



HAL
open science

CIBLAGE ASTROCYTAIRE DE L'EXPRESSION DU GDNF PAR DES LENTIVECTEURS POUR UNE THERAPIE GENIQUE DE PROTECTION DE LA MALADIE DE PARKINSON

Hamid Mammeri

► **To cite this version:**

Hamid Mammeri. CIBLAGE ASTROCYTAIRE DE L'EXPRESSION DU GDNF PAR DES LENTIVECTEURS POUR UNE THERAPIE GENIQUE DE PROTECTION DE LA MALADIE DE PARKINSON. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT: . tel-00184121

HAL Id: tel-00184121

<https://theses.hal.science/tel-00184121>

Submitted on 30 Oct 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie
Paris VI

THESE DE DOCTORAT
SPECIALITE : NEUROPHARMACOLOGIE

Présentée par

Hamid MAMMERI

Pour obtenir le grade de docteur de l'université Paris VI

**CIBLAGE ASTROCYTAIRE DE L'EXPRESSION DU
GDNF PAR DES LENTIVECTEURS POUR UNE
THERAPIE GENIQUE DE PROTECTION DE LA
MALADIE DE PARKINSON**

Soutenue le 15 novembre 2006 devant le jury composé de :

François COURAUD

Christian GROSS

Marc LEVIVIER

Claudia MONTERO-MENEI

Marc SAVASTA

Jacques MALLET

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

SOMMAIRE

RESUME	1
LISTE DES ABREVIATIONS	2
LISTE DES FIGURES	3
AVANT PROPOS	4
LISTE DES PUBLICATIONS	6
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. LA MALADIE DE PARKINSON	8
I.1. Epidémiologie et caractéristiques cliniques.....	8
I.2. Caractéristiques anatomopathologiques.....	9
<i>I.2.1. Physiologie des ganglions de la base et de la voie nigrostriée en particulier.....</i>	<i>9</i>
a) les ganglions de la base	9
b) la voie nigrostriée.....	10
<i>I.2.2. Dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire.....</i>	<i>11</i>
<i>I.2.3. Les Corps de Lewy, la signature biochimique</i>	<i>12</i>
<i>I.2.4. Déplétion de la dopamine striatale</i>	<i>12</i>
<i>I.2.5 Autres altérations.....</i>	<i>13</i>
I.3. Etiologie	13
<i>I.3.1. Facteurs environnementaux</i>	<i>14</i>
<i>I.3.2. Contributions génétiques.....</i>	<i>14</i>
I.4. Pathogenèse	14
<i>I.4.1. Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondrial</i>	<i>15</i>
<i>I.4.2. Repliement anormal et agrégation des protéines</i>	<i>16</i>
a) L'agrégation de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson.....	16
b) Le système ubiquitine-protéasome.....	18
<i>I.4.3. Rôle de la DA dans la pathogénèse</i>	<i>19</i>
<i>I.4.5. Inflammation dans la maladie de Parkinson.....</i>	<i>19</i>
I.5. La phase pré-symptomatique de la maladie de Parkinson	19
<i>I.5.1. Mécanismes de compensation pré-symptomatique</i>	<i>19</i>
a) Maintien de l'homéostasie dopaminergique	20
b) Compensations indépendantes du maintien de l'homéostasie dopaminergique	21
<i>I.5.2. Dépistage précoce pré-symptomatique.....</i>	<i>21</i>
a) Tests basés sur les marqueurs biochimiques	22
b) dépistage par tests cognitifs	22
c) Dépistage par des techniques de neuroimagerie	23
I.6. Modèles animaux de la maladie de Parkinson	23
<i>I.6.1. Les premiers modèles</i>	<i>23</i>
<i>I.6.2. Lésions à la 6-hydroxydopamine.....</i>	<i>24</i>
<i>I.6.3. Intoxication au MPTP</i>	<i>25</i>
<i>I.6.4. Lésions induites par des pesticides.....</i>	<i>26</i>
a) Rotenone	26
b) Paraquat	27
<i>I.6.5. Modèles par surexpression de protéines.....</i>	<i>27</i>

I.7. Traitements de la maladie de Parkinson	28
<i>I.7.1 Traitements pharmacologiques</i>	<i>28</i>
a) L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) et associés	28
b) Anticholinergiques	29
c) Autres traitements pharmacologiques	30
<i>I.7.2. Traitements neurochirurgicaux</i>	<i>30</i>
<i>I.7.3. Greffes de tissus mésencéphaliques foetaux.....</i>	<i>31</i>
<i>I.7.4. traitements préventifs</i>	<i>31</i>
II. LE FACTEUR NEUROTROPHIQUE DÉRIVÉ DE LIGNÉE CELLULAIRE GLIALE.33	
II.1. Purification et caractérisation du GDNF	33
II.2. Effets biologiques et rôles du GDNF	34
<i>II.2.1. Effets sur le système dopaminergique</i>	<i>34</i>
<i>III.2.2. Effets sur les autres types de neurones</i>	<i>35</i>
<i>III.2.3. Rôle du GDNF au cours du développement.....</i>	<i>35</i>
II.3. Mécanismes d'action du GDNF	36
<i>II.3.1. Les récepteurs du GDNF.....</i>	<i>36</i>
<i>II.3.2. Voies de signalisation intracellulaire.....</i>	<i>37</i>
<i>II.3.3. Transport rétrograde et antérograde du GDNF</i>	<i>37</i>
III. UTILISATION DU GDNF EN THÉRAPIE EXPÉRIMENTALE DE LA MALADIE DE PARKINSON	39
III.1. Infusion intracérébrale de la protéine recombinante.....	39
<i>III.1.1. Etudes chez les animaux modèles</i>	<i>39</i>
a) Etudes chez le rat.....	39
b) Etude chez le primate non humain	41
<i>III.1.2. Etudes chez l'homme</i>	<i>41</i>
III.2. Transferts de gène thérapeutique.....	43
<i>III.2.1. Définition.....</i>	<i>43</i>
<i>Concernant la TG de neuroprotection utilisant le GDNF, les deux voies ont été étudiées. Dans les deux cas, il est indispensable de disposer de vecteurs efficaces, permettant une expression à long terme du GDNF, non immunogènes et dont l'utilisation est sûre chez l'homme.</i>	<i>44</i>
<i>III.2.2. Différents vecteurs utilisés pour le transfert de gène du GDNF</i>	<i>44</i>
a) vecteur dérivé de l'adénovirus	44
b) vecteur dérivé de l'adéno-associated virus	46
c) vecteur dérivé des lentivirus	47
<i>III.2.3. Greffes de cellules génétiquement modifiées pour exprimer le GDNF</i>	<i>50</i>
<i>III.2.4. Injection directe de vecteurs codant le GDNF.....</i>	<i>51</i>
IV. LES ASTROCYTES.....	54
IV.1. Description	54
IV.2. Fonctions des astrocytes.....	54
IV.3. Ciblage astrocytaire par les vecteurs viraux.....	55
<i>IV.3.1. Vecteurs à tropisme astrocytaire.....</i>	<i>55</i>
<i>IV.3.2. Restriction astrocytaire de l'expression du GDNF.....</i>	<i>55</i>
BUT DE L'ETUDE	57
I. Problème scientifique	58
II. Objectif du travail	58

RESULTATS	59
Article 1: pseudotypage des vecteurs dérivés du VIH-1 par l'enveloppe du virus de Mokola : réaction immunitaire et dépendance à l'espèce du tropisme	60
I. Contexte scientifique	60
II. Résultats	61
<i>II.1. Production et caractérisation des stocks de pseudotypes VSV et Mok.....</i>	<i>61</i>
<i>II.2. Transduction in vitro de cellules nerveuses.....</i>	<i>61</i>
<i>II.3. Le tropisme des vecteurs Mok dépend de l'espèce</i>	<i>61</i>
<i>II.4. Réactions immunitaires induites par les pseudotypes Mok.....</i>	<i>62</i>
III. Conclusions	64
Article 2 : La sécrétion locale de GDNF par les astrocytes striataux transduits par un vecteur lentiviral protège la voie nigrostriée sans formation de sprouting ectopique et délétère.....	96
I. Contexte scientifique	96
II. Résultats	98
<i>II.1. Vecteurs lentiviraux pseudotypés par Mokola codant le GDNF</i>	<i>98</i>
<i>II.2. thérapie génique.....</i>	<i>98</i>
a) protocole de thérapie génique	98
b) Distribution du GDNF au sein des ganglions de la base	99
c) Protection de la voie nigrostriée.....	99
d) Effet du GDNF sur le maintien de l'homéostasie de la DA.....	100
e) correction du comportement moteur.....	101
III. Conclusion	101
DISCUSSION GENERALE.....	115
I. Bilan du travail.....	116
<i>I.1. Pseudotypage des vecteurs lentiviraux par l'enveloppe Mokola</i>	<i>116</i>
<i>I.2. Injection intrastriatale de Mok-GDNF</i>	<i>118</i>
<i>I.3. Protection de la voie nigrostriée</i>	<i>121</i>
<i>I.4. Limites du protocole de thérapie génique.....</i>	<i>124</i>
II. Futur de la thérapie de protection par le GDNF de la MP	126
III. La thérapie génique pour exprimer le GDNF : quel avenir?	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	137

RESUME

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la mort progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN). Cette mort neuronale entraîne un déficit en dopamine (DA) dans le striatum, responsable de la survenue des symptômes.

Dans la perspective d'un traitement visant à protéger les neurones de la SN, de nombreuses études ont été centrées sur l'utilisation du glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF), facteur neurotrophique et neuroprotecteur des neurones dopaminergiques. Son efficacité thérapeutique a été démontrée par de nombreuses études dans des modèles animaux de la MP et lors d'essais cliniques.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux ont démontré l'efficacité de la thérapie génique (TG) comme méthode d'administration du GDNF et un effort particulier est entrepris pour optimiser cette approche. Cependant, malgré des résultats très encourageants obtenus dans les modèles murins et de primates de la MP, il s'est révélé que l'utilisation des vecteurs viraux se confrontait à une limite majeure. En effet, le ciblage préférentiellement neuronal de ces vecteurs entraîne la dispersion de la protéine dans la voie striatonigrale provoquant ainsi la formation massive de collatérales dans des zones non désirées.

Afin d'éviter la dispersion du GDNF, nous avons étudié la restriction de sa localisation au striatum en ciblant préférentiellement les astrocytes striataux *via* un vecteur lentiviral.

Une première partie du travail porte sur la caractérisation d'un vecteur pseudotypé par l'enveloppe Mokola. Chez la souris, l'enveloppe permet un ciblage spécifique des astrocytes quel que soit le promoteur utilisé, contrairement aux rat et primate, chez lesquels un ciblage préférentiellement astrocytaire est obtenu en combinaison avec le promoteur CMV.

Dans une seconde partie, le vecteur pseudotypé par Mokola a été utilisé pour étudier l'effet d'une expression restreinte de GDNF aux astrocytes striataux sur la protection de la voie nigrostriée. L'injection d'un vecteur permettant la synthèse de GDNF (Mok-GDNF) dans un modèle de rat de la MP permet une forte et stable synthèse de GDNF pendant au moins un an. Bien que le GDNF soit très majoritairement retrouvé au niveau du striatum et du globus pallidus, un très faible transport du GDNF dans les zones de projection est détecté. Cette dispersion résiduelle ne permet pas la génération de collatérales ectopiques. L'injection du vecteur Mok-GDNF permet une protection du système dopaminergique de la voie nigrostriée ainsi que le rétablissement d'un turn-over de la DA normal, traduit par une restauration complète du comportement moteur. Ces résultats indiquent que l'utilisation du vecteur pseudotypé par Mokola pour exprimer le GDNF se révèle optimale pour la TG de protection de la MP.

LISTE DES ABREVIATIONS

6-OHDA 6-hydroxydopamine	SN Substance noire
AA acide aminé	SNc substance noire <i>pars compacta</i>
AADC Aromatic acid decarboxylase	SNr substance noire <i>pars reticulata</i>
AAV Adeno-associated virus	TH tyrosine hydroxylase
Ad Adénovirus	UCH-L1 ubiquitin carboxy-terminal hydro- lase L1
ADN Acide désoxyribonucléique	VIH virus de l'immunodéficience humaine (ou HIV)
ARN Acide ribonucléique	VSV virus de la stomatite vésiculaire
BHE Barrière hémato encéphalique	WPRE woodchuck post-transcriptional regulatory element
DA Dopamine	
DOPAC 3,4-dihydroxyphenylacetic acid	
EIAV Virus de l'anémie infectieuse equine	
GDNF Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor	
GFAP Glial fibrillary associated protein	
GP Globus pallidus	
HVA homovanillic acid	
ICV Intracérébroventriculaire	
L-dopa L-dihydroxyphenylalanine	
Mok Mokola	
MP Maladie de Parkinson	
MPTP 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra- hydropyridine	
MPTP 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahy- dropyridine	
MLV murine leukaemia virus	
MFB faisceau médian du télencéphale	
NEP Noyau endopédonculaire	
pCMV promoteur du cytomegalovirus	
pPGK promoteur de la phosphoglycerate kinase	
RCA replication competent adenovirus	
SNC système nerveux central	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : biographie succincte de James Parkinson.

Figure 2 : biographie succincte de Jean Marie Charcot.

Figure 3 : dessin illustrant l'allure caractéristique des patients parkinsoniens.

Figure 4 : représentation schématique des ganglions de la base.

Figure 5 : organisation générale des circuits moteurs des ganglions de la base dans le cas normal et dans le cas de la MP.

Figure 6 : coupes de cerveau illustrant la perte des neurones de la substance noire dans la MP.

Figure 7 : photo d'un corps de Lewy

Figure 8 : biosynthèse et dégradation de la DA.

Figure 9 : propriétés des différents récepteurs de la DA.

Figure 10 : intersections de voies causant probablement la MP.

Figure 11 : structure des principales protéines dont les mutations entraînent la MP.

Figure 12 : l'agrégation de l' α -synucléine.

Figure 13 : le système ubiquitine-protéasome

Figure 14 : relations hypothétiques entre les mécanismes de compensation et la perte neuronale dans la SN

Figure 15 : tableau récapitulatif des principaux modèles de la MP et de leurs caractéristiques.

Figure 16 : structure et mécanisme de toxicité de la 6-OHDA

Figure 17 : structure du MPTP et de ses catabolites et mécanisme de toxicité

Figure 18 : les membres de la famille du GDNF et leurs récepteurs

Figure 19 : matériels utilisés pour l'injection intraparenchymale de GDNF chez l'homme

Figure 20 : les deux approches de la TG et les cibles visées pour le traitement de la MP

Figure 21 : les vecteurs Ad gutless

Figure 22 : les vecteurs AAV

Figure 23 : représentation schématique de la structure du VIH-1

Figure 24 : cycle d'infection des rétrovirus

Figure 25 : Fonction et importance dans le vecteur lentiviral des différents composants proviraux

Figure 26 : système de production des vecteurs lentiviraux

AVANT PROPOS

Depuis une quinzaine d'années, un effort de recherche publique et privée considérable a permis l'émergence du transfert de gène thérapeutique, thérapie expérimentale prometteuse et aux multiples applications. Loin de faire l'unanimité, soulevant maintes polémiques et questions éthiques, scientifiques et sociétales, il n'en reste pas moins qu'une attention particulière est portée à cette approche, grâce à laquelle les espoirs de traitement de maladies incurables sont immenses. Plusieurs axes de travail sont empruntés par les chercheurs et ingénieurs : le développement et l'optimisation de vecteurs viraux et cellulaires sûrs et efficaces, la mise au point de vecteurs permettant de cibler spécifiquement une population cellulaire et l'application au traitement de maladies. Au-delà de l'aspect thérapeutique, le développement de vecteurs de transfert de gène efficaces permet de disposer d'outils formidables pour des études fondamentales.

Le LGN, laboratoire dirigé par Jacques Mallet, est l'un des pionniers dans la mise au point de cette approche, de par son implication dans le développement de vecteurs viraux et cellulaires et l'évaluation de leur potentiel thérapeutique dans des modèles animaux. Le gène de la tyrosine hydroxylase, cloné en 1982 sous sa responsabilité, et les longues études sur ce gène qui ont suivi ont prédisposé l'attention portée sur le traitement de la maladie de Parkinson par les chercheurs du LGN. Lorsque je suis arrivé en 2000, le laboratoire venait d'apporter la première preuve pré-clinique du bien fondé de l'approche de transfert du gène du GDNF pour le traitement de la maladie de Parkinson. Le transfert était réalisé par le vecteur dérivé de l'adénovirus, mis au point par le LGN en 1993. Mais, à cette époque, le nouveau vecteur lentiviral avait attiré l'attention et les faveurs des chercheurs du LGN.

Les nombreuses preuves de principes apportées ont validé l'approche de thérapie génique expérimentale. Néanmoins, un travail de fond reste à effectuer pour évaluer en détail quels sont les effets bénéfiques et délétères apportés par cette thérapie. Le travail qui m'a été confié porte ainsi sur l'évaluation de la restriction de l'expression du GDNF aux astrocytes striataux pour éviter la dispersion du facteur thérapeutique dans le cerveau de l'individu traité. Deux axes sont donc empruntés: le développement et la caractérisation d'un vecteur lentiviral permettant le ciblage de l'expression aux astrocytes et l'évaluation de cette approche chez un rat modèle de la maladie de Parkinson.

Ce manuscrit est le compte rendu de ces expériences. Dans l'introduction, je me suis attaché à décrire les trois éléments qui ont été l'ossature de ma thèse: la maladie de

Parkinson, le GDNF et la thérapie génique de la maladie de Parkinson par le GDNF. Une courte présentation des cellules astrocytaires y est intégrée. Au-delà du caractère évident pris par cette description, elle est aussi mon clin d'oeil et mon infime contribution à la réhabilitation de ces cellules fascinantes, qui font l'objet d'une attention de plus en plus grandissante, non seulement en thérapie génique, mais aussi et surtout en recherche fondamentale.

LISTE DES PUBLICATIONS

Pseudotyping of HIV-1 based vectors with the Mokola virus envelope: immune reaction and species dependent tropism.

Brizard M¹, He Y¹, **Mammeri H**¹, Jan C, Bemelhans A, Serguera C, Dufour N, Colin P, Perrin P, Tordo N, Charneau P, Tuffereau C, Hantraye P, Deglon N., Mallet J and Sarkis C.

En preparation

¹ ces auteurs ont contribué équitablement au travail.

Local secretion of GDNF by lentivirally transduced striatal astrocytes protects nigrostriatal pathway without generation of deleterious ectopic sprouting.

Mammeri H, Hanoun N, Hamon M, Sarkis C and Mallet J.

En preparation

Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo*.

Philippe S, Sarkis C, Barkats M, **Mammeri H**, Ladroue C, Petit C, Mallet J and Serguera C.

PNAS. Sous presse.

Lentiviral vectors mediate « rapalogue »-induced production of secreted therapeutic factor in the brain: regulation of level of transcription and exocytosis.

Vogel R, **Mammeri H** and Mallet J.

Soumis à Molecular therapy.

Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats.

M Pertusa¹, S García-Matas¹, **H Mammeri**¹, A Adell, T Rodrigo, J Mallet, R Cristòfol, C Sarkis and C Sanfeliu.

Soumis à neurobiology of aging

¹ ces auteurs ont contribué équitablement au travail

Dorsal raphe nucleus 5-HT_{1A} autoreceptors hypersensitization induced by chronic voluntary alcohol intake in C57BL/6J mice

Kelai S, Renoir T, Chouchana L, **Mammeri H**, Etienne V, Melfort M, Saurini F Hanoun N, Hamon M, and Lanfumey L

En préparation

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA MALADIE DE PARKINSON

« Tremblement involontaire, en certaines parties du corps, avec diminution de la force musculaire ; tremblements n'ayant pas lieu durant le mouvement, mais se produisent alors même que ces parties sont appuyées. Tendance à plier le tronc en avant et à passer de la marche à la course. Intégrité des sens et de l'intelligence. »¹ James Parkinson, 1817.

C'est en ces termes que James Parkinson (figure 1) décrit dans son Essai sur la paralysie tremblante de 1817 la maladie qui portera son nom, la maladie de Parkinson (MP). Cette analyse remarquable des symptômes et de l'évolution de la maladie chez six patients sera complétée en 1862 par le travail de Jean Martin Charcot (figure 2), qui ajoutera la rigidité musculaire au tableau clinique. Il a fallu attendre ensuite près d'un siècle pour que les connaissances sur la maladie vivent une accélération phénoménale avec la découverte en 1958 par Arvid Carlsson, prix Nobel de médecine en 2000, de la dopamine permettant la mise en évidence de son déficit dans le striatum des patients parkinsoniens (Barbeau, 1960; Ehringer et al., 1960).

Mais, près de 200 ans après la première description clinique de la MP, les causes de la maladie nous échappent toujours, bien que nos connaissances se soient grandement étoffées, et la mise au point d'un traitement curatif ou préventif n'a toujours pas abouti. La population mondiale connaissant un vieillissement prononcé, la MP pose donc un problème majeur de santé publique de plus en plus inquiétant.

I.1. Epidémiologie et caractéristiques cliniques

La MP est une maladie progressive dont l'âge moyen d'apparition est de 55 ans et dont l'incidence augmente avec l'âge, de 0,2% à 1,2% à 70 ans. Il s'agit de la seconde maladie la plus fréquente liée à l'âge, après la maladie d'Alzheimer. Dans 95% des cas, il n'y a pas de liaison génétique (on parle de cas sporadiques) alors que les 5% restants correspondent à des formes familiales de la maladie, pour lesquelles la survenue des symptômes est plus précoce.

Sur le plan clinique, le syndrome parkinsonien est classiquement caractérisé par :

¹ James Parkinson *essai sur la paralysie tremblante*, traduction et annotation par Souques et Alajouanine, édition Masson, 1923.

