figure 3C); ii) par des inhibiteurs chimiques de MMP (BB3103- British Biochem); iii) par la protéine recombinante TIMP-1 inhibitrice de nombreuses

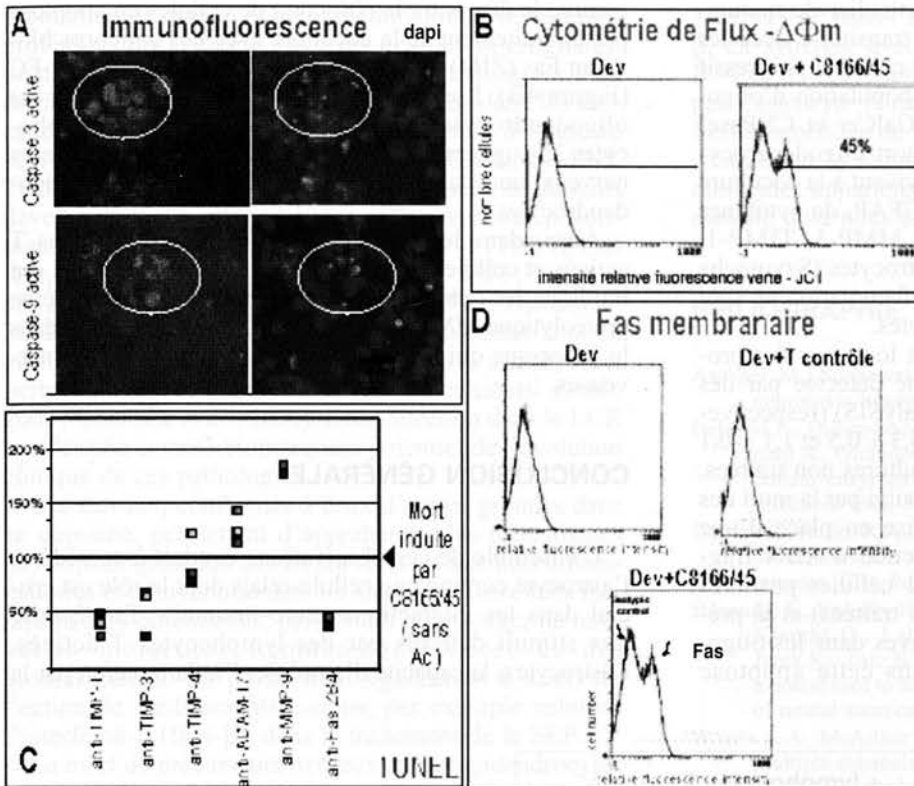


FIG. 3. – La susceptibilité des précurseurs nerveux à l'apoptose est modulée par le système MMP/TIMP.

La signalisation de Fas implique des caspases (A, caspase 3 et 9 actives détectées par immunofluorescence) et la mitochondrie (détection de la perte de potentiel de membrane (B,  $\Delta\Phi_m$ , colorant JC1). Un traitement par des anticorps anti-TIMP réduit la mort ; par des anti-MMP augmente la mort des précurseurs nerveux induite par les lymphocytes T activés (C, j2 post-contact). Exposition de Fas à la surface des précurseurs induite par les lymphocytes T activés (D, cytométrie de flux j2 post-contact).

MMP et adamalysines, augmente significativement le nombre de cellules nerveuses apoptotiques détectées au deuxième jour de coculture. A l'inverse, un traitement par des anticorps anti-TIMP-1 et anti-TIMP-3, réduit cette apoptose. Ainsi, la susceptibilité des précurseurs nerveux à l'apoptose induite par les lymphocytes T activés est corrélée à la présence d'inhibiteurs de MMP dans leur microenvironnement.