- La difficulté à initier (akinésie) ou effectuer (bradykinésie) des mouvements. L'akinésie est le symptôme le plus invalidant. Les patients ont d'importantes difficultés à initier un mouvement, qui devient rare et lent, et se fatiguent rapidement. Cela se traduit en particulier par une posture caractéristique : la démarche est lente et piétinante, les bras se balancent peu voire plus et le buste est penché en avant (figure 3). Les patients ont peu d'expressions faciales et parlent d'une voix monotone et lente. Le malade est capable de ressentir des émotions mais est constamment frustré par l'incapacité à les exprimer de façon fidèle.

- Une rigidité musculaire (hypertonie), entraînant une résistance soit constante à la réalisation du mouvement soit de type « roue dentelée », oscillant régulièrement avec le mouvement. L'hypertonie est très inconfortable en ce qu'elle rend le repos ou la relaxation difficile.

- Des tremblements de repos d'une fréquence de 4 à 6 cycles par seconde. Les tremblements disparaissent au repos ou lors de l'exécution d'une tâche alors qu'ils sont souvent accentués lors de stress émotionnels.

En plus de cette triade de symptômes moteurs caractéristiques (Barbeau, 1986), les patients peuvent souffrir de troubles psychologiques tels que dépressions plus ou moins profondes (Gotham et al., 1986) ou de troubles cognitifs comme des déficits spaciovisuels ou des démences (Brown and Marsden, 1988). Ces symptômes ont été omis dans les descriptions cliniques de Parkinson et Charcot.

I.2. Caractéristiques anatomopathologiques

Depuis James Parkinson, de nombreux anatomopathologistes ont apporté leur contribution à la caractérisation de la MP, démontrant ainsi que cette maladie est due principalement à une atteinte de la voie nigrostriée dopaminergique reliant la substance noire (SN) et le striatum.

I.2.1. Physiologie des ganglions de la base et de la voie nigrostriée en particulier

a) les ganglions de la base

Les ganglions de la base (figure 4) sont composés du striatum, du globus pallidus (GP), de la substance noire (SN) et du noyau subthalamique (NST) (Parent and Hazrati, 1995b,

1995a). Chez le primate, le striatum est composé de deux parties distinctes, le noyau caudé et le putamen alors que chez le rongeur, les deux parties sont réunies en une structure que l'on nomme néostriatum ou striatum. De même, chez le primate, le GP est composé de deux parties, une partie externe (GPe) et une partie interne (GPi). Chez le rongeur, le GP correspond au GPe chez le primate et le noyau endopédonculaire (NEP) correspond au GPi chez le primate. Enfin, la SN est composée de deux parties : une partie dite *compacta* ou compacte (SNc) contenant majoritairement des somas de neurones et la partie dite *reticulata* ou réticulaire (SNr), dans laquelle sont retrouvées essentiellement des fibres.

Les ganglions de la base sont impliqués dans le contrôle de la motricité, des processus cognitifs, et la régulation de l'humeur. Le circuit des ganglions de la base forme une boucle dont le point de départ et le point d'arrivée sont le cortex cérébral (figure 5). Au sein de cette boucle, le striatum reçoit toutes les afférences glutamatergiques corticales. La boucle se divise ensuite en deux voies GABAergiques. Une première voie « directe » relie le striatum au GP/GPe, au NEP/GPi et à la SNr. Une seconde voie dite « indirecte », relie le striatum à la SNr en passant par deux relais, le GP/GPe et le NST. La SNr et le NEP/GPi sont les structures de sortie des ganglions de la base : l'information est renvoyée vers le cortex, via le thalamus, ce qui permet de fermer la boucle. En plus de ces voies, il existe des voies de rétrocontrôle, dont la principale est la voie dopaminergique nigrostriée.

b) la voie nigrostriée

La mise au point des méthodes d'immunohistofluorescence par Falck et ses collaborateurs (Falck and Torp, 1962) a permis à Dahlström et Fuxe de décrire la voie nigrostriée (Dahlstrom and Fuxe, 1964), reliant la SN au striatum.

La SN est un petit groupe de neurones exprimant fortement la mélanine chez l'homme (ce qui donne la couleur noire à ce noyau) et situé dans le mésencéphale (figure 6). Ces neurones synthétisent spécifiquement la DA (figure 8), neurotransmetteur libéré au niveau des zones de projection de la SN. Les corps cellulaires et les fibres de ces neurones sont donc marqués par un anticorps dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme limitante dans la voie de la biosynthèse de la DA.

Les axones des cellules dopaminergiques présents dans la SNc rejoignent le faisceau médian du télencéphale (MFB) pour innover le striatum, participant ainsi à 60% de l'innervation striatale. Ces axones fins (0,2-0,5 μm), non myélinisés, présentent de nombreuses varicosités et innervent le striatum selon une somatotopie relativement précise : les groupes de neurones situés dans la partie la plus médiane de la SNc projettent vers les

parties médianes et dorsales du striatum, tandis que les neurones localisés plus latéralement dans la SNc projettent dans les parties latérales et ventrales du striatum {Veening et al, 1980}. La DA va agir sur plusieurs types de neurones au sein du striatum :

- les neurones de projections, représentant 90 à 95% des neurones du striatum. En raison de la taille moyenne de leur soma (12 à 20 μm de diamètre) et de l'arborisation dendritique présentant de nombreuses épines, ces neurones ont été baptisés neurones épineux de taille moyenne.

- les interneurons dont les terminaisons nerveuses sont situées dans le striatum. Ils représentent environ 5% des neurones striataux. Deux types d'interneurones ont été caractérisés : les interneurons non épineux de grande taille exprimant l'acétylcholine et les interneurons non épineux de taille moyenne co-exprimant le GABA ainsi que des neuropeptides.

La DA se fixe sur les deux types de récepteurs essentiellement présents dans le striatum, les récepteurs D1 couplés positivement à l'adénylate cyclase et les récepteurs D2 couplés négativement à l'adénylate cyclase (figure 9). L'expression de chacun des récepteurs par les neurones striataux va spécifier une voie de sortie précise du striatum. Ainsi, les récepteurs D1 sont exprimés par les neurones épineux de taille moyenne de la voie directe, alors que les récepteurs D2 sont exprimés par les neurones épineux de taille moyenne de la voie indirecte (figure 5). Ces deux types de neurones synthétisent le GABA et co-expriment respectivement la substance P/ dynorphine et l'enképhaline. Par ailleurs, il semble que les neurones dopaminergiques de la SN agissent aussi sur les interneurons cholinergiques striataux en se fixant sur des récepteurs D1 et/ou D2 (Wang et al., 2006).

1.2.2. Dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire

« Le *locus niger* pourrait bien être le substratum anatomique [de la MP] »¹ concluait en 1895 Edouard Brissaud, après l'étude d'un cas de syndrome parkinsonien causé par un tuberculoma de la SN. Cette première évocation de l'atteinte de la SN dans la MP fut par la suite avérée par la thèse de Constantin Tretiakoff en 1919, portant sur l'étude de neuf cerveaux de patients parkinsoniens. Tretiakoff nota en effet une diminution du nombre de cellules pigmentées dans la SN qu'il lia à l'étiologie des troubles de tonus musculaire et de la MP (figure 6).

La perte neuronale de la SN, progressive et sélective, débute par la partie caudale et ventrolatérale et s'étend progressivement vers les régions rostrale, médiale et dorsale du

¹ Edouard Brissaud, *Leçons sur les maladies nerveuses*, recueillies et publiées par Henry Meige. (Salpêtrière, 1893-94)

mésencéphale (Hirsch et al., 1988). Cette topologie est différente de celle observée dans le cas de perte normale liée à l'âge (Fearnley and Lees, 1991).

Par ailleurs, la perte des terminaisons DA au niveau du striatum semble être plus prononcée que la perte des neurones de la SNc, suggérant que les terminaisons nerveuses striatales seraient la cible première du processus de dégénération. La mort neuronale dans la MP serait ainsi due à un processus rétrograde (Bernheimer et al., 1973).

1.2.3. Les Corps de Lewy, la signature biochimique

Tretiakoff nota également la présence de corps intra cytoplasmiques dans des neurones de la SN et réalisa qu'ils étaient similaires aux inclusions décrites par Lewy dans le noyau dorsal moteur du nerf vague et la *substantia innominata* de malades parkinsoniens (Lewy, 1912). Ces inclusions cytoplasmiques et éosinophiles, nommées corps de Lewy (CL), sont formées d'un noyau dense acidophile entouré d'un halo clair (figure 7). Elles apparaissent dans les neurones affectés mais aussi dans d'autres régions du système nerveux central chez les sujets atteints de la MP, notamment le *locus coeruleus*, le noyau paranigral et le cortex cérébral (Forno et al., 1986a).

Les corps de Lewy sont une marque caractéristique de la MP, bien qu'on les observe chez 5 à 10% des sujets normaux de plus de 60 ans et dans quelques autres affections neurodégénératives tels que la maladie d'Alzheimer et en général dans les démences à CL (Forno, 1986; Jellinger, 1987). Ils sont composés majoritairement de la protéine α -synucléine (Spillantini et al., 1997), à laquelle s'ajoute la parkine (Shimura et al., 1999) et l'ubiquitine (Kuzuhara et al., 1988). Ils renferment également des accumulations de neurofilaments, le peptide précurseur de l'A β , des enzymes, des protéines du complément, du cytosquelette et du stress cellulaire, des vésicules synaptiques ainsi que des acides gras et des polysaccharides (pour une revue, lire (Shults, 2006).

La question de la contribution des corps de Lewy dans la pathologie n'est toujours pas tranchée et la polémique sur leur rôle délétère ou protecteur agite toujours la communauté scientifique.

1.2.4. Déplétion de la dopamine striatale

Les travaux de Carlsson et ses collaborateurs montrant que (1) l'hypokinésie ou l'immobilité obtenue chez les souris traitées à la réserpine pouvaient être inversées par le traitement avec la L-dopa (Carlsson et al., 1957) et (2) que la réserpine diminuait les taux striataux de DA (Carlsson et al., 1958) poussèrent Ehringer et Hornykiewicz à réaliser un dosage *post mortem* des taux de DA dans les cerveaux de patients parkinsoniens

akinétiques. Ces chercheurs ont ainsi montré une sévère déplétion en DA dans le striatum (Ehringer and Hornykiewicz, 1960) ce qui par ailleurs ouvra la voie pour le premier essai clinique avec le précurseur de la DA chez des patients atteints de la MP (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961). Quelques années plus tard, en 1964, Andén montra que la DA était contenue dans les terminaisons striatales des neurones de la SN (Andén et al., 1964a). Le lien entre la mort des neurones du *locus niger* et la déplétion striatale en DA était établi.

Dans les cas avancés de la maladie, la déplétion peut atteindre 95% dans le putamen et de 50 à 85% dans le noyau caudé. De plus, une diminution du taux de DA est observée dans le système limbique et dans le cortex frontal, mais à un moindre degrés (pour une revue, Agid et al., 1997). Concernant les métabolites de la DA (figure 8), il semble que les taux d'acide homovanilline (HVA) ne soient pas diminués aussi drastiquement que ceux de la DA, suggérant une augmentation du turn-over dans les neurones restants chez les patients parkinsonien (Bernheimer et al., 1973; Agid et al., 1987). Les conséquences du déficit de la DA striatale sont indiquées dans la figure 5.

1.2.5 Autres altérations

A la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN s'ajoutent une perte neuronale au niveau du *locus coeruleus* et du noyau du raphé, aboutissant à une chute des taux de noradrénaline et de sérotonine dans leurs cibles du télencéphale. De plus, certains neuropeptides voient leur niveau diminuer (Scatton et al., 1983; Agid and Blin, 1987), phénomène possiblement consécutif à la déplétion en DA. Par ailleurs, une perte de neurones cholinergiques est également constatée, pouvant être très marquée chez les patients atteints d'une détérioration intellectuelle (Agid et al., 1987). Cette dégénérescence particulière serait responsable des démences observées chez certains patients (Agid et al., 1987). Néanmoins, au vu de l'effet très marqué sur la récupération motrice de patients traités avec des molécules liées à la DA, il semble que la dégénérescence de la voie nigrostriée soit la source la plus importante des troubles moteurs.

1.3. Etiologie

Malgré des décennies de recherches centrées sur les « causes éloignées » de la MP, celles ci ne sont toujours pas connues. Cependant, de nombreuses études ont permis d'apporter des preuves de l'implication de certains facteurs environnementaux et des contributions génétiques à la survenue de la MP.

I.3.1. Facteurs environnementaux

De nombreuses études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence l'implication de certains facteurs dans l'augmentation du risque de développer la MP. Ceux ci comprennent en particulier les pesticides, les herbicides, les produits chimiques liés à l'industrialisation et le fait de vivre dans un environnement rural (Tanner and Langston, 1990). Par ailleurs, un certain nombre d'agents toxiques, incluant des traces de métaux, le cyanide, les solvants organiques, le monoxyde de carbone et le disulfide de carbone, ont été associés au développement de syndrome parkinsonien, mais différent de la MP typique. Aucune toxine spécifique n'a été retrouvée dans des cerveaux de malades.

La preuve la plus tangible de l'implication de facteurs environnementaux dans l'étiologie de la MP est venue de la découverte que le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) pouvait entraîner un syndrome parkinsonien chez l'homme (Langston et al., 1983). La découverte du MPTP s'est produite par accident, en 1979, après que des toxicomanes s'étant injecté un dérivé synthétique de la mépéridine eurent développé en quelques jours un syndrome ressemblant fortement à la MP, autant du point de vue clinique que pathologique (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983; Langston et al., 1984b) (Voir modèle animaux). Cependant, aucun facteur proche du MPTP n'a été identifié à ce jour chez les patients atteints de la MP.

I.3.2. Contributions génétiques

Bien que touchant peu de patients, la découverte de formes génétiques de la MP ouvre des champs de recherche nouveaux et excitants. A ce jour, au moins onze loci (PARK 1 à 11) responsables de formes monogéniques ont été identifiés et cinq gènes clairement associés à la MP (voir table) : α -synucléine (PARK 1 et 4), la parkine (PARK 2), l'ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1, PARK 5), PINK 1 (PARK 6) et DJ-1 (PARK 7).

I.4. Pathogenèse

Quel que soit la « cause éloignée » induisant initialement la neurodégénérescence, l'analyse des modèles animaux et des fonctions des gènes impliqués dans les formes familiales de la maladie mettent en évidence deux « causes proches » probables concernant la pathogenèse de la MP. Une première hypothèse propose un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydatif consécutif alors qu'une seconde met l'accent sur le

repliement anormal et l'agrégation de protéines comme cause de la mort des neurones de la SN. Ces deux voies hypothétiques ne sont pas exclusives et de nombreuses interactions ont été mises en évidence entre l'une et l'autre (Farrer, 2006).

1.4.1. Stress oxydatif et dysfonctionnement mitochondrial

Cette hypothèse, la plus ancienne, est basée sur le fait que le MPTP, le paraquat et la roténone, trois inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, étaient capables de reproduire un syndrome parkinsonien avec une perte sélective des neurones dopaminergiques *in vitro* et dans les modèles animaux (Forno et al., 1986b; Seniuk et al., 1990; Lang and Lozano, 1998; Manning-Bog et al., 2002). Ces premiers modèles ne reproduisaient pas fidèlement les caractéristiques moléculaires, principalement en raison de l'absence de CL. Récemment, l'infusion chronique de roténone chez le rat (Betarbet et al., 2000), et de MPTP chez la souris (Fornai et al., 2005) ont permis l'obtention d'agrégats d' α -synucléine, confortant la théorie initiale selon laquelle la MP sporadique serait causée par des facteurs environnementaux agissant *via* l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'inhibition du complexe I a deux conséquences principales: (1) la déplétion en ATP et l'atteinte consécutive de tous les processus cellulaires dépendants de l'ATP, et (2) la génération de radicaux libres. Il existe des preuves claires de la présence de stress oxydatif dans le cerveau de parkinsonien, en particulier la présence de protéines nitrées et de marqueurs de peroxydation lipidique, la réduction des taux de glutathion et de glutathion oxydé et la chute de 30% de l'activité du complexe I dans le cerveau et différents tissus de malades (Parker et al., 1989; Schapira et al., 1990; Sian et al., 1994).

Le stress oxydatif est présent dans différentes affections neurodégénératives et il convient alors de se demander si ce mécanisme est une cause ou une résultante de la dégénérescence neuronale. Des preuves de la primauté du stress oxydatif ont été apportées par l'étude des formes familiales de la MP, en particulier après l'identification de mutations dans le gène *DJ-1* (figure 11) (Matsumine et al., 1997; Kitada et al., 1998; Bonifati et al., 2003; Bonifati et al., 2004). Ces mutations sont relativement commune dans les formes familiales de la MP (Lucking et al., 2000) mais ont été aussi retrouvées dans des cas de MP sporadiques à déclaration tardive (Lucking et al., 1998). Les taux de DJ-1 augmentent drastiquement dans les cerveaux de patients atteints de forme sporadique de la MP (Moore et al., 2005).

La fonction exacte de DJ-1 demeure obscure même si sa surexpression permet de protéger les cellules contre une inhibition du complexe I mitochondrial ou un stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène. Cette propriété est abrogée avec les mutations de DJ-1

ou l'inhibition de son expression par ARN interference (Canet-Aviles et al., 2004; Taira et al., 2004). DJ-1 pourrait agir directement comme antioxydant, de par sa capacité à être oxydé en son résidu cystéine 106 (Mitsumoto and Nakagawa, 2001; Canet-Aviles et al., 2004) ou jouerait le rôle de senseur de stress oxydatif.

D'autre part, DJ-1 semble conférer une protection contre un stress du réticulum endoplasmique, une inhibition du protéasome et la toxicité induite par Pael-R (Yokota et al., 2003). Ces données indiquent que DJ-1 pourrait être un composant du système ubiquitine-protéasome (UPS) et/ou fonctionnerait comme une molécule chaperon ou une protéase.

En 2004, l'identification de mutations non sens et des troncations dans le gène *PINK1* (figure 11) ont été montrée comme entraînant une MP de type autosomale récessive (Valente et al., 2004b). La protéine PINK1 possède un domaine kinase hautement conservé et une séquence de ciblage mitochondrial et est localisée au niveau de la mitochondrie (Beilina et al., 2005). La mutation G309D, identifiée dans une famille espagnole atteinte de la MP, est localisée au niveau du site kinase de PINK1. Ainsi, la perte d'activité kinase de PINK1 pourrait affecter les fonctions mitochondriales. Ainsi, il a été supposé que PINK1 phosphorylerait des protéines mitochondriale en réponse à certains stress pour empêcher un dysfonctionnement mitochondrial (Valente et al., 2004a). Ces données, qui restent à confirmer, relient pour la première fois de façon évidente un dysfonctionnement mitochondrial primordial à la pathogénèse de la MP.

1.4.2. Repliement anormal et agrégation des protéines

La plupart des maladies neurodégénératives partage un processus pathogénique particulier: l'accumulation et la dégradation anormales des protéines mutantes ou tronquées (Ross and Poirier, 2004). On distingue deux étapes : (1) l'agrégation des protéines et (2) la réponse cellulaire aux protéines anormales.

a) L'agrégation de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson

Les études génétiques de la MP commencèrent avec la découverte d'une mutation non-sens pathologique touchant le gène *SNCA* codant l' α -synucléine (figure 11) (Polymeropoulos et al., 1997). Cette mutation touche le codon 53 et entraîne la substitution d'une alanine en thréonine (A53T) (Polymeropoulos et al., 1997; Papadimitriou et al., 1999). D'autres mutations ponctuelles ont été retrouvées par la suite : substitution d'une alanine au codon 30 par une proline (A30P) (Kruger et al., 1998) et d'un acide glutamique du codon 46 par une lysine (E46K) (Zarranz et al., 2004). De plus, une triplication du locus de l' α -synucléine a été retrouvé dans certaines familles (Singleton et al., 2003). Enfin, une association a été suggéré

entre la variabilité génétique dans le promoteur de l' α -synucléine et les cas de MP sporadiques, impliquant ainsi que la variabilité des niveaux de la protéine serait un facteur de prédisposition à la MP (Pals et al., 2004).

L' α -synucléine est une protéine de 140 AA, exprimée dans tout le cerveau de mammifère et plus particulièrement au niveau des terminaisons synaptiques où elle s'associe avec les membranes et les structures vésiculaires (Irizarry et al., 1996; Kahle et al., 2000). C'est une protéine non repliée dans sa forme native et possédant une plasticité conformationnelle prononcée. En fonction de son environnement, elle peut en effet rester sans conformation, former des monomères et des oligomères ou former des filaments de type amyloïdes (figure 12).

A ce jour, on ne connaît pas le(s) rôle(s) physiologique(s) précis de la protéine. Mais, il semble qu'elle joue un rôle important dans la régulation de la taille des vésicules synaptiques et leur recyclage. Plus particulièrement, un grand nombre de données a permis d'établir que l' α -synucléine régule la synthèse de la dopamine, son stockage dans les vésicules synaptiques, sa libération dans la synapse et sa re-capture (Sidhu et al., 2004c; Sidhu et al., 2004a, 2004b).

Dans sa forme native, l' α -synucléine est une protéine soluble, non repliée et qui possède une forte propension à l'auto-agrégation, de part la présence d'une région hydrophobe centrale (figure 11). Ainsi, elle forme initialement une structure annulaire, nommée oligomère ou protofibrille, et forme ensuite des polymères insolubles ou fibrilles (Giasson et al., 2001) (figure 12). Ces fibrilles insolubles sont les constituants majeurs des CL. Cependant, la toxicité de chacune des formes soluble ou insoluble n'est pas encore clairement établie et il persiste un doute quant à l'espèce la plus toxique.

Les mécanismes par lesquels l' α -synucléine sauvage s'agrège dans la MP sporadique sont peu connus. Plusieurs facteurs peuvent néanmoins provoquer son agrégation ou sa fibrillation:

- (1) les mutations de l' α -synucléine, favorisant la formation d'espèces oligomériques et pas d'espèces fibrillaires (Conway et al., 2000a; Conway et al., 2000c; Conway et al., 2000b).
- (2) les modifications covalentes post-traductionnelles telles que les nitrations, les phosphorylations et les glycosylations (Giasson and Lee, 2000).
- (3) L'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, consécutif de l'injection de roténone ou le paraquat (Betarbet et al., 2000; Giasson and Lee, 2000; Manning-Bog et al., 2002), ou d'un stress oxydatif ou nitrosatif (Ischiropoulos and Beckman, 2003).
- (4) L'augmentation des taux de la protéine et sa stabilisation avec l'âge dans la SN humaine (Li et al., 2004).

- (5) L'inhibition du protéasome, favorisant aussi *in vitro* et *in vivo* la fibrillation de l' α -synucléine et la formation d'inclusions solubles (McNaught et al., 2004; Rideout et al., 2004).
- (6) L'interaction avec des cofacteurs endogènes, tels que la protéine tau (Giasson and Lee, 2003) ou β -amyloïde (Masliah et al., 2001). L'interaction entre l' α -synucléine et ces protéines amyloïdogéniques pourrait être un mécanisme fondamental impliqué dans la formation d'inclusions fibrillaires toxiques dans les maladies neurodégénératives chez l'homme.

b) Le système ubiquitine-protéasome

La première preuve de l'implication du système ubiquitine-protéasome (figure 13) dans la neurodégénérescence a émergé après la découverte de mutations touchant le gène de la parkine. Il existe un large panel de mutations touchant la parkine (figure 11), associées à une perte significative des neurones de la SN et du *locus coeruleus*. L'étude *post-mortem* des cerveaux de patients homozygotes pour la protéine mutée révèle une absence de CL. Au contraire, des CL sont retrouvés chez des patients hétérozygotes (Mata et al., 2004). Ces données montrent que la parkine est impliquée dans la formation des CL et que la dégénérescence des neurones de la SN peut avoir lieu sans formation d'inclusions.

La parkine est une E3 ubiquitin ligase possédant deux domaines RING (really interesting new gene) séparés par un domaine IBR (in-between ring). Les E3 ligases catalysent la fixation de chaînes d'ubiquitine sur des protéines afin de signaler et entraîner leur dégradation par le protéasome. Plusieurs substrats hypothétiques de la parkine ont été mis en évidence : la synphilin-1, l' α -synucléine glycosylée, Paer-R, CHIP, cdc-Rel1A, la synaptotagmine (Cookson et al., 2005). La perte de fonction de la parkine pourrait entraîner l'accumulation de ces substrats entraînant la mort neuronale. Par exemple, la surexpression de Pael-R entraîne la dégénérescence des cellules dopaminergiques *in vitro*, phénomène pouvant être inversé par la surexpression de la parkine (Yang et al., 2003).

Une autre preuve de l'implication de l'UPS provient de l'identification de *UCH-L1*, dont les mutations sont responsables d'une forme autosomale dominante de la MP (Leroy et al., 1998). *UCH-L1* est retrouvée en abondance dans le cerveau (Wilkinson et al., 1999) et dans les CL de patients parkinsoniens (Lowe et al., 1989). *UCH-L1* est une ubiquitine hydrolase impliquée dans le recyclage des chaînes poly-ubiquitinées en monomères d'ubiquitine (Wilkinson et al., 1999). Elle possède par ailleurs une activité ubiquitine ligase non classique qui lui conduit à la formation de chaînes poly-ubiquitines résistantes à la dégradation par le protéasome (Liu et al., 2002). Les mutations réduisant l'activité hydrolase ou augmentant l'activité ligase de *UCH-L1* pourrait être fatales pour les neurones de la SN.

1.4.3. Rôle de la DA dans la pathogénèse

Le rôle de médiateur de la toxicité de l' α -synucléine joué par la DA est une notion intéressante qui pourrait expliquer la sélectivité dopaminergique de la dégénérescence dans la MP. L' α -synucléine toxique serait impliquée dans l'élévation des taux de DA cytosolique, entraînant la génération d'espèces radicalaires libres puis un stress oxydatif entraînant la mort neuronale (Lee et al., 2001; Lotharius and Brundin, 2002; Xu et al., 2002).

1.4.5. Inflammation dans la maladie de Parkinson

Les études post-mortem de cerveaux de parkinsoniens a révélé la présence de cellules microgliales activées et d'une réaction astrocytaire massive (Hirsch et al., 2003). Des données similaires ont été obtenues dans les modèles animaux de la maladie, suggérant une implication des processus inflammatoires dans la mort des neurones de la SN dans la MP. L'effet délétère ou bénéfique de ce phénomène dans le processus neurodégénératif n'est toujours pas établi ouvrant un large et excitant champ de recherche (Cohen and Schwartz, 1999).

1.5. La phase pré-symptomatique de la maladie de Parkinson

La MP est caractérisée par l'existence d'une phase précoce de dégénérescence au cours de laquelle aucun symptôme clinique n'est observable. La durée de la phase pré-symptomatique reste imprécise et varie selon les auteurs, quelques années (Fearnley and Lees, 1991; Morrish et al., 1996) à plus de vingt ans (Hoehn and Yahr, 1967). Même si la cinétique de la dégénérescence chez l'homme n'est pas aisément exploitable, on estime que les premiers symptômes n'apparaissent qu'après une dégénérescence de 70 à 80 % des terminaisons dopaminergiques projetant dans le striatum et 50 à 60 % des neurones DA de la SNc (Bernheimer et al., 1973; Riederer and Wuketich, 1976). L'existence de cette phase est liée à la mise en place de mécanismes de compensation visant à pallier la perte des neurones DA de la SN.

1.5.1. Mécanismes de compensation pré-symptomatique

La compréhension des phénomènes de compensation impliqués dans l'absence de symptômes en dépit de la perte neuronale est un point essentiel à l'établissement de dépistage pré-symptomatique de la maladie et la mise au point de stratégies préventives.

Bien que certains mécanismes aient été clairement décrits, leur contribution relative est aujourd'hui sujette à débat (Zigmond et al., 1990b; Zigmond et al., 1990a; Bezard et al., 2003; Obeso et al., 2004)

a) Maintien de l'homéostasie dopaminergique

Il y a seize ans, Zigmond et ses collègues proposaient un modèle de compensation mise en jeu lors d'une perte partielle des neurones dopaminergiques (Zigmond et al., 1990). Selon ces auteurs, la phase pré-symptomatique dans la MP résulterait essentiellement des propriétés adaptatives des neurones dopaminergiques et de l'augmentation du métabolisme dopaminergique permettant un maintien de l'homéostasie dopaminergique. Des études réalisées sur des modèles animaux lésés à la 6-OHDA, débutées dès 1966 avec les travaux de Hornykiewicz (Hornykiewicz et al., 1966), ont en effet permis de mettre en évidence des mécanismes pré-synaptiques permettant un maintien du contrôle de la DA sur ses cibles striatales (Zigmond, 1997). Selon Michael Zigmond, ceux-ci incluent essentiellement :

(1) Une augmentation de la synthèse et de la libération de la DA mise en évidence par l'augmentation de la vitesse de renouvellement de la DA révélée par le ratio HVA/DA (Bernheimer et al., 1973) et le ratio DOPAC/DA (Zigmond and Stricker, 1980). Ce phénomène serait accompagné par une augmentation de la synthèse et l'activité de la TH (Zigmond et al., 1984; Sherman and Moody, 1995). Toutefois, aucune augmentation de l'activité électrophysiologique des neurones dopaminergiques n'a été reportée (Hollerman and Grace, 1990).

(2) Une amélioration de la disponibilité de la DA extracellulaire, liée à une réduction des sites de re-captures de la DA (Snyder and Zigmond, 1990), et la formation de collatérales ou sprouting permettant une amélioration de la diffusion vers les cellules cibles.

A ces principaux mécanismes pré-synaptiques de compensation viendraient s'ajouter d'autres phénomènes à long terme, apparaissant après une déplétion extrême de DA (80 à 90% de DA): l'augmentation du nombre de récepteurs dopaminergiques et/ou de leur sensibilité (Creese et al., 1977; Zigmond and Stricker, 1980), l'augmentation de la synthèse de l'ARN de la pro-enképhaline ainsi que la diminution du message de la dynorphine et de la protachykinine (Sivam et al., 1986; Voorn et al., 1987), l'augmentation de l'activité électrophysiologique des neurones épineux de taille moyenne (Orr et al., 1986; Nissenbaum et al., 1987).

Récemment, le modèle de Zigmond a été remis en question. D'après Bézard et ses collègues, la compensation serait due à des phénomènes internes ou externes aux

ganglions de la base indépendants des niveaux ambiants de DA extracellulaire (pour une revue, lire Bezard et al., 2003).

b) Compensations indépendantes du maintien de l'homéostasie dopaminergique

La compréhension de la compensation dans la phase pré-symptomatique de la MP a été l'objet d'un travail très intéressant par l'équipe de Christian Gross. Ce travail repose sur la mise au point d'un modèle basé sur des injections répétées de faibles doses de MPTP (Bezard et al., 1997b), permettant de reproduire plus fidèlement la phase pré-symptomatique de la MP que les modèles basés sur l'injection de 6-OHDA (Bezard et al., 2001). Durant les 15-20 jours de traitement des animaux, une perte significative de neurones est ainsi obtenue sans aucun symptôme apparent. Pendant cette période, plusieurs mécanismes pourraient être principalement mis en place pour pallier le déficit dopaminergique:

(1) La régulation positive des récepteurs striataux D2 post-synaptiques (Bezard et al., 2001).

(2) La régulation positive de l'expression du gène de l'enképhaline (Bezard et al., 2001) dans les neurones striataux GABAergiques projetant dans le GPe (Figure 5) supposée diminuer la suractivité inhibitrice de ces neurones. Cela permettrait de maintenir l'action inhibitrice du GPe sur le NST à un niveau physiologique.

(3) L'augmentation de l'activité électrophysiologique du GPi et du NST, mais cette contribution reste à ce jour plus hypothétique (Bézard et al., 2003).

De plus, d'autres mécanismes pourraient impliquer des zones externes aux ganglions de la base comme les aires motrices supplémentaires qui contrebalanceraient l'activité afférente anormale des ganglions de la base. Selon ces auteurs, la MP est le résultat de deux processus divergents : la diminution du nombre de neurones DA de la SN et l'augmentation de l'intensité des processus compensatoires (figure 14).

1.5.2. Dépistage précoce pré-symptomatique

La mise en place d'une politique de santé publique performante, la prévention, le diagnostic et le traitement efficace de la MP nécessitent de disposer de tests de dépistage de la maladie lors de la phase pré-symptomatique. Ces tests, devant ainsi corrélés leurs résultats à la perte neuronale de la SN, doivent être simple à réaliser et extrêmement fiables. Pour atteindre ces objectifs, une recherche active de biomarqueurs de la maladie est entreprise (Michell et al., 2004).

a) Tests basés sur les marqueurs biochimiques

Depuis longtemps, les plaquettes sont utilisées pour refléter les caractéristiques biochimiques des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques (Da Prada et al., 1988). Les dosages de marqueurs biochimiques périphériques réalisés sur les plaquettes constituent ainsi une approche utilisée pour obtenir des informations sur les changements centraux (Michell et al., 2004). Dans le cas de la MP, des recherches de corrélations entre les molécules du stress oxydatif, la DA et l' α -synucléine périphériques et centraux ont été entrepris. Cependant aucun de ces marqueurs n'a encore donné à ce jour de résultats significatifs.

Récemment, un test ELISA permettant le dosage de la mélanine dans le sérum a été développé {Double et al., 2002} basé sur la réaction immunitaire provoquée par la libération de la mélanine après mort des neurones mélanisés de la SN. Les résultats ont montré une réponse significativement plus importante chez les patients atteints de la MP comparé aux patients sains. La réponse est de même associée à la progression de la maladie. Des essais cliniques à plus grande échelle sont en cours pour évaluer précisément l'efficacité et la fiabilité de cette méthode.

b) dépistage par tests cognitifs

La survenue de la MP est associée à l'apparition de troubles affectifs et psychologiques non spécifiques tels que la dépression, l'anxiété ou le repli sur soi et de certains troubles cognitifs (Menza, 2000). La mise au point d'échelles d'évaluation précises et fiables de la personnalité et du comportement de l'individu associées à des tests de performance motrice pourrait permettre d'établir un diagnostic pré-symptomatique de la MP. Bien que des essais prometteurs aient été entrepris, beaucoup d'efforts de recherche restent à réaliser pour disposer d'un protocole fiable et reproductif.

Récemment, la perte de la détection, de l'identification ou de la discrimination olfactive s'est révélé liée à l'apparition de la maladie (Berendse et al., 2001; Tissingh et al., 2001). Ces troubles pourraient refléter la dégénérescence au niveau du bulbe olfactif, supposée précéder la dégénérescence de la SN et l'apparition des symptômes (Braak et al., 2002). Cette approche pourrait constituer une voie intéressante de recherche pour la mise au point d'un test prédictif de la MP (Double et al., 2003).

Cependant, nous n'avons pas encore clairement démontré que le GDNF est bien synthétisé et libéré par les astrocytes. Deux éléments nous permettent de supposer que

c) Dépistage par des techniques de neuroimagerie

Les techniques de neuroimagerie telles que la tomographie par émission de photon simple en utilisant le β -CIT (SPECT) et la tomographie par émission de positron (TEP) en utilisant la fluorodopa sont utilisées en clinique et permettent d'étudier l'activité des transporteurs de la DA et des terminaisons dopaminergiques. Cependant, elles ne permettent pas d'avoir accès directement à l'évaluation de la perte neuronale et l'interprétation des résultats peut éventuellement être biaisée par le traitement pharmacologique. Depuis peu, l'utilisation de ces techniques d'imagerie pour quantifier les charges en α -synucléine a montré des résultats intéressants et prometteurs (DeKosky and Marek, 2003).

La technique de sonographie trans-crânienne a été récemment développée et permet une visualisation en deux dimensions du parenchyme cérébral à travers un crâne intact. Le potentiel de la technique pour l'étude de l'évolution de la MP s'est révélé après une étude portant sur des patients psychiatriques sous traitement de neuroleptiques. Dans cette étude, les patients présentant un signal élevé au niveau de la SN ont ultérieurement développé des symptômes sévères de la MP. Ces résultats nécessitent d'être confirmés par des études en double aveugle.

Ces techniques ne permettent pas de réaliser de diagnostic prédictif à grande échelle mais pourraient être employées après l'obtention de scores prédictifs élevés par d'autres méthodes.

I.6. Modèles animaux de la maladie de Parkinson

I.6.1. Les premiers modèles

Le développement de modèle animal de la MP commença réellement avec le traitement de souris à la réserpine, entraînant une déplétion DA dans le striatum et une akinésie pouvant être inversée par une injection de L-dopa (Carlsson et al., 1957; Duvoisin, 1976). Ces premières études posèrent les fondations de l'hypothèse du déficit en DA dans la MP (Carlsson, 1959). La confirmation de cette hypothèse (Barbeau, 1960), et la mise en évidence que la DA striatale était contenue dans les terminaisons des neurones de la SN (Anden et al., 1964b) poussa à la génération de modèles animaux sur la base de lésions de la SN. Plusieurs techniques chirurgicales (lésions électrolytiques) ou pharmacologiques (intoxication au manganèse) furent utilisées, mais aucune ne donna de résultats satisfaisants

en terme de spécificité, de reproductibilité et de fidélité de la MP (pour une revue, Duvoisin, 1976). L'obtention d'un modèle consistant fut possible après la publication d'une étude montrant qu'un analogue toxique de la DA, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), pouvait détruire les neurones catécholaminergiques périphériques de manière spécifique (Tranzer and Thoenen, 1967).

1.6.2. Lésions à la 6-hydroxydopamine

En 1968, Ungerstedt découvrit que l'injection intracérébrale de 6-OHDA dans la voie nigrostriée provoquait une chute drastique de DA dans le striatum de rat. Lorsque injectée dans le cerveau, la 6-OHDA est re-capturée de façon sélective par les cellules pourvues d'un système de transport membranaire des catécholamines (DAT concernant la dopamine) et entraîne la mort neuronale par un mécanisme impliquant l'autoxydation et la déamination par la monoamine oxydase de la toxine en plusieurs espèces hautement réactives et cytotoxiques (O_2^- , H_2O_2 , OH^- et composés quinoniques) (Soto-Otero et al., 2000}. De plus, la 6-OHDA inhibe fortement les complexe I et IV de chaîne respiratoire mitochondriale (Glinka and Youdim, 1995; Glinka et al., 1996), générant un stress oxydatif sévère (figure 16).

La 6-OHDA ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, elle nécessite d'être injectée par voie stéréotaxique directement au niveau du site de lésion. Les injections unilatérales sont les plus couramment utilisées. En particulier, l'injection massive de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (MFB) ou directement dans la SN a été intensivement utilisée pour des études comportementales, pharmacologiques et de thérapies expérimentales. La lésion induite résulte en une perte rapide de plus de 98% des neurones dopaminergiques de la SN. Cependant, ce modèle n'est pas adapté pour les études de neuroprotection et de régénération, nécessitant en effet un modèle dans lequel la mort neuronale est progressive. Il est possible d'obtenir une lésion partielle par injection de quantités plus faibles de 6-OHDA dans la SN (en particulier SN latéral) ou MFB, mais le ciblage de ces structures de petite taille ne permet pas d'obtenir une reproductibilité satisfaisante.

Ichitani (Ichitani et al., 1991) et Berger (Berger et al., 1991) furent les premiers à rapporter que l'injection de la 6-OHDA dans le striatum de rat pouvait induire une dégénérescence neuronale rétrograde et progressive dans la SN qui conduisait, deux à quatre semaines après injection de la toxine, à la perte des neurones exprimant la TH et des sites de recapture de la DA. Sauer et Oertel ont ensuite caractérisé plus finement ce modèle (Sauer and Oertel, 1994) : Une première phase correspondant à la première semaine est caractérisée par une diminution de la taille des neurones de l'ordre de 20%, sans mort neuronale. Suit une seconde phase au cours de laquelle une mort neuronale massive et

rapide a lieu (jusqu'à 60% des neurones exprimant la TH). Enfin, une troisième phase débutant à la quatrième semaine se caractérise par une dégénérescence progressive et lente pouvant durer plusieurs mois. Par ailleurs, il a été montré que l'étendue et la spécificité de la perte neuronale est dépendante de la quantité de toxine injectée et du nombre de sites ciblées (Przedborski et al., 1995; Lee et al., 1996). Les effets fonctionnels consécutifs sont eux dépendants de la zone du striatum ciblé : la dénervation de la partie dorsomédiane entraîne des effets sur la locomotion alors que la dénervation de la partie ventrolatérale affecte plus particulièrement l'initiation du mouvement, l'orientation sensorimotrice et le comportement moteur spécialisé (Dunnett and Iversen, 1982a, 1982b; Sabol et al., 1985; Cousins et al., 1993; Cousins and Salamone, 1996). Ce modèle est le plus couramment utilisé dans les thérapies expérimentales de protection et régénération (Bjorklund et al., 1997).

L'avantage majeur de la lésion unilatérale de 6-OHDA, complète ou partielle, réside en ce qu'elle donne accès à un test moteur simple, basé sur le comportement rotatoire quantifiable induit par des substances pharmacologiques. En effet, sous l'effet de drogues qui stimulent la libération de la DA par les fibres non lésées, telles que l'amphétamine, l'animal aura un comportement rotatoire préférentiel vers le côté contralatéral à la lésion (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Zetterstrom et al., 1983). En revanche, l'administration d'agonistes dopaminergiques, comme l'apomorphine, aura pour effet de stimuler plus fortement l'hémisphère lésé, les récepteurs D2 striataux y étant hypersensibilisés par compensation physiologique. Ainsi, un comportement rotatoire vers le côté ipsilatéral à la lésion sera observé (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). Concernant le modèle de lésion partiel, l'utilisation de l'amphétamine est plus adaptée, l'apomorphine donnant une réponse moins consistante, moins sensible et plus variable que l'amphétamine dans ce type de lésion. En revanche, pour tester des animaux ayant une perte neuronale sévère, l'apomorphine permet d'obtenir des résultats plus cohérents (Cadet and Zhu, 1992; Barneoud et al., 1995; Przedborski et al., 1995; Lee et al., 1996).

Enfin, l'injection bilatérales de 6-OHDA rend les rats akinésiques (Ungerstedt, 1971 ; Zigmond and Stricker 1984) avec des caractéristiques proches de celles retrouvées chez des patients parkinsoniens atteints bilatéralement. Cependant, l'utilisation de ce modèle est rendue difficile par l'aphagie et l'adipsie induites, qui rendent les animaux fragiles et nécessitent de nourrir les animaux par perfusion.

1.6.3. Intoxication au MPTP

L'administration systémique de MPTP chez le singe et la souris entraîne une lésion bilatérale sélective des neurones dopaminergiques de la SN ainsi qu'une déplétion massive

en DA striatale (Burns et al., 1983; Langston et al., 1984a). Cette perte neuronale passe par la conversion dans les astrocytes du MPTP en MPP⁺ catalysée par la monoxydase-B (Singer et al., 1987). Le MPP⁺ est ensuite recapté par les neurones dopaminergiques et entraîne un déficit du complexe I mitochondrial similaire à celui observé chez les patients parkinsoniens (figure 17). Les primates développent un syndrome parkinsonien qui reproduit les caractéristiques de la maladie et répondent au traitement par la L-dopa et les agonistes dopaminergiques D2 (Burns et al., 1983; Jenner et al., 1984). La perte neuronale se caractérise par une atteinte préférentielle de la SN latérale et du putamen, comme chez l'homme. Le *locus coeruleus* et l'aire tegmentale ventrale (VTA) sont également touchés (Forno et al., 1986a; German et al., 1988; Forno et al., 1993).

Le MPTP induit la formation d'inclusions éosinophiles intracytoplasmiques qui contiennent de l' α -synucléine et ressemblent aux CL de la MP sans présenter ni les mêmes caractéristiques immunocytochimiques ni la même morphologie (Forno et al., 1986a; German et al., 1988; Forno et al., 1993; Kowall et al., 2000). Ce modèle de lésion bilatérale souffre d'une forte variabilité inter-individuelle de susceptibilité à la toxine, associée parfois à un phénomène de récupération spontanée de la fonction neurologique (Eidelberg et al., 1986; Kurlan et al., 1991). D'autre part, les symptômes neurologiques peuvent s'avérer extrêmement invalidants pour les animaux qui nécessitent alors des soins particuliers de la part de l'expérimentateur.