Des travaux récemment rapportés dans la littérature ont montré que l'inhibition de l'action protéasique de MMP module l'activité de divers récepteurs membranaires (Galisko and Tessier-Lavigne, 2000). D'autres travaux démontrent également un lien entre activité protéasique et sensibilité cellulaire à une mort médiée par Fas (Mitsiades *et al.*, 1999 ; Lee and Shacter, 2001). Nos propres observations indiquent qu'un traitement de cellules exprimant constitutivement Fas à leur surface (lignées lymphocytaires) par des inhibiteurs chimiques de MMP (BB3103, BB94) augmente significativement le niveau d'expression membranaire de Fas dans des lignées. Suspectant une action du système MMP/TIMP dans la stabilité de Fas à la surface cellulaire, nous avons analysé l'expression de Fas dans les cellules nerveuses au cours de la coculture avec les lymphocytes T activés. Non membranaire dans les précurseurs nerveux, Fas devient détectable à leur surface au deuxième jour après le contact avec les lymphocytes T activés (Figure 3D), moment où l'apoptose des cellules est observée. Cette modification n'est pas induite par un contact avec des

lymphocytes T non activés. L'ensemble de ces observations suggèrent que la susceptibilité à l'apoptose des précurseurs nerveux est corrélée à l'exposition de Fas à leur surface. Celle-ci est induite dans un contexte protéasique particulier. L'interferon- $\gamma$ , connu pour moduler l'activité de Fas sur les cellules nerveuses n'est pas impliqué puisqu'il n'est produit ni par les lymphocytes T, ni par les cellules nerveuses.

L'ensemble de ces observations suggère fortement que des inhibiteurs endogènes de MMP, en particulier TIMP-1 et TIMP-3, dont l'expression est augmentée dans les cellules nerveuses par le contact lymphocytaire, participent à la stabilisation de Fas à leur surface. Des analyses sont en cours pour démontrer cette hypothèse. Ainsi, par leur capacité de moduler la balance MMP/TIMP dans le microenvironnement des précurseurs nerveux, les lymphocytes T activés les rendent susceptibles à l'apoptose médiée par Fas.

### Les lymphocytes T activés induisent la mort des oligodendrocytes immatures

Afin d'analyser le rôle potentiellement délétère du système MMP/TIMP sur les oligodendrocytes, cellules myélinisantes du SNC, nous avons établi un modèle d'interaction de lymphocytes T activés (C8166/45) avec des primocultures gliales de Rat, constituées en parts égales d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Les oligodendrocytes sont détectés par immunofluorescence avec des anticorps

spécifiques déterminant un stade particulier de maturation. Nous montrons qu'un contact transitoire avec les lymphocytes T C8166/45 entraîne le collapsus progressif des prolongements cellulaires de la population d'oligodendrocytes immatures (exprimant GalCer et CNPase) (Figure 4A), collapsus suivi d'une mort oligodendrocytaire. Les astrocytes de la culture survivent à la coculture et sont activés. Les expressions de GFAP, de cytokines pro-inflammatoires, et de MMP-9, MMP-3, TIMP-1, TIMP-3 sont augmentées dans les astrocytes (Szymocha *et al.*, 2000b). Ces molécules de l'inflammation ne sont pas détectées dans les oligodendrocytes.

Une réduction du nombre et de la longueur des prolongements oligodendrocytaires a été détectée par des mesures en microscopie (logiciel AnalySIS) (respectivement  $1,3 \pm 0,2$  prolongement *versus*  $4,3 \pm 0,5$  et  $1,1 \pm 0,1$  mm *versus*  $2,7 \pm 0,2$  mm dans les cultures non traitées, à 48h) (Figure 4D). Ce collapsus est suivi par la mort des oligodendrocytes immatures. La mise en place d'une apoptose est objectivée par la détection d'ADN fragmenté (méthode TUNEL :  $19,2 \pm 8,1$  cellules positives *versus*  $7,3 \pm 5,5$  dans les cultures non traitées) et la présence de caspase-3 et caspase-9 actives dans les oligodendrocytes. Fas est impliqué dans cette apoptose

comme le démontre la réduction de cellules en apoptose par un traitement de la coculture avec des anticorps bloquant Fas (ZB4) et des molécules leurrees de Fas, Fas-FC (Figure 4B). L'expression de Fas est augmentée sur les oligodendrocytes après le contact avec les lymphocytes T, suggérant, comme dans le cas des précurseurs nerveux, une stabilisation de Fas à la surface des oligodendrocytes.