La toxine peut être injectée dans les deux carotides internes, entraînant l'apparition d'un syndrome parkinsonien bilatéral stable assez proche de la pathologie humaine et sans effets secondaires (Smith et al., 1993; Oiwa et al., 2003). Des administrations journalières ou hebdomadaires de faibles doses de MPTP reproduisent fidèlement et de façon progressive les signes cliniques et neuropathologiques de la MP humaine chez les primates ou la souris (Hantraye et al., 1993; Perez-Otano et al., 1994; Varastet et al., 1994; Bezard et al., 1997a; Bezard et al., 1997b; Brownell et al., 1998; Petroske et al., 2001). Par ailleurs, le MPTP peut être injecté dans une artère carotide interne ce qui entraîne l'apparition d'un syndrome hémiparkinsonien stable (Bankiewicz et al., 1986; Chen, 1990; Guttman et al., 1990).

Chez le rat, seule l'injection intrastriatale de MPP⁺ permet d'obtenir des résultats exploitables mais loin de reproduire ceux obtenus chez la souris et le singe (Beresford et al., 1988).

1.6.4. Lésions induites par des pesticides

a) Rotenone

La roténone est un pesticide inhibiteur de la NADH deshydrogénase mitochondriale (complexe I de la chaîne respiratoire) dont la perfusion chronique par voie sous cutanée ou l'injection stéréotaxique (Alam and Schmidt, 2004) permet d'induire un syndrome parkinsonien. Chez le rat, l'administration intraveineuse à faible dose donne lieu à une dégénérescence progressive et à la formation d'inclusions de type CL contenant de l' α -synucléine (Betarbet et al., 2000). Il semble que d'autres types de neurones puissent être affectés par cette toxine (Hoglinger et al., 2003), remettant en question l'hypothèse d'une susceptibilité préférentielle des neurones de la SN à une atteinte du complexe I mitochondrial. L'inconvénient de ce modèle repose sur les problèmes techniques de sa mise en œuvre et à sa faible reproductibilité (Betarbet et al., 2000). Néanmoins, ce modèle fut le premier à relier une toxine présente dans l'environnement à la formation pathologique d'agrégats d' α -synucléine.

b) Paraquat

L'herbicide paraquat, qui partage une similarité structurale avec le MPTP, est présent dans l'environnement. L'exposition à cette molécule est un facteur de risque de la survenue de la MP (Liou et al., 1997). Bien que le paraquat pénètre peu aisément la BHE, son utilisation permet de générer un modèle animal de la MP. En effet, l'administration systémique de paraquat chez la souris entraîne la mort des neurones de la SNC, accompagnée d'inclusions contenant de l' α -synucléine et d'une augmentation du marquage de l' α -synucléine dans le cortex frontal (Manning-Bog et al., 2002; McCormack et al., 2002). La dégénérescence neuronale est induite par une augmentation de la synthèse d' O_2^- (Day et al., 1999; McCormack et al., 2002) et par la formation de fibrilles d' α -synucléine dont il modifie la conformation protéique native (Uversky et al., 2001; Manning-Bog et al., 2002).

1.6.5. Modèles par surexpression de protéines

Il est possible de générer des modèles animaux de la MP en sur-exprimant l' α -synucléine humaine normale ou mutée par transgénèse, chez la souris (Masliah et al., 2000; Matsuoka et al., 2001; Giasson et al., 2002) et chez la drosophile (Feany & Bender, 2000 ; Pendelton et al., 2002}. Ces souris ne présentent pas de dégénérescence des neurones dopaminergiques mais un ensemble de changements neuropathologiques (atrophie neuronale, neurites dystrophiques, astrocytose) accompagnés d'inclusions contenant de l' α -synucléine et, selon les modèles, des symptômes moteurs. Chez la drosophile, la surexpression de l' α -synucléine mène à la dégénérescence des neurones dopaminergiques,

à la présence d'inclusions de fibrilles d' α -synucléine (Takahashi et al., 2003) ainsi qu'à des anomalies comportementales corrigées par la L-dopa.

L'injection directe de l' α -synucléine dans la SN de rat par transfert de gène viral aboutit à la perte sélective des neurones dopaminergiques, accompagnée d'inclusions contenant de l' α -synucléine et de déficits moteurs (Kirik et al., 2002; Klein et al., 2002; Lo Bianco et al., 2004). Des résultats identiques ont été retrouvées après transfert chez le singe (Kirik et al., 2003).

I.7. Traitements de la maladie de Parkinson

Les traitements de la MP ont heureusement connu de grandes avancées depuis la suggestion faite par James Parkinson lui-même : « ...Il faudrait d'abord tirer du sang de la partie supérieure du cou... »¹. Malgré cela, il n'existe à ce jour toujours pas de traitements curatifs ou préventifs de la maladie. La mise au point de traitements symptomatiques a permis néanmoins d'améliorer grandement le confort de vie des patients.

I.7.1 Traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques visent principalement à pallier le déficit en DA et ses conséquences au niveau du striatum. Ils agissent à différents niveaux :

- rétablissement des taux striatux de DA par la prise de L-dopa et d'inhibiteur des AADC
- prévention de la dégradation de la L-dopa et de la DA (inhibiteur de la catechol-O-méthyltransferase (iCOMT) et inhibiteur de la monoamine oxydase-B)
- stimulation directe des récepteurs dopaminergiques par des agonistes dopaminergiques
- inhibition des neurones cholinergiques striataux par des anticholinergiques

a) L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) et associés

La mise en évidence de la déplétion massive en DA dans le striatum (Ehringer and Hornykiewicz, 1960) a permis d'envisager un traitement basé sur l'apport exogène de DA. Celle-ci ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, l'utilisation de la L-dopa, précurseur de la DA, a montré un puissant effet thérapeutique dans les modèles animaux, puis chez l'homme (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961 ; Cotzias et al., 1969; Barbeau et al., 1986). La prise orale de L-dopa, conjuguée à celle d'inhibiteur de l'AADC pour diminuer sa dégradation périphérique, reste jusqu'à aujourd'hui le traitement le plus efficace de la MP.

¹ James Parkinson *essai sur la paralysie tremblante*, traduction et annotation par Souques et Alajouanine, édition Masson, 1923.

Cependant, même si l'efficacité de la L-dopa pour le contrôle des symptômes de la maladie demeure incontestable, son utilisation chronique induit à long terme des effets secondaires importants et rapidement invalidants (Marsden and Parkes, 1976 ; Rinne et al., 1980 ; Agid et al., 1998). En effet, chez la plupart des malades, des fluctuations imprévisibles des performances motrices apparaissent en moyenne après cinq ans de traitements. Ces complications se manifestent par la réapparition des symptômes parkinsoniens quelques heures après la prise (wearing off), des phénomènes de blocage et déblocage (on-off) sans rapport avec la prise du médicament. Souvent, ces effets secondaires sont accompagnés par la survenue de mouvements anormaux involontaires (dyskinésies) de type choréiques ou dystoniques, fortement invalidants pour le patient. D'autre part, des troubles psychiatriques (psychoses hallucinatoires ou délirantes) peuvent être induits par le traitement (Goetz and Stebbins, 1995). Parallèlement à la survenue de ces effets secondaires, l'efficacité thérapeutique de la L-dopa s'estompe avec la progression de la maladie. En effet, la capacité de transformation de la L-dopa en DA, son stockage et son relargage de façon régulée diminue avec la mort inexorable des neurones dopaminergiques (Chase, 1998).

Aux vues de ces effets positifs et négatifs, un débat sur un éventuel effet délétère de la L-dopa a vu le jour (Spina and Cohen, 1988 ; Olanow, 1990 ; Agid , 1998) et a poussé les médecins à retarder le plus possible la prise de L-dopa (Lozano et al., 1998), qui reste, rappelons le, le traitement de la MP le plus efficace à ce jour.

Pour réduire les doses de L-dopa et ainsi prévenir la survenue des effets secondaires liés au traitement, des agonistes dopaminergiques tels que l'apomorphine (Schwab et al., 1951 ; Hagan et al., 1997 ; Tolosa et al., 1998) sont utilisés. De plus, des inhibiteurs du catabolisme de la DA, tels que le déprényl (inhibiteur spécifique de la monoamine oxydase-B) ont montré leur effet bénéfique, tout comme les inhibiteurs du catabolisme de la L-dopa (inhibiteurs de la catechol-0-méthyltransferase, iCOMT). La prescription de ces traitements permet de différer grandement le début de traitement par la L-dopa (The Parkinson study group, 1993 ; 1996 ; Chase, 1998).

b) Anticholinergiques

L'utilisation des anticholinergiques a été introduite en France en 1869 par Jean-Martin Charcot qui avait remarqué l'effet bénéfique de la prise d'atropine sur les tremblements, pour laquelle il a été montré par la suite une réduction de l'hyperactivité cholinergique du striatum (Calne, 1993). L'utilisation des dérivés synthétiques de l'atropine, mieux tolérés, constituait la base du traitement pharmacologique avant l'arrivée de la L-dopa. Même si de nombreux

effets indésirables sont liés à ce traitement, il reste cependant particulièrement intéressant pour les formes de la maladie où les tremblements sont prédominants.

c) Autres traitements pharmacologiques

Récemment, de nouvelles voies de traitements pharmacologiques ont vu le jour : l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine A(2A) (Richardson et al., 1997), d'antagonistes de récepteurs aux kappa-opioïdes (Hughes et al., 1998), d'antagonistes de récepteurs nicotiques neuronaux (Pidoplichko et al., 1997), antagonistes glutamatergiques (Papa and Chase, 1996), d'inhibiteurs du transport de la DA (Ebadi et al., 1996). Toutes ces approches ont montré un effet bénéfique sur les symptômes parkinsoniens.

1.7.2. Traitements neurochirurgicaux

Les premiers traitements chirurgicaux de la MP étaient basés sur des lésions cérébrales dont les cibles ont évolué avec les années : ainsi, dans les années 1950 la cible était le GP interne puis le thalamus dans les années 60 et 70. Ces traitements se sont révélés efficaces dans le traitement des troubles moteurs, en particulier les tremblements. Cependant, le rapport bénéfice/risque s'est avéré défavorable en comparaison des traitements médicamenteux émergents, poussant à l'abandon de la chirurgie. Vers la fin des années 80, Benabid et ses collègues remplacèrent la thalamotomie par la stimulation électrique du noyau ventral intermédiaire du thalamus dans le traitement du tremblement parkinsonien, sans réussir à améliorer la rigidité et l'akinésie (Benabid et al., 1987). Au début des années 1990 une équipe anglo-saxonne (Bergman et al., 1990) montra l'efficacité de la lésion du noyau sous thalamique (NST) dans un modèle de singes parkinsoniens.

En 1993, Benazzouz et ses collègues démontrèrent que la stimulation haute fréquence du NST permettait de corriger les déficits moteurs dans un modèle de singe de la MP (Benazzouz et al., 1993). L'application à l'homme a montré des effets bénéfiques sur le contrôle des tremblements et les dyskinésies, mais aussi de la rigidité, les troubles de la posture et de la démarche (Benabid, 2003). La stimulation s'effectue à l'aide d'électrodes implantées dans le cerveau reliées à un stimulateur dont le voltage est réglable, ce qui permet d'augmenter l'inhibition avec l'avancée de la maladie.

Ce traitement, vivement conseillé aujourd'hui, diminue considérablement les doses de médicaments prescrites.

1.7.3. Greffes de tissus mésencéphaliques foetaux

Des études cliniques portant sur la transplantation de tissus mésencéphaliques foetaux humains ont commencé dès 1987, apportant la preuve de principe du bien fondé de cette stratégie pour le remplacement des neurones dopaminergiques pour la MP. Les neurones mésencéphaliques ainsi greffés peuvent ré-innover le striatum lésé, restaurer des taux de DA régulés, et activer les aires frontales corticales liées au mouvement, générant des effets symptomatiques bénéfiques (Lindvall et al., 1990; Lindvall et al., 1992; Sawle et al., 1992; Lindvall et al., 1994; Peschanski et al., 1994; Kordower et al., 1998; Johnston et al., 2001). Par ailleurs, dans la plupart des cas montrant un effet important, les patients ont pu abandonner la prise de la L-dopa après la transplantation et vivre de manière indépendante (Wenning et al., 1997; Hagell et al., 1999; Piccini et al., 1999; Brundin et al., 2000). Toutefois, certains problèmes liés à l'utilisation de ce type de tissus persistent : (1) la disponibilité largement insuffisante de tissus liée à la rareté des foetus humains disponibles et doublée de la nécessité d'en utiliser des grandes quantités (2) la variabilité des effets du traitement selon les patients et (3) la survenue de dyskinésies chez une proportion significative de patients (Freed et al., 2001; Hagell et al., 2002). Ces problèmes, dont des solutions sont activement recherchées (Lindvall and Bjorklund, 2004; Paul, 2006), maintiennent donc ce traitement prometteur à un stade expérimental.

D'autres traitements encore dans des phases cliniquement précoces ont fait la preuve de leur efficacité dans les modèles animaux de la MP, comme la xénogreffe de tissus embryonnaires foetaux (Isacson et al., 1995) ou la greffe de cellules dopaminergiques amplifiées en culture (Bouvier and Mytilineou, 1995).

Tous ces traitements ont pour point commun de traiter les symptômes de la maladie en remplaçant le déficit dopaminergique ou les conséquences de celui-ci. Ils ne peuvent en revanche ni ralentir, voire arrêter, la progression inexorable de la maladie. Un intérêt particulier est donc apporté à la recherche d'agents protecteurs permettant de prévenir la survenue de la maladie.

1.7.4. traitements préventifs

A ce jour, plusieurs essais cliniques utilisant des agents pharmacologiques ont été réalisés dans le but de ralentir la progression de la maladie, mais aucun n'a montré clairement de neuroprotection (Ravina et al., 2003; Stocchi and Olanow, 2003). Récemment, le comité d'identification d'agents protecteurs de la MP (CINAPS) a sélectionné 12 agents

susceptibles de conférer une neuroprotection afin d'être testés lors d'essais cliniques (Ravina et al., 2003; Meissner et al., 2004).

Les données les plus prometteuses à ce jour proviennent des études concernant les facteurs neurotrophiques. Depuis la découverte par Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen du nerve growth factor (NGF) dans les années 50, qui leur valut le prix Nobel en 1987, de nombreux facteurs neurotrophiques ont été caractérisés. Parmi eux, le NGF, le BDNF, NT3 et NT4/5, le bFGF et le TGF β ont démontré leur capacité relative à favoriser la survie et la différenciation des neurones dopaminergiques fœtaux en culture (Bradford et al., 1999). Mais, c'est le facteur neurotrophique dérivé de lignée cellulaire gliale (GDNF) qui possède les effets les plus puissants et les plus spécifiques, le positionnant comme la molécule la plus prometteuse pour un traitement de protection de la MP (Hurelbrink and Barker, 2001).

II. LE FACTEUR NEUROTROPHIQUE DÉRIVÉ DE LIGNÉE CELLULAIRE GLIALE

La progression lente de la mort des neurones dopaminergiques dans la MP associée à une période relativement longue avant le déclenchement des symptômes font de la MP un candidat de choix pour une thérapie de « sauvetage ». L'administration d'un facteur protecteur au moment du déclenchement des symptômes pourrait ralentir, arrêter voire inverser la progression de la maladie, et ainsi, soigner le patient. Plusieurs facteurs ont été démontrés comme protecteurs des neurones dopaminergiques. Parmi ceux ci, le facteur neurotrophique dérivé de lignée cellulaire gliale (GDNF) est le plus spécifique et le plus efficace pour la protection et la promotion de la fonction dopaminergique.

II.1. Purification et caractérisation du GDNF

Le GDNF a été mis en évidence pour la première fois en 1993 (Bermingham et al., 1995). A cette époque, il était connu qu'une activité neurotrophique provenant des cellules gliales existait (Engel et al., 1991; O'Malley et al., 1992) mais les facteurs responsables de cette activité n'avaient pas encore été caractérisés. Lin et ses collaborateurs ont réussi à purifier et à cloner un facteur issu de la lignée gliale de rat B49 en se basant sur les capacités de la protéine à promouvoir la recapture de la dopamine dans des cultures de mésencéphale. Le facteur isolé, nommé GDNF, est une protéine glycosylée, homodimérique (lié par des ponts disulfures) et de taille apparente de 32 à 42 KDa. L'analyse de la séquence du GDNF a permis de le rapprocher de la superfamille du TGF- β , de par la conservation des sites de glycosylation dans la partie N-terminale, et de montrer une identité importante (93%) entre la séquence du GDNF de rat et de l'homme. Le gène codant le GDNF humain est localisé sur le chromosome 5, en 5p12-p13.1 (Schindelhauer et al., 1995) et en 5p13.3-p13.1 (Bermingham et al., 1995). Deux isoformes, générées par épissage alternatif, ont été clonées : une première se caractérise par une délétion de 78 pb dans la région Pro de la préprotéine, une seconde par une insertion de 79 pb qui, en provoquant un décalage du cadre de lecture, aboutit à la formation d'une protéine complète mais sans peptide signal (Schaar et al., 1994; Suter-Crazzolara and Unsicker, 1994; Choi-Lundberg and Bohn, 1995; Trupp et al., 1995).

L'expression du GDNF est détectée chez l'adulte à des niveaux variant en fonction du tissu : il est détecté dans la plupart des régions cérébrales (striatum, SN, hippocampe, cortex, cervelet et moelle épinière) ainsi que dans de nombreux tissus non-nerveux comme le cœur, le foie, le rein, le poumon, les testicules et le sang, chez le rat (Schaar et al., 1993; Suter-Crazzolara and Unsicker, 1994; Choi-Lundberg and Bohn, 1995; Trupp et al., 1995) et

chez l'homme (Schaar et al., 1994; Suzuki et al., 1998; Kawamoto et al., 2000; Davidoff et al., 2001). Chez l'embryon, le profil d'expression du GDNF est dépendant de l'âge. Il est détecté dans toutes les principales structures du SNC et dans les organes périphériques, en quantité souvent supérieure à celle présente dans le SNC (Schaar et al., 1993; Choi-Lundberg and Bohn, 1995).

Le GDNF fait partie des ligands de la famille du GDNF dans laquelle sont retrouvés la neurturine (NRN), l'artemin (ART) et la persephin (PSP) (Kotzbauer et al., 1996; Baloh et al., 1998; Milbrandt et al., 1998). Tous ces facteurs possèdent sept domaines riches en cystéines et partagent environ 40 % d'identité en AA.

II.2. Effets biologiques et rôles du GDNF

Alors que le GDNF avait été isolé sur sa capacité à promouvoir la survie des neurones dopaminergiques embryonnaires, il s'est révélé qu'il possédait un large spectre d'action dans le système nerveux et en dehors de celui-ci (Airaksinen and Saarma, 2002; Sariola and Saarma, 2003).

II.2.1. Effets sur le système dopaminergique

Deux principaux effets du GDNF ont été mis en évidence : l'effet neuroprotecteur et l'effet neurotrophique (Lin et al., 1993). Chez l'adulte, le GDNF favorise la survie des neurones dopaminergiques (Beck et al., 1995), entraîne la formation de collatérales (bourgeonnement ou *sprouting*) chez le rat (Hudson et al., 1995), le singe (Gash et al., 1996) et l'homme (Love et al., 2005), stimule la synthèse et le turn-over de la DA (Hoffer et al., 1994; Hudson et al., 1995) et augmente la taille des corps cellulaires (Bowenkamp et al., 1995; Gash et al., 1996). Par ailleurs, l'application de GDNF à des neurones dopaminergiques en culture accroît l'excitabilité neuronale par la modulation des canaux ioniques (Yang et al., 2001; Wang et al., 2003) et augmente le taux de décharge spontanée et la taille des quanta libérés par les terminaisons dopaminergiques (Pothos et al., 1998). Enfin, le GDNF entraîne des phosphorylations de la TH (Salvatore et al., 2004), favorisant une synthèse accrue de DA.

L'expression soutenue et à long terme de GDNF *in vivo* semble entraîner une régulation négative de l'expression du gène de la TH dans le système nigrostrié intact (Georgievska et al., 2004a; Salvatore et al., 2004) ou lésé (Georgievska et al., 2002a; Georgievska et al., 2002b; Rosenblad et al., 2003; Georgievska et al., 2004b; Georgievska et al., 2004a). Ce phénomène est réversible (Lu and Hagg, 1997; Georgievska et al., 2004b), qui dépend de la

dose de GDNF et de la durée d'exposition (Georgievska et al., 2004a)) et aboutit à la diminution du taux de dopamine et une augmentation de la production de la BH4, cofacteur essentiel de la TH (Sajadi et al., 2005). Ce phénomène pourrait constituer un mécanisme de compensation du système dopaminergique après une synthèse excessive de DA afin de revenir à des valeurs physiologiques. Cependant, aucune étude réalisée chez le singe ne fait état de pareil phénomène (Grondin and Gash, 1998; Kordower et al., 2000) et son existence reste imprécise chez l'animal lésé (Sajadi et al., 2005). Enfin, il reste à préciser si cette compensation est indirectement ou directement induite par l'application de GDNF, et quel pourrait en être l'impact sur la récupération fonctionnelle.

III.2.2. Effets sur les autres types de neurones

Outre ses effets neurotrophique et neuroprotecteur sur les neurones DA, le GDNF exerce ces mêmes effets sur une variété de populations neuronales telles que les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Arenas et al., 1995), et les neurones du thalamus, de l'hippocampe et de l'amygdale (Martin et al., 1995). De plus, c'est un facteur de survie pour les neurones sensoriels et autonomes, dont l'action est dépendante de l'âge: les neurones sympathiques, parasympathiques et proprioceptifs deviennent de moins en moins réceptifs avec l'âge alors que les neurones entéroceptifs et sensoriels cutanés le deviennent plus (Buj-Bello et al., 1995). Par ailleurs, le GDNF protège les motoneurones de la dégénérescence programmée ou induite par axotomie chez le nouveau né et l'adulte (Henderson et al., 1994; Beck et al., 1995; Oppenheim et al., 1995). Ces données ont ouvert une voie de recherche pour le traitement expérimental par le GDNF de lésion ou trauma de la moelle, aboutissant à des résultats très prometteurs (Bohn, 2004).