Ainsi, dans le dialogue établi entre lymphocytes T activés et cellules nerveuses, la cascade moléculaire qui implique les cytokines pro-inflammatoires et le système protéolytique MMP/TIMP apparaît comme essentiel dans le processus qui conduit à l'altération des cellules nerveuses.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ensemble de ces observations conduit à considérer l'astrocyte comme une cellule-relais dont le rôle est crucial dans les interactions neuro-immunes. En réponse aux stimuli délivrés par des lymphocytes T activés, l'astrocyte a la capacité d'amplifier l'inflammation par la

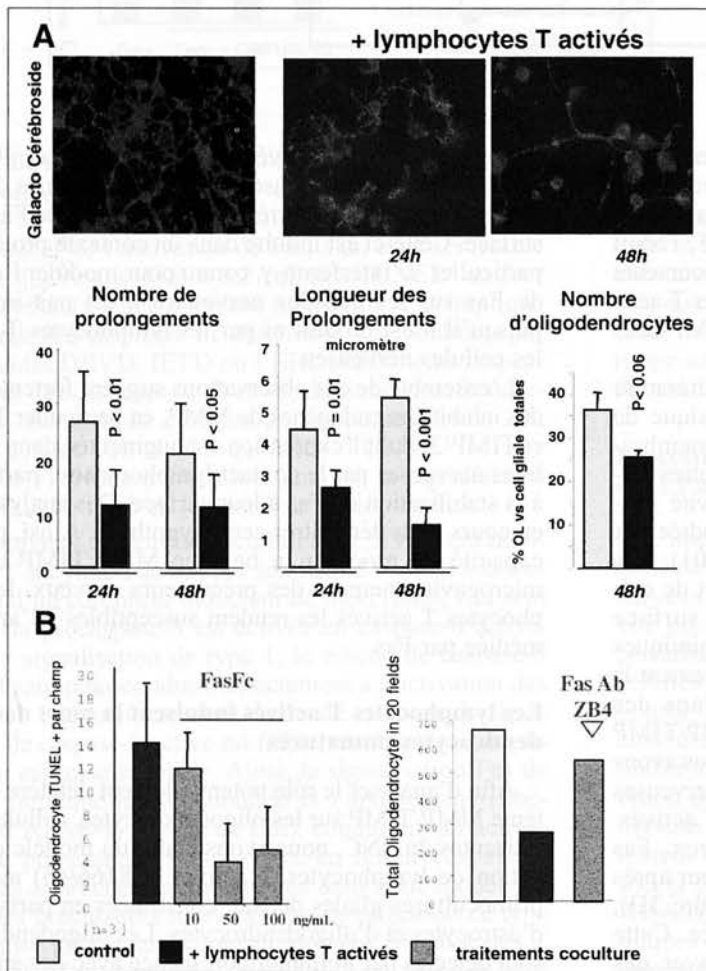


FIG. 4. – Les lymphocytes T activés induisent une apoptose médiée par Fas des oligodendrocytes.