III.2.3. Rôle du GDNF au cours du développement

Le GDNF s'exprime dans les principales structures du SNC au cours du développement (Shaar et al., 1993 ; Choi-Lundberg & Bohn, 1995) et joue un rôle dans la survie et la différenciation *in vitro* des neurones dopaminergiques (Tomac et al., 1995), des motoneurones spinaux (Henderson et al., 1994), et des cellules de Purkinje du cervelet (Mount et al., 1995). Il participe également au développement des neurones du SNP en favorisant la survie et la croissance neuritique en culture des neurones sympathiques, des neurones parasympathiques des ganglions ciliaires et des neurones sensoriels des ganglions rachidiens (Ebendal et al., 1995). Par ailleurs, l'inactivation génétique du GDNF par génération de souris « knock-out » a permis de démontrer une importance du GDNF dans le développement de différents tissus et neurones. Ainsi, le GDNF est important dans

le développement et/ou la survie des neurones entériques, sensoriels et sympathiques et dans la mise en place et du système rénal (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996b, 1996a; Sanchez et al., 1996). De façon surprenante, il ne semble pas essentiel au développement des neurones catécholaminergiques. D'autre part, le GDNF est impliqué dans le développement du tractus digestif et des systèmes osseux et musculaire chez le rat (Choi-Lundberg and Bohn, 1995; Suvanto et al., 1996; Meng et al., 2000). Enfin, le GDNF joue un rôle dans le contrôle de la spermatogénèse chez l'homme (Davidoff et al., 2001), ce qui en fait un candidat idéal pour le développement de contraceptif masculin.

II.3. Mécanismes d'action du GDNF

II.3.1. Les récepteurs du GDNF

L'action biologique induit par le GDNF nécessite sa fixation à un complexe de récepteurs à multicomposants (Treanor et al., 1996) composé du co-récepteur à glycosyl phosphatidylinositol (GPI) GFR α 1 et du récepteur RET (Gash et al., 1996). La séquence d'activation du GDNF nécessite tout d'abord sa fixation sur GFR α 1. Dans la famille des GFLs, Le GDNF, la NRN, l'ART et la PSP utilisent respectivement GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 et GFR α 4 comme récepteurs préférentiels de liaison. Chaque membre peut aussi se fixer sur un ou plusieurs co-récepteurs secondaires (fig. 18). Ainsi, le GDNF peut se fixer sur GFR α 2 et GFR α 3.

La fixation du GDNF sur le GFR α 1 entraîne l'activation du second composant du complexe, le récepteur RET (Durbec et al., 1996; Trupp et al., 1996) responsable de l'émission du signal intracellulaire. Ce récepteur trans-membranaire à tyrosine kinase, identifié en 1985, est un proto-oncogène activé par réarrangement de l'ADN (Takahashi et al., 1985; Takahashi and Cooper, 1987) et possède dans son domaine extracellulaire un motif proche des cadhérines et un motif riche en cystéines (Takahashi, 1988; Iwamoto et al., 1993).

Des expériences de mutagenèse ont permis de préciser le mode de fixation du GDNF sur RET et GFR α 1 (Eketjall et al., 1999; Bordeaux et al., 2000; Chen et al., 2000). Deux voies de fixation/activation sont possibles : dans un premier cas, le GDNF se fixerait sur un complexe RET/GFR α 1 préformé, enclenchant la signalisation (activation en *cis*). Le second cas reposerait sur une activation en *trans* de RET par GFR α 1 soluble ou immobilisé sur les cellules adjacentes (Yu et al., 1998; Paratcha et al., 2001).

Une activation induite par le GDNF indépendante de RET a été mise en évidence (Poteryaev et al., 1999; Trupp et al., 1999). Cette activation met en jeu une association du récepteur GFR α 1 avec la molécule d'adhésion des cellules neurales NCAM (Paratcha et al., 2003). Cette voie d'activation, dite « en *trans* », n'est pas indispensable à l'organogénèse et à la régénération neuronale et ce qui suggère qu'elle pourrait jouer un rôle physiologique mineur (Enomoto et al., 2004).

Enfin, une dernière cible membranaire du GDNF a été mise en évidence dans les cellules de rein dépourvues de RET, dans lesquelles le GDNF est capable de phosphoryler les tyrosines du récepteur MET à tyrosine kinase (Popsueva et al., 2003).

II.3.2. Voies de signalisation intracellulaire

Après fixation du GDNF sur le complexe de récepteur, la signalisation intracellulaire induite par le récepteur TK RET repose sur l'activation de deux voies principales, la voie des MAP kinases et la voie du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), qui contribue à la survie neuronale (Kaplan and Miller, 2000). La voie du PI3-kinase entraîne l'activation de la protéine kinase à Sérine/thréonine Akt qui inhibe diverses molécules impliquées dans l'apoptose cellulaire (Besset et al., 2000). L'activation de la voie des MAP kinases ERK-1 et ERK-2, en revanche, stimule l'activation ou l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou le facteur de transcription cAMP Response Element Binding protein (CREB) (Trupp et al., 1999).

Par ailleurs, dans les cellules dépourvues de RET et dans lesquelles la transduction du signal est réalisée par le complexe GFR α 1/NCAM, les kinases Fyn et FAK sont activées, aboutissant à la stimulation de la croissance axonale et de la migration cellulaire (Paratcha et al., 2003).

II.3.3. Transport rétrograde et antérograde du GDNF

Comme pour d'autres neurotrophines telles que le NGF (Neet and Campenot, 2001), le GDNF est transporté de manière rétrograde depuis les terminaisons nerveuses jusqu'au corps cellulaire. En effet, après injection de GDNF marqué radioactivement dans le striatum, le GDNF marqué est détecté dans la substance noire (Tovac et al., 1995). L'injection simultanée de NGF ou TGF- β n'abolit pas ce transport, indiquant une spécificité du transport du GDNF par la voie nigrostriée. Par ailleurs, alors que tous les neurones ayant transporté le GDNF expriment la TH, seuls 50% des neurones exprimant la TH ont transporté le GDNF,

mettant en relief la possibilité qu'une sous population de neurones dopaminergiques soit préférentiellement susceptible de dégénérer (Barroso-Chinea et al., 2005). Le transport rétrograde de GDNF a également été mis en évidence dans les neurones sensoriels, sympathiques et parasympathiques et dans les motoneurones (Leitner et al., 1999).

III. UTILISATION DU GDNF EN THÉRAPIE EXPÉRIMENTALE DE LA MALADIE DE PARKINSON

« ... Il semble qu'il y ait des raisons suffisantes d'espérer qu'on découvrira avant peu des procédés thérapeutiques qui permettront, tout au moins, d'arrêter les progrès de la maladie. »¹ James Parkinson, 1817.

Comme nous venons de le voir, le GDNF possède de multiples cibles d'actions pour ses effets neurotrophiques et neuroprotecteurs. Ainsi, les maladies qui pourraient bénéficier d'un traitement par le GDNF sont nombreuses, au rang desquelles figurent la maladie d'Alzheimer, l'amyotrophie latérale spinale, les traumatismes de la moelle, les attaques cérébrales et la maladie de Parkinson. Isolé sur la base de son action sur les neurones dopaminergiques, il était évident que sa spécificité, ses puissants et nombreux effets vis à vis du système dopaminergique destinaient le GDNF plus naturellement au traitement de la MP.

Les nombreuses études menées dans cette optique ont permis de préciser les modalités du traitement par le GDNF mais aussi de comprendre l'action du GDNF sur la voie nigrostriée, et d'apporter des informations importantes sur le fonctionnement de ce système.

Le GDNF ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique, le facteur doit donc être directement apporté au niveau du site d'action. Différentes méthodes et diverses approches ont ainsi été utilisées pour permettre un apport exogène de GDNF dans le cerveau.

III.1. Infusion intracérébrale de la protéine recombinante

III.1.1. Etudes chez les animaux modèles

Les premières études démontrant les propriétés protectrices et régénératrices du GDNF *in vivo* furent réalisées par injection directe de la protéine recombinante. Ainsi les injections intranigrale, intrastriatale et/ou intracérébroventriculaire (ICV) ont prouvé leur efficacité dans des modèles animaux de rat et de primate non humain.

a) Etudes chez le rat

La majorité des études a été réalisée chez le rat lésé unilatéralement à la 6-OHDA. Dans ce modèle, l'injection de GDNF a montré une augmentation locale des niveaux de DA

¹ James Parkinson *essai sur la paralysie tremblante*, traduction et annotation par Souques et Alajouanine, édition Masson, 1923.

accompagnée par la formation de collatérales et une augmentation de l'activité dopaminergique dans le striatum, ainsi qu'une augmentation de la taille des somas des neurones (Hoffer et al., 1994; Bowenkamp et al., 1995; Hudson et al., 1995; Kearns and Gash, 1995; Rosenblad et al., 1998; Sullivan et al., 1998). L'injection du GDNF au niveau de la SN est efficace pour protéger les neurones contre une lésion complète (Hoffer et al., 1994; Kearns and Gash, 1995; Lapchak et al., 1997b; Sullivan et al., 1998) ou partielle (Sauer et al., 1995; Winkler et al., 1996). L'injection de GDNF au niveau du striatum protège les neurones dopaminergiques de la SN lors d'une lésion rétrograde des neurones (Rosenblad et al., 1998; Rosenblad et al., 1999; Kirik et al., 2000a), mais avec une efficacité inférieure à l'injection intranigrale de GDNF (Kirik et al., 2000a). Notons qu'aucune étude ne rapporte les effets de l'injection intrastriatale de GDNF dans le cadre de lésion complète de la SN. Enfin, l'injection intraventriculaire a de même été étudiée (Lapchak et al., 1997b; Rosenblad et al., 1999; Kirik et al., 2000a; Kirik et al., 2001), mais les effets du GDNF semblent être limités par la faible diffusion de la protéine dans le parenchyme par cette voie.

La comparaison des différentes voies d'administration a montré que seule l'injection intrastriatale de GDNF était capable de restaurer le comportement moteur des animaux (Kirik et al., 2000a). Ceci tiendrait au fait que seule la localisation striatale du GDNF permet une protection non seulement des neurones de la SN mais aussi des fibres dopaminergiques striatales. Le maintien de l'innervation striatale et de la libération de DA semble donc être l'élément critique de la récupération fonctionnelle.

Le GDNF a montré une action bénéfique sur le système nigrostrié lorsque qu'il est infusé (1) avant la lésion (Kearns and Gash, 1995; Kearns et al., 1997; Kirik et al., 2000a), ce qui met en valeur ses propriétés protectrices, (2) après la lésion (Lapchak et al., 1997a; Rosenblad et al., 1998) mettant en valeur ses propriétés régénératrices, ou (3) si l'infusion débute le jour de la lésion à la 6-OHDA (Sauer et al., 1995; Winkler et al., 1996; Sullivan et al., 1998; Rosenblad et al., 1999). En effet, dans tous les cas un bourgeonnement des fibres dopaminergiques innervant le striatum est observé. Mais, en fonction du début de l'infusion, les neurones de la SN sont protégés de manière variable. Une protection optimale est ainsi obtenue lorsque le GDNF est injecté 6h avant une lésion complète (Kearns et al., 1997). Dans le cas de lésion partielle rétrograde, la fenêtre temporelle thérapeutique semble être plus importante (Kearns and Gash, 1995; Sauer et al., 1995; Winkler et al., 1996; Rosenblad et al., 1998).

b) Etude chez le primate non humain

Les études chez le primate ont été effectuées dans le modèle induit par une injection intra-carotidienne de MPTP. Dans ce modèle, une première étude reposant sur des injections intranigrale, intrastriatale ou ICV de GDNF après lésion ont prouvé l'efficacité du traitement au GDNF sur l'amélioration de trois signes cardinaux (bradykinésie, rigidité et instabilité posturale) (Gash et al., 1996; Costa et al., 2001). L'injection ICV a été la voie privilégiée, car la plus accessible en clinique (Gash et al., 1996; Miyoshi et al., 1997; Zhang et al., 1997) et a permis une réduction des réponses secondaires délétères liées à la prise de L-dopa telles que les dystonies et les dyskinésies, ainsi que la possibilité de diminuer les doses de traitement à la L-dopa (Miyoshi et al., 1997). Cependant il s'est révélé que les fortes doses nécessaires à l'efficacité thérapeutique du GDNF entraînaient des effets secondaires tels que la perte de poids, et plus rarement des mouvements de type dyskinétiques (Gash et al., 1996; Martin et al., 1996; Zhang et al., 1997). Ainsi, l'infusion ICV chronique de doses plus faibles a montré des résultats intéressants (Grondin et al., 2002), en particulier en terme de prévention des effets secondaires observés lors des études impliquant des injections ICV répétées (Gash et al., 1996). Une amélioration des symptômes a été obtenue, meilleure que celle obtenue avec des injections répétées. Un effet bénéfique sur les neurones de la SN, les fibres dopaminergiques et le métabolisme de la DA dans le striatum et le GP a par ailleurs été rapporté. Des résultats similaires ont été obtenus chez un singe traité par voie intrastriatale. Comme il a été relevé chez le rat, cette étude a mis en relief l'importance des fibres striatales résiduelles pour une récupération fonctionnelle par le GDNF.

De même que chez le rat, quelles que soient les voies d'administration choisies, les doses de GDNF utilisées dans ces études sont relativement élevées, la fenêtre d'efficacité se situant entre 10 et 1000 µg. L'étude de Grondin a permis de montrer que l'infusion ICV d'une dose minimale de 15 µg de GDNF par jour pendant quatre semaines était nécessaire pour obtenir une amélioration comportementale. D'un autre côté, une étude récente a montré que la distribution et la diffusion du GDNF était un critère plus important pour l'efficacité que la dose infusée (Gash et al., 2005).

III.1.2. Etudes chez l'homme

Basé sur les résultats prometteurs obtenus chez le rongeur et le singe, un premier essai clinique de phase I a été entrepris par Nutt et ses collègues (Nutt et al., 2003). Cet essai, testant l'infusion ICV de GDNF, n'a abouti à aucune amélioration des symptômes moteurs des patients et au contraire a révélé la survenue d'effets secondaires associés à la

localisation du GDNF dans le ventricule. La faible pénétration du GDNF dans les zones d'intérêt à partir du site d'administration serait responsable de ces résultats.

Par la suite, une étude de phase I a été réalisée par un groupe de Bristol et dans laquelle la protéine GDNF était infusée directement dans le putamen postero-dorsal (la zone sensorimotrice) de 5 patients parkinsoniens (Gill et al., 2003; Patel, 2004; Patel et al., 2005). L'infusion a été réalisée grâce à un cathéter relié à une pompe implantée dans la cavité abdominale (figure 19). Cette zone cérébrale a été choisie car elle est la plus sévèrement déplétée en DA. Aucun événement significativement délétère n'a été reporté au cours de cet essai et l'ensemble des effets secondaires apparus lors de l'infusion ventriculaire ont été évités. L'infusion chronique de GDNF a permis une amélioration significative des fonctions motrices chez tous les patients, une réduction de la durée et de la sévérité des périodes « off » et des dyskinésies ainsi qu'une augmentation correspondante de la durée des périodes « on ». Chez tous les patients, le taux d'amélioration des symptômes était maximal à trois mois puis se maintenait jusqu'à 24 mois. Du point de vue cellulaire, les analyses par tomographie à émission de positrons (PET) après injection de ¹⁸F-dopa montraient une augmentation de 16 à 28% du stockage de la DA au niveau de la SN et du putamen avec une recapture la plus importante au niveau de la zone d'infusion, indiquant un effet direct du GDNF sur la fonction dopaminergique. Par ailleurs, aucun déficit cognitif n'a été noté après le traitement. Enfin, le traitement a permis la correction de fonction telles que le goût ou l'odorat, et a permis de retrouver un fonctionnement sexuel normal chez les individus ayant une infusion de GDNF la plus forte. Cette étude est la preuve de principe de l'efficacité et de la sécurité de l'apport exogène de GDNF dans le putamen de patients parkinsoniens. Une analyse *post mortem* a révélé que ces effets bénéfiques étaient en particulier la résultante de la formation de collatérales dans le striatum (Love et al., 2005), ce qui constitue la première preuve importante de l'action du GDNF chez l'homme. Néanmoins, aucune donnée n'est disponible concernant l'action du GDNF sur la survie des neurones dopaminergiques. Bien que l'ensemble de ces résultats ait été confirmé un an après par une étude de phase I portant sur 10 patients (Slevin et al., 2005), l'interprétation des résultats de ces études cliniques est limitée par l'absence de groupe contrôle ayant reçu un placebo et par le faible nombre de patients participants.

Récemment, une étude de phase II à plus large panel et en double aveugle, dépassant ainsi les limites des précédentes, a été entreprise (Lang et al., 2006; Sherer et al., 2006). Contrairement aux premières études, cet essai n'a vu aucune amélioration significative des symptômes des patients traités en comparaison avec les patients ayant reçu le placebo, même si une augmentation de la recapture de la fluorodopa a été observée. En plus de cette absence d'effets bénéfiques, une toxicité éventuelle du GDNF a été observée, avec la production d'anticorps dirigés contre la protéine recombinante retrouvée chez 10% des

patients traités. Parallèlement, des lésions au niveau du cervelet ont été rapportées chez des singes traités avec des fortes doses de GDNF (Peck, 2005). Bien que chez l'homme aucune lésion de ce type n'ait été décelée après infusion (Chebrolu et al., 2006), ces éléments ont poussé Amgen, le sponsor de l'essai et le détenteur des « droits » du GDNF, à suspendre l'essai. Des réponses restent donc à apporter aux questions soulevées par cette étude pour s'assurer de l'efficacité et de la sûreté du GDNF chez l'homme.

Notons que la suspension de cet essai a provoqué une polémique au sein de la communauté scientifique et médicale, allant jusqu'à l'intention d'une action en justice contre Amgen pour avoir arrêté cet essai. Les plaignants, des patients ressentant une amélioration considérable après traitement par le GDNF, malgré l'absence d'amélioration des différents critères cliniques, accusent Amgen d'avoir « volé leur espoir »...

III.2. Transferts de gène thérapeutique

La maladie de Parkinson est depuis longtemps considérée comme une maladie « modèle » pour le traitement par le transfert de gène thérapeutique ou thérapie génique (TG). Même si les causes « proches » et « éloignées » de la maladie sont complexes, il en ressort néanmoins que la conséquence est une perte neuronale ciblée entraînant un déficit moléculaire ciblé. Permettre l'expression ciblée et localisée d'une molécule thérapeutique, de manière régulée et à long terme est la possibilité offerte par la TG.

III.2.1. Définition

La définition de la TG a connu quelques aménagements au cours de ces dernières années. Elle ne se réfère plus seulement au traitement d'une maladie par compensation d'un gène défectueux par l'apport d'une copie fonctionnelle de ce gène. La TG est maintenant définie comme le transfert d'un acide nucléique, ADN ou ARN, pour traiter ou prévenir une maladie (Miller, 1992; Mulligan, 1993; Crystal et al., 1995).

Dans le cas de la MP, deux types d'approches thérapeutiques sont explorés (figure 20):

(1) L'approche substitutive a pour but de pallier les conséquences de la mort des neurones de la SN. Une première stratégie vise ainsi à restaurer des taux striataux de DA efficaces par transfert des enzymes de biosynthèses de la DA. Cette stratégie a fait l'objet de nombreuses publications, émanant en particulier du laboratoire de Jacques Mallet, l'un des pionniers dans ce domaine (Horellou and Mallet, 1997; Kang et al., 2001). Une seconde stratégie vise à rétablir un tonus inhibiteur au niveau du NST *via* le transfert des gène GAD 65 et GAD 67 codant deux isoformes de l'enzyme limitante dans la biosynthèse du GABA

(Luo et al., 2002; Emborg et al., 2006) dans le NST. En 2003, le premier essai clinique ayant pour but de tester la biosécurité de cette approche a été réalisé.

(2) L'approche neuroprotectrice repose sur la protection des neurones de la SN et des fibres émergentes avant l'établissement de la lésion ou l'apparition des symptômes. Plusieurs stratégies ont été explorées. Outre l'approche reposant sur l'utilisation du GDNF, citons en particulier le transfert de gènes d'antioxydants comme SOD ou la GPx (Barkats et al., 2006; Ridet et al., 2006).

L'étape limitante en TG repose sur la capacité de transférer efficacement le gène thérapeutique dans le tissu cible. Deux voies sont possibles :

(1) L'infection directe du tissu cible. Elle peut être réalisée par l'utilisation d'un vecteur viral ou non viral (TG *in vivo*),

(2) La greffe de cellules génétiquement modifiées (TG *ex vivo*) par ces vecteurs.

Concernant la TG de neuroprotection utilisant le GDNF, les deux voies ont été étudiées. Dans les deux cas, il est indispensable de disposer de vecteurs efficaces, permettant une expression à long terme du GDNF, non immunogènes et dont l'utilisation est sûre chez l'homme.

III.2.2. Différents vecteurs utilisés pour le transfert de gène du GDNF

Le transfert du gène codant le GDNF dans le cerveau nécessite l'utilisation d'un véhicule performant permettant l'entrée dans les cellules cibles. L'utilisation des vecteurs viraux est à ce jour la plus puissante méthode de transfert de gène. Dans le cas de la MP, plusieurs vecteurs ont été utilisés, possédant chacun ses qualités et ses inconvénients propres.

a) vecteur dérivé de l'adénovirus

Les adénovirus (Ad) possèdent un très large **tropisme**, c'est à dire qu'ils peuvent infecter un large panel d'espèces et de cellules. Ils peuvent **transduire** (c'est à dire permettre l'expression d'un transgène après transfert du matériel génétique viral dans une cellule) les cellules en division et quiescentes, ce qui leur assure une utilisation intéressante en thérapie génique du système nerveux. En 1993, le laboratoire de Jacques Mallet montra pour la première fois qu'un vecteur adénoviral pouvait transduire les cellules du SNC après injection intracérébrale ou intraventriculaire (Le Gal La Salle et al., 1993).

Plus de 100 adénovirus différents ont été décrits et environ 50 sérotypes humains ont été mis en évidence. Tous les adénovirus contiennent un génome à ADN double brin linéaire d'environ 35 Kb de long. Ce génome est composé de plusieurs gènes immédiats (E1 à E4),

transcrits rapidement après infection : E1A est le premier transcrit et entraîne une cascade d'expression d'autres unités de transcription virale et cellulaire. Le produit du gène E1B interagit avec E1A et transforme les cellules infectées. E2 code les protéines impliquées dans la réplication virale. Le produit de E3 contribue à empêcher la réponse inflammatoire en empêchant les cellules infectées d'être reconnue par les cellules immunitaires de l'hôte. Enfin, E4 code des protéines participant à la réplication de l'ADN viral et l'activation des gènes tardifs de structure.

Les premiers vecteurs dérivés d'adénovirus furent produits par délétion de la région E1 afin d'empêcher la réplication virale. Une lignée de cellule 293 transcomplémentante a été obtenue par transformation des cellules avec la région E1 de l'Ad5 (Graham et al., 1977). Les vecteurs recombinants sont obtenus par recombinaison homologue entre le plasmide vecteur contenant le transgène et le génome adénoviral dans les cellules 293. Cette méthode de production, en plus d'être laborieuse et longue, présente l'inconvénient majeur de permettre la production d'adénovirus capables de réplication (RCA : replication competent adenovirus) induite par la réinsertion de la région E1 des 293 dans le génome vecteur lors de la phase d'amplification. Par ailleurs, d'autres limitations caractérisent ces vecteurs de première génération : une capacité de clonage faible et une forte réaction immunitaire dirigée contre les protéines virales après injection *in vivo*, entraînant la mort des cellules infectées et une expression à court terme du transgène.

Ainsi, une seconde génération de vecteurs fut mise au point, caractérisés par l'insertion d'une mutation thermosensible dans le gène E2, offrant une plus faible réaction immunitaire. Cependant, en plus d'un problème de réversibilité de la sensibilité thermique de la mutation, les résultats ne montraient pas une amélioration consistante (Fang et al., 1996).

Une troisième génération de vecteurs adénoviraux fut donc développée. Ces vecteurs sont caractérisés par la délétion des régions E1, E3 et E4. Une lignée transcomplémentante exprimant une région E4 minimale est utilisée pour leur production. Bien que ces vecteurs entraînent une réaction inflammatoire réduite et une stabilité de l'expression du transgène, la persistance de l'expression n'est pas améliorée dans tous les cas, la production de ces vecteurs reste laborieuse et la génération de RCA.

Enfin, la dernière génération de vecteurs adénoviraux est dépourvue de toutes les séquences codantes virales. Ces vecteurs dits « gutless » ou « dépendants d'un auxiliaire » ont été développés dès 1995 (Mitani et al., 1995) et plusieurs systèmes de production ont été élaborés depuis (Kochanek et al., 1996). La production est basée sur l'utilisation d'un virus auxiliaire apportant en *trans* toutes les fonctions nécessaires à la production et l'amplification des vecteurs recombinants défectifs. Bien que la production de ces vecteurs reste grandement laborieuse, la réponse immunitaire induite est considérablement réduite par rapport aux précédentes générations, résultant en une expression à plus long terme du

transgène dans plusieurs organes y compris le cerveau (Zou et al., 2000; Zou et al., 2001). Une réponse immunitaire transitoire induite par la capsid subsiste toutefois (Thomas et al., 2001). Enfin, la capacité de clonage est importante, jusqu'à 35 kb et les stocks produits peuvent contenir des quantités très réduites de RCA. Ces caractéristiques leur confèrent un avantage certain pour une utilisation en clinique, même si une méthode de production efficace, économique et reproductible reste à mettre au point dans cette optique.

Ces vecteurs possèdent l'avantage de rester sous forme épisomale dans le noyau des cellules hôtes, évitant une intégration délétère pouvant entraîner l'activation éventuelle d'un oncogène. Une autre caractéristique majeure de ces vecteurs repose sur leur capacité à être transportés de manière rétrograde *via* le système de transport axonal des neurones.

b) vecteur dérivé de l'adéno-associated virus

Les adeno-associated virus (AAV) sont des *parvovirus* humains dépendant de l'information génétique apportée par un virus auxiliaire, comme l'adénovirus ou le HSV, pour produire une infection efficace (Muzyczka, 1992). Il existe huit sérotypes viraux humains connus, chacun pouvant posséder des propriétés tropiques différentes. Le sérotype AAV-2 est le plus étudié et le plus utilisé en TG. Il n'existe pas de pathologies associées avec l'infection par les AAV, ce qui leur confère un avantage certain.

Le génome du virus consiste en deux gènes, chacun d'eux produisant plusieurs polypeptides : *rep*, nécessaire à la réplication du génome viral et *cap*, codant les protéines de structure (Muzyczka, 1992; Tal, 2000). Ces deux gènes sont flanqués par les ITRs viraux de 145 nucléotides. Chaque particule possède un simple brin + ou -. Le virus sauvage, en présence de *rep*, a une propension à s'intégrer dans une région spécifique du chromosome 19. Le vecteur dérivant de ce virus ne possède pas le gène *rep* ni *cap* et perd donc cette propriété. La délétion de ces gènes permet d'augmenter la capacité d'insertion des transgènes (jusqu'à 5 Kb). Les gènes *rep-cap* ainsi que les gènes nécessaires au virus auxiliaire sont apportés en *trans* lors de la production des vecteurs recombinants.

Les vecteurs AAV permettent un transfert de gène efficace dans les neurones et une grande stabilité de l'expression (Kaplitt et al., 1994). Cette transduction se réalise par expression épisomale du transgène et intégration chromosomale aléatoire (Miao et al., 1998; Duan et al., 1999) sous forme de concatémères.

La réaction immunitaire provoquée par ces vecteurs est faible et dans la plupart des cas ne conduit pas à l'élimination des cellules infectées, contrairement aux vecteurs adénoviraux. Plusieurs études ont montré l'absence de toxicité des vecteurs AAV après une injection (Chamberlin et al., 1998) ou plusieurs injections (Mastakov et al., 2002) dans le cerveau.

Néanmoins, l'administration répétée de ces vecteurs entraîne une forte réponse humorale dirigée contre la capsid, soit après une première injection du vecteur, soit chez des individus naturellement pré-immunisés. Ces études ont été réalisées avec le sérotype AAV-2, le plus répandu dans la population. Une manière de contourner ce problème serait d'utiliser un des autres sérotypes moins répandus (Grimm and Kay, 2003).

L'inconvénient majeur des AAV réside essentiellement dans leur faible possibilité d'empaquetage, limitée à 5Kb (Dong et al., 1996).

c) vecteur dérivé des lentivirus

→ Biologie des rétrovirus

Les lentivirus appartiennent à la famille des rétrovirus, composée de 7 membres. Les oncorétrovirus (de type murine leukaemia virus, MLV) et les lentivirus (tels que le virus de l'immunodéficience humaine HIV) sont les plus utilisés dans le cadre de vectorisation.

Les rétrovirus sont des particules enveloppées de 100 nm de diamètre présentant un noyau interne (capsid) protégeant un génome composé de deux molécules d'ARN (figure 23). Le cycle de réplication virale implique (1) l'absorption des virions *via* des récepteurs spécifiques et la fusion avec la membrane cellulaire, (2) la transcription inverse, aboutissant à la formation d'un ADN double brin linéaire (provirus) et (3) l'intégration du provirus dans le génome hôte (figure 24).

Le brin (+) d'ARN, de 7 à 12 kb, est composé de deux longues répétitions terminales (LTR, long terminal repeats) entourant trois gènes et plusieurs éléments agissant en *cis*, impliqués dans la réplication, le transport et l'encapsidation. Un premier gène, *gag*, code pour la matrice, la capsid et les protéines de la nucléocapsid. Le gène *pol* code la rétrotranscriptase et l'intégrase. Enfin, le gène *env* code l'enveloppe, glycoprotéine présente à la surface des virions. Une séquence signal d'encapsidation ψ assure l'empaquetage efficace des ARN rétroviraux dans la capsid. Les rétrovirus plus complexes comme les lentivirus possèdent par ailleurs des gènes accessoires (*vpr*, *vip*, *vpu*...) importants pour la l'infection virale et la pathogénicité. Ils contiennent aussi des protéines régulatrices telles que *tat* et *rev*, exerçant un contrôle de l'expression aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Les LTR sont essentiels à la rétro-transcription, l'intégration et la réplication (figure 25).

→ du virus au vecteur

Les premiers vecteurs rétroviraux développés dérivent des MLV, et furent produits suivant une méthode simple (Danos and Mulligan, 1988). Le génome proviral est cloné dans un plasmide et les gènes *gag*, *pol*, et *env* sont remplacés par le transgène. Les particules

recombinantes sont obtenues par co-transfection de ce plasmide avec un plasmide transcomplémentant contenant les gènes de structure. Cependant, ces vecteurs sont peu destinés à une application dans le SNC. En effet, leur provirus ne sont pas capables de franchir la membrane nucléaire pour s'intégrer, ce qui les empêche de transduire des cellules post-mitotiques.

En revanche, les lentivirus ont la particularité de transduire des cellules quiescentes, ce qui les rend fortement attractifs pour une utilisation dans le SNC. Le développement de vecteurs lentiviraux efficaces a été retardé par des problèmes de production : basé sur le système utilisé pour produire les vecteur dérivés des MLV, les premiers vecteurs dérivés du VIH-1 possédaient des titres trop faibles pour des applications consistantes (Page et al., 1990; Poznansky et al., 1991). L'avancée est venue du remplacement du gène *env* du VIH par l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), permettant d'augmenter la stabilité des particules lors de l'ultracentrifugation et ainsi d'obtenir des stocks avec des titres élevés (Akkina et al., 1996; Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b) (figure 26). Ce pseudotypage par VSV-G permet en outre d'augmenter le panel de cellules et de tissus pouvant être transduits par ces vecteurs, et a permis une transduction particulièrement efficace des cellules du SNC (Naldini et al., 1996b).

→ bio-sécurité des vecteurs lentiviraux

L'utilisation des lentivirus présentant de grands risques pathogéniques, la bio-sécurité des vecteurs lentiviraux doit être fortement optimisée. Grâce à la connaissance des vecteurs dérivés des MLV, des améliorations ont été rapidement apportées aux vecteurs lentiviraux pour répondre aux problèmes de sécurité. Concernant la phase de production des vecteurs lentiviraux, basée comme pour les vecteurs dérivés des MLV sur des co-transfections transitoires, les fonctions *trans* sont apportées par trois, voire quatre plasmides différents, ce qui permet de réduire drastiquement les risques de génération de particules capables de répliquer. De plus, plusieurs lignées cellulaires ont été générées afin de faciliter et sécuriser la production (Dull et al., 1998; Kaul et al., 1998; Kafri et al., 1999; Xu et al., 2001). Enfin, quatre gènes accessoires ont été délétés du plasmide d'emballage, sans perte d'efficacité de transduction (Zufferey et al., 1997). Ainsi, il est pratiquement impossible d'obtenir des particules sauvages lors de la production.

Le génome viral contenant le transgène a subi de même des modifications afin d'optimiser la biosécurité. Une première modification touche les LTR. Ceux-ci contiennent des enhancers et possèdent des fonctions promotrices, pouvant activer à distance des gènes cellulaires ou perturber l'expression de la cassette interne. Des vecteurs possédant une délétion dans la région régulatrice U3 des LTRs ont été développés. Les résultats ont montré de plus une expression améliorée après injection dans le cerveau (Miyoshi et al.,

1998; Zufferey et al., 1998; Iwakuma et al., 1999). Par ailleurs, afin d'éviter le « sauvetage » des génomes de vecteur par des rétrovirus endogènes, une coupure conditionnelle, basée sur l'utilisation du système Cre/LoxP, de la séquence d'encapsulation ψ a été développée (Salmon et al., 2000).

Ainsi, les vecteurs lentiviraux, bien que dérivés de virus hautement pathogènes, possèdent une bio-sécurité très élevée ce qui fait d'eux un outil adéquat à l'utilisation en clinique.

→ Optimisation de l'expression du transgène

Contrairement aux vecteurs MLV, les vecteurs lentiviraux permettent une expression à long-terme du transgène dans de nombreux tissus, en particulier dans le SNC (Blomer et al., 1997; Kafri et al., 1997; Lotery et al., 2002). Cette persistance de l'expression pourrait être due à l'absence de réactions immunitaire et inflammatoire induites par les vecteurs lentiviraux, ce qui permet de plus de réaliser des injections répétées chez le même animal (Kafri et al., 1997; Abordo-Adesida et al., 2005), point crucial pour une application clinique.

L'expression du transgène a été optimisée par l'utilisation de différents promoteurs tels que le promoteur fort du cytomegalovirus (pCMV) ou par l'adjonction de l'élément de régulation post-transcriptionnelle de virus de l'hépatite de la marmotte (WPRE : woodchuck posttranscriptional regulatory element) permettant d'augmenter l'expression par accumulation des transcrits au niveau du cytoplasme (Zufferey et al., 1999; Ramezani et al., 2000; Brun et al., 2003). Par ailleurs, l'efficacité de transduction des premiers vecteurs lentiviraux était limitée dans la plupart des tissus par des fonctions de transport nucléaire du provirus faible. L'adjonction de la séquence *cis* du flap central, délétée dans les premières générations de vecteur lentiviraux, a permis de rétablir un niveau normal de transport nucléaire du génome viral et, d'améliorer ainsi l'efficacité de transduction d'un facteur 2 à 10 en particulier dans le SNC (Follenzi et al., 2000; Zennou et al., 2000; Zennou et al., 2001).

→ Pseudotypage des vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux possèdent l'avantage certain de pouvoir être modifiés aisément au niveau de leur enveloppe. Ce pseudotypage permet d'augmenter grandement l'étendue de leur tropisme ou au contraire de le restreindre. Ainsi, l'utilisation de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) à la place de gp120, l'enveloppe du VIH sauvage, a permis de passer d'une transduction spécifique des cellules T8 à une grande variété de cellules et de tissus (Naldini et al., 1996a). Les vecteurs lentiviraux pseudotypés par l'enveloppe VSV semblent transduire majoritairement les neurones dans le SNC (Naldini et al., 1996b ; Blomer et al., 1997 ; Bensadoun et al., 2000) que le promoteur utilisé soit PGK ou CMV (de Almeida et al., 2001; de Almeida et al., 2002). Cependant, ces résultats concernant la

transduction des neurones avec le promoteur CMV sont remis en question (Georgievska et al., 2002b et notre travail).

Comme tous les vecteurs enveloppés, les vecteurs lentiviraux peuvent être pseudotypés en utilisant de nombreuses enveloppes. Pour des applications touchant le SNC, il se révèle que les enveloppes dérivées de lyssavirus (de la famille de la rage) sont les plus intéressantes, de par leur tropisme naturel à orientation neuronale (Mochizuki et al., 1998; Mitrophanous et al., 1999; Reiser, 2000; Auricchio et al., 2001; Desmaris et al., 2001). Ainsi, le pseudotypage d'un lentivecteur dérivé du virus de l'anémie infectieuse du cheval (EIAV) par l'enveloppe du virus de la rage a permis l'obtention d'un vecteur à tropisme neuronal capable d'être transporté de manière rétrograde (Mazarakis et al., 2001). Cependant, il semble que le pseudotypage des lentivecteurs ne dérivant pas de l'EIAV par cette enveloppe ne leur confère pas cette propriété de transport (Sarkis et al., données non publiées).

L'utilisation de l'enveloppe du lyssavirus Mokola (Mok) a été l'objet d'une attention particulière. Le pseudotypage de vecteurs lentiviraux avec cette enveloppe a permis un gain significatif de l'efficacité de transduction comparée au pseudotypage par VSV ou d'autres enveloppes comme la rage ou MLV (Watson et al., 2002; Steffens et al., 2004). Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant le tropisme dans le cadre de transfert de gène dans le SNC (Auricchio et al., 2001; Desmaris et al., 2001; Duisit et al., 2002; Bemelmans et al., 2005). En effet, Desmaris et ses collègues ont obtenu un ciblage spécifiquement neuronal de l'expression du transgène dans le striatum de rat alors que des études réalisées dans la rétine de rat par Duisit et Bemelmans (Duisit et al., 2002; Bemelmans et al., 2005) montrent une absence de transduction des photorecepteurs et une forte transduction de l'épithélium pigmentaire de la rétine. Ainsi, il semble que plusieurs phénomènes puissent influencer sur le type de cellules transduites : l'espèce animale, le zone cérébrale injectée mais aussi la dose de vecteur utilisée, le protocole de production et la procédure d'injection, ce qui rend la comparaison des résultats peu aisée.

En conclusion, plusieurs vecteurs viraux sont disponibles pour transférer efficacement un gène thérapeutique dans le SNC. Dans le cas du traitement expérimental de la MP par la TG et la mise au point de cette approche, les vecteurs adénoviraux, AAV et lentiviraux ont été utilisés pour transférer le GDNF dans cerveau d'animaux modèles de la MP. Ceci a été envisagé soit par TG *ex vivo* (greffe de cellules génétiquement modifiées) ou par TG *in vivo* (transfert direct de vecteurs codant le GDNF).

III.2.3. Greffes de cellules génétiquement modifiées pour exprimer le GDNF

La greffe de cellules génétiquement modifiées pour libérer le GDNF, assimilables à des minis pompes physiologiques, est une stratégie intéressante qui a fait l'objet de nombreuses études. Les avantages de cette technique reposent sur la possibilité de (1) retirer (dans le cas de capsules) ou de détruire les cellules (par incorporation d'un gène Thymidine Kinase par exemple) en cas de problème, (2) disposer d'une grande quantité de matériels après amplification, (3) contrôler précisément la libération du facteur et (4) offrir un contrôle de la biosécurité des cellules greffées. Dès 1995, la greffe de cellules encapsulées dans un modèle de lésion à la 6-OHDA chez le rat (Lindner et al., 1995) a été la preuve de principe de l'efficacité de cette approche dans le traitement expérimental de la MP. Cette voie de recherche a été maintenue mais a souvent donné des résultats assez faibles en terme de protection (Sajadi et al., 2006).

Le potentiel thérapeutique de la greffe de différents types cellulaires exprimant le GDNF a été testé dans des modèles de rongeurs de la MP: astrocytes primaires de rat (Cunningham and Su, 2002), cellules souches neurales (Akerud et al., 2001), fibroblastes primaires de rat (Duan et al., 2005) et progéniteurs neuraux humains (Behrstock et al., 2006). Cependant, bien que les cellules semblent s'intégrer dans le parenchyme cérébral et qu'elles synthétisent du GDNF, les résultats obtenus ne sont pas à la hauteur des espérances en termes de protection de la voie nigrostriée et de la récupération fonctionnelle. Ceci pourrait être dû au fait que (i) les cellules migrent peu et que le GDNF reste au niveau du site de greffe et (ii) la synthèse de GDNF est insuffisante pour obtenir un effet thérapeutique.

III.2.4. Injection directe de vecteurs codant le GDNF

En 1997, les premiers transferts du gène du GDNF furent réalisés en utilisant le vecteur Ad de 1^{ère} génération dans un modèle de rat lésé à la 6-OHDA (Bilang-Bleuel et al., 1997; Choi-Lundberg et al., 1997) ou un modèle de souris lésée au MPTP (Kojima et al., 1997). Chez le rat lésé, une protection des neurones de la SN a été obtenue après injection intrastriatale (Bilang-Bleuel et al., 1997) ou intranigrale (Choi-Lundberg et al., 1997) du vecteur. Cependant, seule l'injection intrastriatale du vecteur a permis la protection des fibres TH striatale ainsi que l'obtention d'une récupération fonctionnelle. Cette différence de résultats selon la cible visée a été confirmée par Bronwen Connor et ses collègues (Connor et al., 1999) chez le rat âgé et par les travaux reposant sur l'injection de la protéine purifiée (Kirik et al., 2000a). Mais, l'utilisation du vecteur adénoviral est limitée par la faible persistance de l'expression du GDNF et par la forte réaction inflammatoire induite. L'utilisation d'un vecteur adénoviral de 3^{ème} génération a pu dépasser en partie ces limites

avec une expression atteignant trois mois et une réaction immunitaire amoindrie (Do Thi et al., 2004).

L'émergence des vecteurs dérivés de l'AAV et du VIH-1 a permis d'atteindre des niveaux de sécurité et d'efficacité plus proches des exigences de l'application clinique. L'injection d'un vecteur AAV codant le GDNF dans des modèles de rat, avant la lésion (Mandel et al., 1997) ou 1 semaine et 4 semaines après la lésion (Mandel et al., 1999; Wang et al., 2002), a montré son efficacité dans la protection de la voie nigrostriée et dans la récupération fonctionnelle. Comme pour les vecteurs dérivés de l'Ad et l'injection de la protéine recombinante, seule l'injection intrastriatale de vecteur AAV codant le GDNF est efficace pour la protection des terminaisons DA striatales, indispensable pour l'obtention d'une récupération fonctionnelle (Kirik et al., 2000b). Ces résultats prometteurs ont été confirmés chez le primate non humain (Eslamboli et al., 2005).