Perte des prolongements astrocytaires et perte cellulaire induite par les lymphocytes T activés (A). La mort cellulaire est réduite par le blocage de l'activité de Fas (B, Fas-FC, anti-Fas bloquant ZB4).

production de cytokines pro-inflammatoires, de métalloprotéases. En synergie avec les cellules microgliales, dont le rôle amplificateur de l'inflammation est bien démontré, l'astrocyte peut ainsi intervenir dans les cascades moléculaires dont on suspecte l'action délétère au sein du SNC. La détection de TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , MMP-9, TIMP-3 dans le LCR et les tissus lésionnels de patients développant une atteinte neuro-inflammatoire, notamment une myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM) (Umehara *et al.*, 1994; Giraudon *et al.*, 1997; Lezin *et al.*, 2000) ou une SEP (Cuzner *et al.*, 1996; Lassmann, 2002), renforce cette hypothèse. Ces molécules sont en effet localisées dans les régions de gliose astrocytaire, perte axonale et démyélinisation (Lucchinetti *et al.*, 2000; Umehara *et al.*, 2000). Leur détection dans le LCR les identifie comme biomarqueur potentiel de l'évolution clinique de ces pathologies.

Ces travaux, confrontés à ceux d'autres groupes dans ce domaine, permettent d'appréhender les mécanismes physiopathogéniques mis en jeu dans les atteintes inflammatoires et démyélinisantes. Ils identifient des cibles thérapeutiques potentielles, permettant d'envisager de nouvelles molécules immunomodulatrices et des biomarqueurs. Ils permettent également d'analyser l'action de médicaments connus, par exemple celui de l'interféron- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), dans le traitement de la SEP.

La mort de précurseurs nerveux et d'oligodendrocytes immatures observée après contact avec des lymphocytes T activés suggère fortement qu'une population de cellules peu différenciées est particulièrement susceptible à l'action délétère des molécules de la cascade inflammatoire. L'intérêt de ces observations *in vitro* est conforté d'une part, par la détection d'une réduction résiduelle d'oligodendrocytes immatures dans la moelle épinière de patients SEP (Lassmann, 2002; Wolswijk, 2002) et, d'autre part, par l'observation chez la Souris, d'une sensibilité particulière des progéniteurs nerveux à un environnement inflammatoire astrocytaire (Vallieres *et al.*, 2002). Cet aspect est particulièrement à souligner dans le cadre des nouvelles thérapies de remplacement neuronal qui proposent l'utilisation de précurseurs nerveux comme source cellulaire potentielle (Horner and Gage, 2000).

L'effet immunomodulateur de l'IFN- $\beta$  vis-à-vis des lymphocytes T activés a été démontré au niveau de leur capacité migratoire et de leur sécrétion cytokinique (Stuve *et al.*, 1996; Galboiz *et al.*, 2001; Byrnes *et al.*, 2002). Un traitement par l'IFN- $\beta$  de lymphocytes T activés réduit fortement leur capacité de traverser une membrane mimant les interfaces sang-SNC et diminue leur sécrétion de MMP-9. L'implication des MMP dans la migration des cellules immunes a en effet été mise en évidence (Goetzl *et al.*, 1996). D'autre part, IFN- $\beta$  diminue la sécrétion lymphocytaire d'IL-12, cytokine pro-inflammatoire dont l'action délétère est suspectée dans la SEP, et augmente celle d'IL-10, inhibiteur dominant des réactions immunes. Au niveau du SNC, l'effet de l'IFN- $\beta$  est peu connu mais peut être envisagé suivant un scénario semblable. Nos premiers travaux dans ce domaine, qui découlent de l'observation d'une cascade cytokine-

MMP/TIMP dans l'astrocyte activé, indiquent que l'IFN- $\beta$ , en synergie avec les cytokines anti-inflammatoires, IL-4 et IL-10, réduit la sécrétion de MMP-9 et MMP-3 par l'astrocyte réactif. Ces observations suggèrent que l'effet bénéfique de l'IFN- $\beta$  s'exerce en partie au niveau central, par la réduction de l'expression astrocytaire de molécules appartenant à la cascade moléculaire inflammatoire dont nous avons démontré le rôle délétère.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aschner M., Sonnewald U., Tan K.H., Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol.*, 2002, 12, 475-481.
- Belin M.F., Didier-Bazes M., Akaoka H., Hardin-Pouzet H., Bernard A., Giraudon P., Changes in astrocytic glutamate catabolism enzymes following neuronal degeneration or viral infection. *Glia*, 1997, 21, 154-161.
- Borden P., Heller R.A., Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 1997, 7, 159-178.
- Buzanska L., Spassky N., Belin M.F., Giangrande A., Guillemot F., Klambt C., Labouesse M., Thomas J.L., Domanska-Janik K., Zalc B., Human medulloblastoma cell line Dev is a potent tool to screen for factors influencing differentiation of neural stem cells. *J. Neurosci. Res.*, 2001, 65, 17-23.
- Byrnes A.A., McArthur J.C., Karp C.L., Interferon-beta therapy for multiple sclerosis induces reciprocal changes in interleukin-12 and interleukin-10 production. *Ann. Neurol.*, 2002, 51, 165-174.
- Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C., A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolcarboyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 197, 40-45.
- Cuzner M.L., Gveric D., Strand C., Loughlin A.J., Paemen L., Opendakker G., Newcombe J., The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55, 1194-1204.
- Deitmer J.W., Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir. Physiol.*, 2001, 129, 71-81.
- Derrington E.A., Dufay N., Rudkin B.B., Belin M.F., Human primitive neuroectodermal tumour cells behave as multipotent neural precursors in response to FGF2. *Oncogene*, 1998, 17, 1663-1672.
- Dienel G.A., Hertz L., Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J. Neurosci. Res.*, 2001, 66, 824-838.
- Dong Y., Benveniste E.N., Immune function of astrocytes. *Glia*, 2001, 36, 180-190.
- English W.R., Puente X.S., Freije J.M., Knauper V., Amour A., Merryweather A., Lopez-Otin C., Murphy G., Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor- $\alpha$  convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 14046-14055.
- Galboiz Y., Shapiro S., Lahat N., Rawashdeh H., Miller A., Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon-beta therapy in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.*, 2001, 50, 443-451.
- Galko M.J., Tessier-Lavigne M., Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloproteinase activity [see comments]. *Science*, 2000, 289, 1365-1367.