L'utilisation plus récente du vecteur dérivé du VIH-1 pseudotypé par VSV a permis de disposer d'un second vecteur efficace, non immunogène et dont l'utilisation est plus souple pour une application clinique que celle du vecteur AAV. Le transfert du gène codant le GDNF a été réalisé chez le rongeur (Bensadoun et al., 2000; Georgievska et al., 2002b) et chez le primate non humain (Kordower et al., 2000; Palfi et al., 2002) et s'est de même révélé efficace dans la protection de la voie nigrostriée et l'obtention d'un effet comportemental bénéfique. L'efficacité du transfert du gène du GDNF par un vecteur dérivé de l'EIAV a été aussi démontré (Azzouz et al., 2004).

L'utilisation des vecteurs lentiviraux et dérivés de l'AAV a permis d'obtenir une synthèse de GDNF persistante, jusqu'à un an. Le niveau de synthèse est de l'ordre du nanogramme de GDNF par mg de tissu. Kirik et ses collègues ont démontré un effet thérapeutique du GDNF à une concentration chronique de 0,2 ng par mg dans le striatum de rat soit environ 6 ng par striatum (Kirik et al., 2000a). Cette dose est beaucoup plus faible que celle utilisée pour l'infusion ou l'injection directe, pour lesquelles la dose est de l'ordre du microgramme. Ceci suggère que les effets secondaires et la toxicité liés à la concentration du GDNF pourraient être prévenus.

Dispersion de la protéine par transport axonal antérograde et sprouting ectopique

L'injection intrastriatale du GDNF induit la formation de collatérales dans le striatum et dans le GP (Rosenblad et al., 1999 ; Kirik et al., 2000 ; Rosenblad et al., 2000). De la même manière, l'injection intranigrale entraîne la formation de collatérales dans la SN, et les parties adjacentes du thalamus ventral (Bowenkamp et al., 1995; Winkler et al., 1996; Tseng et al.,

1997; Kirik et al., 2000a; Kirik et al., 2000b). La formation de collatérales dans des structures possédant des terminaisons DA est préoccupante en ce qu'elle pourrait être délétère pour la récupération fonctionnelle. Alors que la récupération fonctionnelle ne semble pas empêchée par un sprouting limité dans le GP (Kirik et al., 2000a, 2000b), des effets fonctionnels négatifs ont été retrouvés chez des animaux avec un sprouting excessif au niveau de la SN ou à son entourage (Kirik et al., 2000a, 2000b). Dans ces cas, l'injection du GDNF ou d'un vecteur AAV codant le GDNF a été effectuée dans la SN. Dans le travail rapporté par Deniz Kirik (Kirik et al., 2000a), la surexpression du GDNF dans la SN avait un effet fonctionnel négatif, non seulement quand le vecteur AAV était injecté dans la SN mais aussi lorsque il était co-injecté dans la SN et le striatum, démontrant que le sprouting au niveau de la SN est délétère. L'injection dans le striatum seule permet d'obtenir une protection des fibres du striatum et en conséquence une récupération fonctionnelle.

Par ailleurs, dans le cas d'injection intrastriatale de vecteur codant le GDNF, un transport antérograde du GDNF a été mis en évidence du striatum vers ses zones de projection telles que la SN et le EP (Kirik et al., 2000b; Georgievska et al., 2002a; Georgievska et al., 2002b). Dans l'étude menée par Georgievska et ses collègues (Georgievska et al., 2002a), le transport de GDNF du striatum à la SN aboutit à un dosage de 0,2 ng de GDNF par mg de tissu dans la SN, quantité suffisante pour obtenir un effet biologique. La libération du GDNF dans ces structures induit la formation aberrante de sprouting, pouvant expliquer l'absence de récupération fonctionnelle dans les tests de motricité non induits par des drogues (Georgievska et al., 2002a). Cette dispersion serait due à la transduction préférentielle des neurones par les vecteurs AAV et lentiviraux utilisés.

Toutes ces données indiquent que la génération de sprouting au niveau des zones de projections striatales, en particulier le SN et le NEP, est délétère pour la récupération fonctionnelle, et que l'utilisation de vecteurs à tropisme neuronal semble responsable de la dispersion de la protéine dans ces structures.

Le ciblage de l'expression du GDNF aux astrocytes pourrait constituer une alternative intéressante afin de restreindre la libération du facteur au striatum seul.

IV. LES ASTROCYTES

IV.1. Description

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC. Ils sont regroupés en deux catégories principales basées sur leur morphologie et leur localisation. On distingue les astrocytes fibreux, retrouvés principalement dans la substance blanche et possédant une morphologie de type étoilée, et les astrocytes protoplasmiques, présents essentiellement dans la substance grise et enveloppant les fibres neuronales. A ces deux catégories s'ajoute une troisième catégorie qui rassemble les cellules gliales de Bergmann, retrouvées dans la couche de Purkinje du cortex cérébelleux. Il existe toutefois de nombreuses exceptions à cette classification. Ainsi, une seconde classification a été établie en fonction de leur origine développementale.

L'origine des astrocytes n'est pas totalement élucidée. Une première théorie suggère que les astrocytes dérivent de la zone ventriculaire et sous-ventriculaire en développement à partir de la glie radiaire. Ces cellules, qui jouent un rôle dans le guidage des neuroblastes et des progéniteurs multipotents, se différencieraient en astrocytes matures une fois cette fonction achevée. Les astrocytes répondant à cette description sont nommés astrocytes de type I (Gee and Keller, 2005). Une seconde théorie sous tend que les astrocytes proviennent directement de la zone ventriculaire ou sous ventriculaire sans différenciation de la glie radiaire. Ils dériveraient en effet directement de progéniteurs spécialisés présents dans ces zones. Les astrocytes issus de ces progéniteurs sont nommés astrocytes de type II (Gee and Keller, 2005).

IV.2. Fonctions des astrocytes

De nombreuses fonctions ont été attribuées aux astrocytes. Celles-ci incluent le support cellulaire lors du développement du SNC, l'homéostasie ionique, la re-capture des neurotransmetteurs, la libération de facteurs de croissance et de survie des neurones, ainsi que la formation de la BHE. De plus, les astrocytes sont des régulateurs importants de l'immunité dans le SNC. Par ailleurs, outre le support trophique et métabolique des neurones, des données récentes ont démontré une fonction de modulateur de la transmission synaptique, par libération de neuromédiateurs dans la fente synaptique (Volterra and Meldolesi, 2005). Dans le cas de lésion du SNC, les astrocytes prolifèrent, s'hypertrophient et synthétisent de nouvelles protéines (Ridet et al., 1997). Ces astrocytes « réactifs » ainsi constituent une barrière physique et biochimique isolant le site de la lésion du reste du tissu sain et forment une cicatrice gliale. La synthèse protéique augmente et

certaines protéines sont synthétisées spécifiquement lors de cet état activé. Ainsi, les protéines glial fibrillary astrocytic protein (GFAP), vimentine et S-100 β sont les marqueurs les plus couramment utilisés pour identifier les astrocytes dans le SNC lésé mais aussi intact (Ridet et al., 1997).

IV.3. Ciblage astrocytaire par les vecteurs viraux

IV.3.1. Vecteurs à tropisme astrocytaire

Les différents vecteurs viraux utilisés depuis quinze ans pour le transfert de gène dans le SNC possèdent un tropisme plus ou moins préférentiel pour les astrocytes, sans qu'aucun de ces vecteurs ne les transduise exclusivement. Les lentivecteurs couramment utilisés, pourvus de l'enveloppe VSV et du promoteur CMV, transduisent efficacement les cellules gliales sans pour autant induire une forte restriction de l'expression. En effet, la transduction gliale est de l'ordre de 20 à 55% dans le cerveau de souris (Baekelandt et al., 2002). Pour ce qui concerne les vecteurs AAV, un tropisme astrocytaire plus ou moins fort peut être observé en fonction du sérotype utilisé. L'AAV de type 4 permet de transduire efficacement les cellules épendymaires et les astrocytes de la zone sous ventriculaire (Liu et al., 2005). Cependant, le tropisme des vecteurs AAV étant fortement dépendant de la zone cérébrale ciblée, il n'est pas certain que ces AAV de type 4 transduisent majoritairement les astrocytes dans le striatum.

L'utilisation d'un promoteur spécifique des astrocytes tel que pGFAP permet de restreindre l'expression aux astrocytes de manière plus forte, lorsqu'utilisé avec un vecteur lentiviral (Jakobsson et al., 2003), adénoviral (Navarro et al., ;Do Thi et al., 2004), baculoviral (Wang and Wang, 2006). Cependant, une fuite neuronale plus ou moins importante est constatée selon le vecteur, en particulier dans un contexte lentiviral. Celle-ci serait liée en particulier à la fonctionnalité du pGFAP dans les neurones (Su et al., 2004).

IV.3.2. Restriction astrocytaire de l'expression du GDNF

Deux études, parues en 2004, rapportent la restriction de l'expression du GDNF aux astrocytes. Dans les deux cas, le GDNF était placé sous contrôle du promoteur GFAP et transféré soit *via* un vecteur lentiviral pseudotypé par VSV (Jakobsson et al., 2004) soit *via* un vecteur adénoviral de 3^{ème} génération (Do Thi et al., 2004). Le travail de Jakobsson est basé sur de précédents résultats obtenus avec un vecteur lentiviral codant la GFP placée sous contrôle du promoteur GFAP qui montraient une forte transduction des astrocytes (Jakobsson et al., 2003). Le transfert intrastriatal du GDNF permet une synthèse de GDNF,

augmentée d'un facteur 3 dans le cas d'une lésion à la 6-OHDA. Cette augmentation est due à l'activation des astrocytes induite par la lésion, activant ainsi le promoteur GFAP. Le dosage de GDNF au niveau de la SN révèle la présence de GDNF dans cette structure, indiquant que des neurones striataux sont transduits. Dans cette structure, le GDNF est retrouvé à des niveaux proches de la valeur expérimentale à laquelle la protéine exerce son action, suggérant une fuite importante du promoteur. L'impact de la dispersion de la protéine dans la SN n'a pas été étudié, de même que le transport du GDNF dans le GP et le NEP. Enfin, l'étude de l'expression à long terme du GDNF par ces vecteurs n'a été réalisée.

La seconde étude, publiée par le LGN, rapporte la restriction de l'expression du GDNF aux astrocytes striataux en plaçant le GDNF sous contrôle du pGFAP dans un vecteur Ad de 3^{ème} génération (Do Thi et al., 2004). Le transfert du gène inostriatral permet une expression efficace du GDNF (3,5 ng par mg de tissu) mais ne se maintient que pendant 6 semaines. Au-delà, on observe une diminution de l'expression qui tiendrait à la réaction inflammatoire produite par le vecteur (entraînant la mort des cellules transduites) et/ou la régulation négative du promoteur GFAP. Par ailleurs, le dosage du GDNF dans la SN indique une détection de GDNF (environ 0.03 ng par mg) proche du bruit de fond et nettement inférieur à la dose expérimentale à laquelle le GDNF est actif (Kirik et al., 2000a). Néanmoins, comme pour l'étude précédente, la dispersion fine du GDNF n'a pas été étudiée, en particulier dans le NEP et la SNr.

Récemment, un vecteur baculoviral pourvu d'un pGFAP a été construit et son injection intracérébrale a montré une transduction importante des astrocytes (Wang and Wang, 2006). Cependant, l'expression induite par ce vecteur est faible et ne perdure pas (Sarkis et al., 2000) ce qui nécessite de nombreuses optimisations pour rendre ce vecteur efficace pour une utilisation clinique.

BUT DE L'ETUDE

I. Problème scientifique

Comme nous venons de le voir, l'approche neuroprotectrice utilisant le GDNF est une thérapie prometteuse, qui reste cependant confrontée à certaines limites, liées en particulier au mode d'administration du facteur. L'administration par transfert de gène est une méthode prometteuse et puissante mais la transduction majoritaire des neurones striataux liée à l'utilisation des vecteurs adénoviraux, AAV et lentiviraux induit une dispersion délétère de la protéine dans les zones de projection striatale. Il est donc crucial, afin de disposer d'une stratégie de transfert de gène du GDNF sûre et efficace chez l'homme, de restreindre la libération du GDNF au striatum.

II. Objectif du travail

L'objectif du travail qui m'a été confié est d'étudier les effets du cibage astrocytaire de l'expression du GDNF par des vecteurs lentiviraux sur la dispersion de la protéine et sur la protection de la voie nigrostriée.

Une première partie du travail traite de la caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés par l'enveloppe du vecteur Mokola (ou pseudotypes Mokola). Le tropisme de ces vecteurs après injection dans le cerveau de différentes espèces a été étudié. En parallèle, une étude de la réponse immunitaire après injections multiples de ces vecteurs ou après injection chez des souris préimmunisées a été effectuée.

Dans une seconde partie du travail, les pseudotypes Mokola ayant un tropisme astrocytaire fort ont été utilisés pour transférer le GDNF dans le cerveau de modèles de rat de la MP, dans le cadre d'une TG expérimentale.

RESULTATS

Article 1: pseudotypage des vecteurs dérivés du VIH-1 par l'enveloppe du virus de Mokola : réaction immunitaire et dépendance à l'espèce du tropisme

Pseudotyping of HIV-1 Based Vectors with The Mokola Virus Envelope : Immunoreaction and Species Dependant Tropism.

M. Brizard[#], Y. He[#], H. Mammeri[#], C. Jan, A. Bemelmans, C. Serguera, N. Dufour, P. Colin, N. Tordo, P. Charneau, C. Tuffereau, P. Hantraye, N. Deglon, J. Mallet and C. Sarkis.

[#] ces auteurs ont contribué au travail à part égale

En préparation

I. Contexte scientifique

L'efficacité des vecteurs lentiviraux pour la transduction de nombreux types cellulaires a pu être réalisée grâce à leur pseudotypage par l'enveloppe VSV-G (pseudotype VSV). En effet, cette enveloppe permet d'une part l'entrée des virions dans de très nombreux types cellulaires, et d'autre part la concentration à très haut titre des stocks viraux par ultracentrifugation. Cependant, le développement de vecteur sûr et efficace pour la TG passe aussi par la disposition de vecteur ciblant spécifiquement l'expression à un type cellulaire précis. Ainsi, dans le but d'obtenir des vecteurs ciblant préférentiellement les neurones ou les astrocytes, le développement de nouveaux pseudotypes de vecteurs lentiviraux fut entrepris, en collaboration avec Christine Tuffereau, Pierre Charneau et Noël Tordo. Différents pseudotypes furent alors produits en utilisant l'enveloppe du virus de la rage (souche PV) ou du virus Mokola (autre virus rabique de type lyssavirus). Tout comme VSV-G, ces enveloppes ne sont pas labiles à la centrifugation et permettent d'obtenir des stocks à hauts titres.

Nous nous sommes concentrés sur l'étude des propriétés des vecteurs pseudotypés par l'enveloppe du virus de Mokola (pseudotype Mokola). Les caractéristiques du pseudotype Mokola ont été ainsi étudiées *in vitro* et *in vivo* en terme d'expression, de tropisme et de réaction immunitaire. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le pseudotype VSV. Mon implication a concerné l'étude du tropisme *in vivo* des différents pseudotypes chez le rat et la souris.

II. Résultats

II.1. Production et caractérisation des stocks de pseudotypes VSV et Mok.

La stratégie de production des différents pseudotypes est très simple : elle est basée sur la cotransfection dans des cellules 293T de trois plasmides : un plasmide codant l'enveloppe désirée, le plasmide de transcomplémentation et le plasmide vecteur. Ces deux derniers sont identiques quel que soient le pseudotype désiré. La quantification de la protéine G par vecteur a été réalisée par western blot quantitatif (Fig. 1) : les pseudotypes VSV contiennent au moins dix fois plus de protéine G que les vecteurs pseudotypés par Mok (table 2).

II.2. Transduction in vitro de cellules nerveuses.

Nous avons vérifié si les pseudotypes produits étaient capables de transduire *in vitro* sept lignées nerveuses différentes : CHP212 et SKNSH (neuroblastomes humains), CathA et CathB (neuroblastomes catécholaminergiques centraux de souris), Path1 et Path2 (neuroblastomes catécholaminergiques périphériques de souris) et PC12 (phéochromocytome de rat) (Fig. 2). Des vecteurs Mok ou VSV trip-CMV-GFP (20 ng de p24) ont été utilisés pour ces expériences. Les deux pseudotypes transduisent les cellules avec une haute efficacité. Cependant, le profil d'expression est différent selon le pseudotype (fig. 2), ce qui sous tend que les deux pseudotypes se fixent sur des récepteurs différents, différenciellement exprimés selon le type cellulaire.

Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de l'acidification des endosomes inhibe la transduction de cellules CHP212 avec les deux pseudotypes (fig. 3), suggérant que le mécanisme d'entrée des pseudotypes passe par la voie des endosomes/lysosomes

II.3. Le tropisme des vecteurs Mok dépend de l'espèce

Le profil d'expression et l'efficacité de transduction des pseudotypes Mokola *in vivo* ont été étudiés après injection stéréotaxique dans le striatum de souris, de rat et de primate non humain *macaca fascicularis*. Ces caractéristiques ont été comparées à celles du pseudotype VSV.

Chez la souris, l'injection du pseudotype Mok permettant l'expression de la GFP sous contrôle de pPGK ou pCMV permet l'expression de la protéine dans le striatum (Fig. 4). L'expression de la GFP est plus intense avec le pCMV que le pPGK, pour la même quantité de particules physiques injectée. Le double marquage immunohistologique GFP et NeuN (spécifique des neurones) ou GFAP (spécifique des astrocytes) montre une restriction totale

de l'expression de la GFP aux astrocytes striataux que le promoteur utilisé soit pCMV (Fig. 5 C-D) ou pPGK (Fig. 6C-D). Pour vérifier que ces résultats ne sont pas dépendants de la zone injectée, les vecteurs ont été injectés dans l'hippocampe des souris (Fig. 6E). La transduction astrocytaire totale dans cette zone démontre que les pseudotypes Mok permettent une transduction astrocytaire exclusive dans différentes régions du cerveau de souris. Concernant les pseudotypes VSV, la transduction par ces vecteurs possède une efficacité comparable aux pseudotypes Mok. En revanche, le ciblage de l'expression diffère selon le promoteur utilisé. Ainsi, le pCMV dirige l'expression vers une majorité d'astrocytes (Fig. 5A-B) alors que le pPGK dirige l'expression vers une majorité de neurones (Fig. 5A-B). Dans les deux cas, la restriction à chaque type cellulaire de l'expression n'est que partielle, le rapport astrocytes/neurones transduits étant respectivement de l'ordre de 70/30 et 30/70.

Chez le rat, l'injection du pseudotype Mok permet une expression de GFP plus forte sous contrôle de pCMV que sous le contrôle de pPGK. Contrairement aux observations faites chez la souris, la transduction obtenue avec les pseudotypes Mok dépend du promoteur utilisé : ainsi, une transduction quasi exclusive des neurones est obtenue avec le pPGK (Fig. 7C-D) alors qu'une transduction préférentielle des astrocytes est obtenue avec pCMV (Fig. 7 A-B).

Chez le singe *macaca fascicularis*, des résultats intermédiaires entre ceux obtenus chez la souris et le rat ont été obtenus en ce qui concerne la transduction par les pseudotypes Mok. En effet, une expression astrocytaire quasi exclusive a été obtenue avec le pCMV alors qu'une expression ubiquitaire est retrouvée avec le pPGK (Fig. 8). En ce qui concerne le pseudotype VSV, l'injection intracérébrale du pseudotype VSV-trip-PGK-GFP-W mène à une synthèse majoritairement neuronale générant un transport antérograde de la GFP du striatum vers le GP et la SN (Fig. 9).

Ces données indiquent que le tropisme des pseudotypes Mok varie selon l'espèce et qu'il est possible d'obtenir une restriction astrocytaire de l'expression dans tous les cas en utilisant le pCMV.

II.4. Réactions immunitaires induites par les pseudotypes Mok

Nous avons ensuite étudié la réponse immunitaire cellulaire et humorale induite après une ou plusieurs injections du pseudotype Mokola dans le cerveau de souris (Fig. 10). Un premier lot de souris a reçu une injection de vecteur Mok-trip-CMV-GFP (20 ng de p24) dans le striatum gauche de souris (groupe Mok). Un second lot a reçu une même injection, suivie d'une injection du même vecteur dans le striatum droit, un mois après (groupe Mok/Mok). Enfin, un troisième groupe a reçu une première, seconde injection, puis une troisième injection du même vecteur au niveau de la SN gauche, un mois après la seconde injection

(groupe Mok/Mok/Mok). Chaque groupe d'animaux a été sacrifié une semaine après la dernière injection pour effectuer des études histochemiques et pour doser les anticorps induits par les injections. Comme contrôle, un protocole identique a été réalisé avec des injections de PBS et de pseudotype VSV-trip-CMV-GFP.

Les résultats montrent que l'injection répétée du pseudotype Mok permet d'obtenir une transduction efficace des cellules aboutissant à une expression soutenue de la GFP à tous les sites d'injections, sans perte avec la répétition des injections (Table 4). Les réponses inflammatoire, cellulaire et humorale ont été ensuite étudiées.

Dans un premier temps, la réponse inflammatoire a été évaluée par coloration au rouge neutre (données non montrées). Celle-ci est comparable à celle obtenue avec le PBS pour l'injection unique de pseudotype Mok. En revanche, elle augmente avec le nombre d'injections de pseudotype Mok pour devenir importante au niveau de la troisième injection dans la SN.

La réponse cellulaire cytotoxique a été ensuite évaluée par quantification des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ après immunohistochemie (table 5). Comme pour la réponse inflammatoire, un niveau comparable au PBS pour l'injection unique de vecteur est retrouvé essentiellement au niveau du trajet de l'aiguille. En revanche, le nombre de cellules lymphocytaires augmente avec la répétition des injections du pseudotype Mok. La réaction cellulaire semble principalement dirigée contre le produit du transgène.