- Gessain A., Barin F., Vernant J.C., Gout O., Maurs L., Calender A., de The G., Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 1985, 2, 407-410.
- Ghazanfari F.A., Stewart R.R., Characteristics of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture. *Brain Res.*, 2001, 890, 49-65.
- Giraudon P., Buart S., Bernard A., Belin M.F., Cytokines secreted by glial cells infected with HTLV-I modulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMPs) : possible involvement in neurodegenerative processes. *Mol. Psychiatry*, 1997, 2, 107-110, 184.
- Giraudon P., Buart S., Bernard A., Thomasset N., Belin M.F., Extracellular matrix-remodeling metalloproteinases and infection of the central nervous system with retrovirus human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Prog. Neurobiol.*, 1996, 49, 169-184.
- Giraudon P., Vernant J.C., Confavreux C., Belin M.F., Desgranges C., Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) in cerebrospinal fluid of HTLV-1 infected patients with tropical spastic paraparesis. *Neurology*, 1998, 50, 1920.
- Giraudon P., Szymocha R., Buart S., Bernard A., Cartier L., Belin M.F., Akaoka H., T lymphocytes activated by persistent viral infection differentially modify the expression of metalloproteinases and their endogenous inhibitors, TIMPs, in human astrocytes : relevance to HTLV-I-induced neurological disease. *J. Immunol.*, 2000, 164, 2718-2727.
- Goetzl E.J., Banda M.J., Leppert D., Matrix metalloproteinases in immunity. *J. Immunol.*, 1996, 156, 1-4.
- Grant C., Barmak K., Alefantis T., Yao J., Jacobson S., Wigdahl B., Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease : events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J. Cell. Physiol.*, 2002, 190, 133-159.
- Hickey W.F., Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*, 2001, 36, 118-124.
- Hollsberg P., Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999, 63, 308-333.
- Horner P.J., Gage F.H., Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, 2000, 407, 963-970.
- Khuth S.T., Akaoka H., Pagenstecher A., Verlaeten O., Belin M.F., Giraudon P., Bernard A., Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *J. Virol.*, 2001, 75, 8268-8282.
- Lassmann H., Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 2002, 104, 168-171.
- Lee Y., Shacter E., Fas aggregation does not correlate with Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.*, 2001, 167, 82-89.
- Lezin A., Buart S., Smadja D., Akaoka H., Bourdonne O., Perret-Liaudet A., Cesaire R., Belin M.F., Giraudon P., Tissue inhibitor of metalloproteinase 3, matrix metalloproteinase 9, and neopterin in the cerebrospinal fluid : preferential presence in HTLV type I-infected neurologic patients versus healthy virus carriers. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2000, 16, 965-972.
- Little A.R., O'Callaghan J.P., Astrogliosis in the adult and developing CNS : is there a role for proinflammatory cytokines? *Neurotoxicology*, 2001, 22, 607-618.
- Lucchinetti C., Bruck W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H., Heterogeneity of multiple sclerosis lesions : implications for the pathogenesis of demyelination [see comments]. *Ann. Neurol.*, 2000, 47, 707-717.
- Lukashev M.E., Werb Z., ECM signalling : orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell. Biol.*, 1998, 8, 437-441.
- Mitsiades N., Poulaki V., Leone A., Tsokos M., Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, 91, 1678-1684.
- Popovic M., Lange-Wantzin G., Sarin P.S., Mann D., Gallo R.C., Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 5402-5406.
- Rosenberg G.A., Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*, 2002, 39, 279-291.
- Sabelko-Downes K.A., Russell J.H., Cross A.H., Role of Fas-FasL interactions in the pathogenesis and regulation of autoimmune demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.*, 1999, 100, 42-52.
- Scaffidi C., Schmitz I., Kramer P.H., Peter M.E., The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 1541-1548.
- Schousboe A., Westergaard N., Sonnewald U., Petersen S.B., Yu A.C., Hertz L., Regulatory role of astrocytes for neuronal biosynthesis and homeostasis of glutamate and GABA. *Prog. Brain Res.*, 1992, 94, 199-211.
- Stuve O., Dooley N.P., Uhm J.H., Antel J.P., Francis G.S., Williams G., Yong V.W., Interferon  $\beta$ -1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro : effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann. Neurol.*, 1996, 40, 853-863.
- Szymocha R., Brisson C., Bernard A., Akaoka H., Belin M.F., Giraudon P., Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes : sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. *J. Neurovirol.*, 2000a, 6, 350-357.
- Szymocha R., Brisson C., Bernard A., Akaoka H., Belin M.F., Giraudon P., Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes : sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. *J. Neurovirol.*, 2000b, 6, 350-357.
- Szymocha R., Akaoka H., Dutuit M., Malcus C., Didier-Bazes M., Belin M.F., Giraudon P., Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Virol.*, 2000c, 74, 6433-6441.
- Umehara F., Abe M., Koreeda Y., Izumo S., Osame M., Axonal damage revealed by accumulation of beta-amyloid precursor protein in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.*, 2000, 176, 95-101.
- Umehara F., Izumo S., Ronquillo A.T., Matsumuro K., Sato E., Osame M., Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1994, 53, 72-77.
- Umehara F., Izumo S., Nakagawa M., Ronquillo A.T., Takahashi K., Matsumuro K., Sato E., Osame M., Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1993, 52, 424-430.
- Vallieres L., Campbell I.L., Gage F.H., Sawchenko P.E., Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J. Neurosci.*, 2002, 22, 486-492.
- Vu T.H., Werb Z., Matrix metalloproteinases : effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.*, 2000, 14, 2123-2133.
- Wolswijk G., Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain*, 2002, 125, 338-349.
- Yong V.W., Krekoski C.A., Forsyth P.A., Bell R., Edwards D.R., Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.*, 1998, 21, 75-80.