Enfin, la réponse humorale provoquée par l'injection répétée des vecteurs a été étudiée. La glycoprotéine Mok-G et VSV-G sont connues pour induire la production d'anticorps neutralisants. Ces anticorps se fixent à la surface des virions et empêchent donc leur fixation aux récepteurs membranaires. Pour évaluer la production d'anticorps neutralisants, les anticorps anti-Mok-G ont été dosés dans le sérum des souris de chaque groupe (Fig. 12). Les résultats montrent qu'après une injection de vecteur Mok, le titre n'atteint pas la dose vaccinnante (définie en U.I de la même manière que pour la souche de référence du virus de la rage). Après une seconde injection, tous les animaux ont dépassé la dose vaccinnante. Le titre des anticorps anti-Mok-G augmentant encore avec la troisième injection. Toutefois, dans les groupes VSV, le titre des anticorps neutralisants anti-VSV-G est dans tous les cas supérieur à celui des anticorps anti-Mok-G. Dans une seconde série d'expérience (Fig. 13a), les animaux sont vaccinés par différentes doses du virus sauvage atténué de Mokola préalablement à l'injection intracérébrale du pseudotype Mokola. L'injection du vecteur conduit à une réponse humorale, comme le montre l'augmentation des anticorps dirigés contre la protéine G (Fig. 13b). Néanmoins, l'expression de la GFP n'est pas diminuée par rapport au groupe témoin, quelle que soit la quantité d'anticorps neutralisants anti-Mok-G présente dans le sérum (Fig. 14), indiquant que la préimmunisation contre Mokola n'empêche pas l'expression du transgène.

Toutes ces données montrent qu'il est possible d'injecter le pseudotype Mokola à trois reprises au moins dans le cerveau, à un mois d'intervalle, sans provoquer de réaction immunitaire (cellulaire et humorale) délétère pour l'expression du transgène, malgré l'augmentation de la réponse avec le nombre d'injections. Enfin, la préimmunisation contre l'enveloppe Mokola n'empêche pas non plus la transduction efficace de cellules neurales.

III. Conclusions

Ce travail démontre que les vecteurs pseudotypés par l'enveloppe du lyssavirus de Mokola permettent une expression efficace du transgène dans les cellules astrocytaires et neuronales de différentes espèces. Le tropisme est dépendant de l'espèce étudiée : Chez la souris, la transduction par ces vecteurs est restreinte aux astrocytes exclusivement suggérant un tropisme astrocytaire des pseudotypes Mok. En revanche, chez le rat, la transduction est dépendante du promoteur utilisé: le pCMV permet une transduction majoritairement astrocytaire alors que le pPGK permet une transduction majoritairement neuronale, ce qui indique un tropisme neuronal et astrocytaire des pseudotypes Mok. Chez le primate, une restriction astrocytaire quasi totale est obtenue avec le pCMV alors que l'utilisation du pPGK conduit à une expression autant astrocytaire que neuronale, indiquant de même un tropisme neuronal et astrocytaire des pseudotypes Mok chez le singe. Nous disposons donc d'un vecteur permettant de cibler très préférentiellement les astrocytes du SNC chez le rongeur et le primate non humain.

Les pseudotypes Mok sont peu immunogènes et provoquent une réaction immunitaire inflammatoire et cellulaire de l'ordre de celle retrouvée avec l'injection du PBS. La transduction efficace des cellules n'est pas abolie en cas de préimmunisation. Par ailleurs, de multiples injections sont possibles et permettent une expression soutenue et importante du transgène malgré la génération importante d'anticorps dirigés contre l'enveloppe. Cette caractéristique est intéressante dans les situations cliniques dans lesquelles le patient doit subir plusieurs interventions.

Pseudotyping of HIV-1 Based Vectors With the Mokola Virus Envelope: Immune Reaction and Species Dependent Tropism

M. Brizard^{1#}, Y. He^{1#}, H. Mammeri^{1#}, C. Jan², A. Bemelmans¹, C. Serguera¹, N. Dufour², P. Colin¹, P. Perrin³, N. Tordo³, P. Charneau⁴, C. Tuffereau², P. Hantraye², N. Deglon², J. Mallet^{1*} and C. Sarkis¹

Running title: Influence of Mokola pseudotyping on lentiviral vectors *in vivo*

authors contributed equally to this work

(1)Laboratoire de Génétique Moléculaire des Processus Neurodégénératifs et de la Neurotransmission – UMR 7091 – Centre National de la Recherche Scientifique – Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, bâtiment CERVI, 83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

(2)CEA, France

(3)Laboratoire des Lyssavirus– Institut Pasteur – 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

(4)Unité d'Oncologie Virale – Institut Pasteur – 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

(5)Virologie Moléculaire et Structurale – UMR 2472 – Centre National de la Recherche Scientifique, 91198 Gif Sur Yvette Cedex, France

Corresponding author. Phone : 33-1-42177530 Fax : 33-1-42177533 e-mail: mallet@infobiogen.fr

ABSTRACT

Background: HIV-1-derived lentiviral vectors are powerful tools for delivering genes into the central nervous system (CNS). The easy method of production allows their pseudotyping with various envelope glycoproteins to modify their properties. The use of envelopes derived from viruses with specific tropism may restrict the tropism of the pseudotyped vectors to a unique cell type *in vivo*.

Methods: The production of pseudotyped lentiviral vectors using two envelope proteins from rhabdovirus was investigated. They were the G proteins of the vesicular stomatitis virus (VSV, vesiculovirus genus), and the mokola virus (MOK, lyssavirus genus). The infection efficiency of both pseudotypes as well as their tropism was tested *in vitro* and in rodent and non-human primate brains *in vivo*. Moreover, we documented the immune response elicited by multiple administrations into the brain of HIV-1-derived lentiviral vectors pseudotyped both envelopes. We also studied whether the neutralizing antibody response to previous exposure to lentivirus prevents or significantly reduces effective administration of pseudotyped lentiviral vectors.

Results: *In vitro*, the pseudotypes had variable efficiencies of infection suggesting that the receptors of the Mokola and VSV envelopes are distinct. *In vivo*, VSV and MOK-pseudotyped vectors had comparable efficiencies of transduction. The tropism *in vivo* of MOK-pseudotypes was restricted to glial cells in the mouse brain. In the rat and the non-human primate brains, tropism was different as both astrocytes and neurons could be transduced. Lentiviral vectors of both pseudotypes induced cellular (CD4 and CD8 lymphocytes) and humoral (neutralizing anti-G antibodies) immune responses. Nevertheless, each injection resulted in efficient and sustained transduction. The VSV-G and Mok-G pseudotyped lentiviral vectors can thus be administered successfully, at least three times consecutively. Also, Mok-G pseudotyped lentiviral vectors are effective when injected into the brain of seroconverted mice.

Conclusion: MOK and PV vectors allow specific targeting of astrocytes *in vivo* in the mouse brain.

Keywords: lentiviral vector, lyssavirus, gene therapy, pseudotyping, targeting, astrocyte.

INTRODUCTION

Targeting of gene transfer vectors is a major issue for gene therapy protocols as it is important for biosafety and efficacy of the treatment. Targeting is possible by modification of the tropism of the vector or by limiting the transgene expression to a given cell type. Various means can be used, depending on the vector. Transgene expression may be targeted by the use of a specific promoter or expression cassette to limit the expression to a particular cell type (Perez-Navarro et al., 1999; Barkats et al., 2006). Tropism can be specified by modifying the vector so that it will only enter a selected cell type. For enveloped viruses, pseudotyping is straightforward as these viruses contain an envelope protein (or glycoprotein) that can be replaced by another glycoprotein originating from another enveloped virus. Such strategies have been widely used to pseudotype MLV vectors with envelopes from ALV (Balliet and Bates, 1998), HTLV (Denesvre et al., 1996), VSV (Burns et al., 1993), SIV (Indraccolo et al., 1998), GalV (Miller et al., 1991) or the spleen necrosis virus (Engelstadter et al., 2001) for example. Lentiviral vectors derived from HIV-1 (Naldini et al., 1996b), HIV-2 (Corbeau et al., 1998), FIV (Poeschla et al., 1998), SIV (Nakajima et al., 2000), EIAV (Mitrophanous et al., 1999) and BIV (Berkowitz et al., 2001) have been developed, and their efficacy depends on using the VSV envelope that confers new properties: large species tropism, broad cellular tropism, improved transduction efficiency and the possibility of concentrating the stocks by ultracentrifugation (because the VSV-G is not labile upon ultracentrifugation). Few other envelopes have been used for the pseudotyping of lentiviral vectors. Some authors reported the use of rabies-G (Mochizuki et al., 1998; Mitrophanous et al., 1999; Reiser, 2000; Mazarakis et al., 2001), Mokola-G (Mochizuki et al., 1998; Desmaris et al., 2001), Ebola-G (Chan et al., 2000; Auricchio et al., 2001; Chazal et al., 2001), Ross River virus envelope (Kahle et al., 2000; Kang et al., 2002) and MLV amphi- and ecotropic envelopes (Naldini et al., 1996b). Most of these studies focused on the production of such pseudotypes. It is thus desirable to test their targeting properties *in vivo*.

For therapy in the central nervous system, gene transfer vectors may have to be targeted to neurones, astrocytes, oligodendrocytes, ependymal cells or endothelial cells. Lentiviral vectors present several advantages for the transduction of neural cells: they can transduce both mitotic and post-mitotic cells, the gene transfer is stable due to integration into the host genome, and high concentration of the vector is possible allowing the injection of very small volumes of vector resulting in efficient transduction. Lentiviral vectors allowing the expression of a reporter gene under the control of the CMV or the PGK promoter pseudotyped with the VSV envelope have been constructed and initially shown to transduce mostly neuronal cells. However, results are conflicting as some groups have observed a significant proportion of transduced astrocytes (Mitrophanous et al., 1999; Bensadoun et al., 2000; Zennou et al., 2001; Baekelandt et al., 2002). Also, when a MLV vector is used in the same conditions, only cells expressing the glial fibrillary acidic protein (GFAP+) are transduced, showing that the VSV envelope can direct the virus to astrocytes (Blomer et al., 1997).

The viruses of the family Rhabdoviridae known to infect mammals, have been classified in two genera: the Vesiculiviruses genus stemming from vesicular stomatitis virus (VSV) and the Lyssavirus genus otherwise known as the rabies and rabies-related viruses. Neurotropism is a characteristic of natural rabies virus infection, with viral replication restricted almost exclusively to neuronal cells. The tropism of the virus is determined by the interaction between the G molecules and cellular receptors. VSV infection may be mediated by phosphatidylserine, a common component of cell membranes (Schlegel et al., 1982). In contrast, rabies infection is thought to involve rabies virus-specific receptors. Few potential receptors have been identified, they include the nicotinic acetylcholine receptor (Lentz et al., 1983), the neural cell adhesion molecule (NCAM) (Thoulouze et al., 1998) and the p75NTR neurotrophin receptor (Tuffereau et al., 1998). More recently, J. Castellanos (Castellanos et al., 2000) presented pharmacological data suggesting that Trk receptors may be involved in the adsorption of the rabies virus. However, this process remains controversial, as the virus infects primary cultures as well as cell lines including those which do and those which do not express the putative receptors. Receptors for the Mokola lyssavirus have not been identified yet.

It is still unclear whether the neurotropism of rabies and rabies-related viruses is due to the route of natural infection or to specific and exclusive interactions with neuronal cells. Natural infection by rabies virus is due to bites from rabid animals. The virus is thought to be taken up by unmyelinated sensory nerve endings of neuromuscular and neurotendinal spindles and motor end plates (Harrison and Murphy, 1978; Watson et al., 1981). Then the virus spreads throughout the CNS by retrograde and anterograde transport, passing from one neurone to another. At final stages of the disease, infected tissues and organs in which rabies virus can be found include sensory nerve end organs in oral and nasal cavities, taste buds, adrenal glands, pancreas, kidney, heart muscle, brown fat, hair follicles, retina, cornea and salivary glands. Detection of the virus in salivary glands marks the final phase of the infection, and is important for the transmission of the virus from a vehicle to another [41].

Inherent to using viruses as vector systems for gene delivery is the subsequent immune response. The immune system can respond to viral antigens expressed in the nervous system although the brain is an immunologically privileged organ, shielded from the immune defenses by the blood brain barrier (BBB). Humoral, cytotoxic T lymphocyte (CTL) and cytokine-mediated inflammatory responses are elicited against (i) viral proteins during the injection of a vector, (ii) any viral gene products resulting from expression of the vector genome and (iii) products of transgene expression. Immune-mediated vector toxicity has been observed in experimental animals after direct injection of defective HSV-1 vectors (Schaar et al., 1994) and first generation Ad vectors into the brain (Wood et al., 1996; Byrnes et al., 2005). Seroconversion is also observed with AAV vectors: virus-neutralizing antibodies are generated after *in vivo* administration of the vectors in various animal models. The AAV capsid proteins appear to be, however, less immunogenic than Ad capsid proteins. Unlike HSV-1, Ad and AAV vectors, lentivirus vectors do not induce any apparent inflammatory and immune responses against viral proteins (Blomer et al., 1997).

The impact of pre-existing specific anti-virus immunity on the induction of an innate immune response has been studied in animals. Peripheral subcutaneous exposure to Ad vector caused the recurrence of inflammation in brain areas previously injected with an Ad vector (Byrnes et al., 2005). Rhesus monkeys that were previously immunized with Ad vector showed a higher acute cytokine profile in serum following intramuscular vector administration than naïve animals (Varnavski et al., 2002). It thus appears that any pre-existing immunity against the virus may significantly interfere efficient transduction with viral vectors and impede any readministration of viral vectors suitable for neurological diseases (Bromberg et al., 1998). This is problematic for human clinical applications because most humans have been exposed to natural virus infections and have circulating virus-neutralizing antibodies to the viral vectors currently in use (Laurikainen et al., 2000; Munnes et al., 2000). Up to 90% of human adults possess circulating antibodies against HSV, and most people have circulating antibodies to the predominant Ad and AAV serotypes currently used for gene therapy applications (Raper et al., 2003). Switching capsid serotypes have improved the possibilities for readministering vectors by circumventing virus-induced inflammatory responses (Halbert et al., 2000; Mastakov et al., 2002). Neutralizing antibodies directed against the fiber knob protein of the adenoviral capsid may make a major contribution to blocking infection (Bergelson et al., 1997).

Lentivirus vectors are very promising for gene therapy, partly due to their immunological characteristics. They escape cell-mediated immune responses and minimize humoral immunity, such that prolonged transgene expression is possible and they can be repeatedly administered into the CNS. Indeed, lentivirus vectors do not elicit immune and inflammatory reactions from the host even in after multiple administrations (Blomer et al., 1997; Kafri et al., 1997). Hind-leg muscle of adult Fisher rats can be transduced even after injection of HIV-1 derived lentiviral vectors into the brain or contralateral hind-leg muscle (Kafri et al., 1997). Moreover, successful readministration of lentiviral vectors into the mouse brain without loss of transgene expression has been demonstrated (Baekelandt et al., 2002). These various experiments used lentiviral vectors pseudotyped with a VSV envelope. The immune response directed against lentiviral vectors pseudotyped with other envelopes, for instance the Mokola envelope, has not been described.

In a first set of experiments, to test the re-routing of HIV1-derived vectors in the brain by ectopic envelopes, we investigated the possibility of constructing lentivirus pseudotypes with the Mokola lyssavirus envelope. We constructed vectors allowing the expression of the GFP reporter gene under the control of the CMV or the PGK promoter. Pseudotypes harbouring the G proteins of Mokola virus or VSV were obtained. The vectors were compared as concerns transduction of various neural cells *in vitro*, and tropism and the transduction efficacy when injected stereotactically into the brain of mouse, rat and non-human primate. Both pseudotypes can be produced efficiently, and are able to transduce cells *in vitro* with generally lower efficiencies for the Mokola pseudotypes. However, VSV and Mokola pseudotyped vectors displayed comparable efficiency for transduction of the brain *in vivo* in the three species tested. In contrast to previous reports, the tropism *in vivo* of the VSV-

pseudotyped vectors was not restricted to neurones but was dependent on the expression cassette used. MOK-pseudotyped vectors only transduced glial cells and not neurones *in vivo* in the mouse brain, independent with the expression cassette used. Surprisingly, their tropism was different into the rat and the non-human primate brain.

In a second set of experiments we used HIV-1-derived lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins (G) of VSV or Mokola to characterize transduction of the adult mouse brain after repeated administrations of vector. The host immune responses to these two pseudotypes did not interfere with efficient gene transfer into the CNS and at least three consecutive administrations into the brain were possible. We also demonstrated that the transgene expression after intracerebral administration of Mok-G pseudotyped vectors is not affected by pre-existing high titers of Mokola virus-neutralizing antibodies generated by previous vaccination. Therefore, lentiviral vectors can efficiently transduce the brain, despite the presence of neutralizing antibodies directed against the pseudotyping envelope protein. These results are encouraging for the use of pseudotyped lentiviral vectors in human applications involving repeated administration procedures.

MATERIAL AND METHODS

DNA constructs

The encapsidation plasmid, p8.91, and pMD-G encoding the VSV-G have been described previously (Zufferey et al., 1997). pGMok, encoding the Mokola G, have been described by Bahloul et al. (Bahloul et al., 1998). pTrip-CMV-GFP and pHR'-CMV-GFP have been described previously (Zennou et al., 2001).

pTrip- PGK-GFP-WPRE was derived from pTrip-CMV-GFP by deleting the U3 region of the 3' LTR, replacing the CMV promoter by the PGK, and inserting the GFP-WPRE cassette from the pHR'-PGK-GFP-W Sin-18 (gift from D. Trono).

Lentiviral pseudotype production

The viral particles were produced by transient transfection of 293T cells. For a 10-cm dish, 10 µg of p8.91, 10 µg of the vector plasmid (pTrip) and 5 µg of the envelope plasmid were used (VSV, MOK). High titer stocks were obtained by ultracentrifugation as previously described (Zennou et al., 2001), and were stored at -80°C. The stocks were titrated and normalised for the p24 antigen assayed by ELISA as described previously.

All experiments involving the production of replication incompetent HIV-based vectors were performed under biosafety level 3 containment conditions as approved by the Wistar Institutional Biosafety Committee.

Cell cultures and transduction analysis *in vitro*

PC12 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% HS, 5% FCS and 1% antibiotics. CathA, CathB, Path1 and Path2 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 8% HS, 4% FCS, 2mM glutamine and 1% antibiotics. CHP212 cells were cultured in DMEM-F12 medium supplemented with 15% of FCS, 2mM glutamine and 1% of antibiotics.

Primary cultures of rat cortical neurones were obtained from brains at E17 as previously described (Barkats et al., 2006).

For cell line transduction experiments, 50.000 cells were plated in 24-well plates. Next day, the plates were incubated with the viral suspension in 200 µl of fresh medium containing 20ng of p24 of Trip-CMV-GFP pseudotyped vectors. The viral suspension was removed 16 to 24 hours later and the cell incubated with fresh medium for 48 hours. For primary cortical neurone transduction, 200.000 cells were infected as above but with 50 ng of p24 of vector. Cells were harvested 24 hours after medium replacement. Cells were then prepared for flow cytometry. They were dissociated in 200 µl of trypsin and fixed with 200 ml of 2% formaldehyde. Fixed cells in suspension were analysed for GFP staining with a Becton Dickinson FACScan flow cytometer. Data were then analysed with CELLQUEST software. Results are presented as means of duplicate experiments.

Electron microscopy : gold immunolabelling and negative staining

Colloidal gold immunoelectron microscopic analysis was performed as described (Le Gall et al., 1997). Goat anti-rabbit IgG (H+L) labelled with 10 nm colloidal gold (Amersham life science) was used for detection of polyclonal serum anti VSV and MOK respectively. The grids were then examined with a J  ol 1200 EX II electronic microscope after a negative stain with PTA 1%.

Glycoprotein quantification in pseudotypes

VSV glycoproteins were solubilized from virions with 1% CHAPS and purified according to Gaudin et al., 1992 (Gaudin et al., 1992). The concentration of purified glycoprotein was determined. Various known amounts of glycoprotein were run on a gel together with pseudotype virion samples and transferred onto a nitro-cellulose membrane. The proteins were revealed with a rabbit polyclonal anti-VSV antiserum (diluted 1/1000).

The amount of glycoprotein in purified Mokola virus was estimated by comparison with a known amount of PV glycoprotein following Coomassie staining of a gel . Various known amounts of Mokola virus or pseudotype virion samples were run on gel, transferred to nitro-cellulose membranes and the proteins labelled with a polyclonal rabbit anti-Mokola antiserum (dilution 1/500) .

The blots were incubated with a peroxidase-linked secondary antibody from Jackson Laboratory (dilution 1/3000) and then stained with the ECL-kit (Amersham).

Chloroquine and NH4Cl treatment

CHP212 cells were prepared for transduction as above, and incubated in duplicate with a viral suspension containing the vector and the drug at the desired concentration. The samples were analysed by flow cytometry 48h after removing the viral suspension.

Surgical procedure

All animal procedures were performed in accordance with protocols approved by the Institute Animal Care and Use Committee. Adult C57Bl/6 female mice (6 weeks old) were obtained from Janvier and housed in a standard 12 hours on/off light cycle.

Intracerebral injection.

Adult C57Bl6 female mice (6 weeks old) and adult female Sprague-Dawley rats (6 weeks old) were obtained from Janvier and housed in a standard 12-hr on/off light cycle, according to institutional guidelines.

Animals (n=9) were anaesthetized by intraperitoneal injection with a 1: 1 solution of ketamine/xylazine (1.5 ml/kg of body weight in 0.9% NaCl) and installed in a stereotatic injection apparatus. Twenty ng of p24 of the VSV-G or Mok-G pseudotyped pTrip-CMV-GFP vector (volume 1 µl) was delivered in two injections into the left

striatum (relative to lambda (AP), the midline (ML), and the dura (DV)): AP + 4.6 mm, ML + 2.2 mm, DV - 3.3 mm and - 3.5 mm). The virus suspension was injected at a rate of 0.25 μ l/min. The cannula was left in place for another 4 min and then withdrawn. Vectors were thawed on ice and kept on ice throughout the procedure.

One month after the first injection, mice were injected with the same vector into the right striatum (n=6). One month after the second intrastriatal injection, the same quantity of vector was injected into the substantia nigra of the left hemisphere (n=3). Control animals received one, two or three injections of PBS in the same conditions (see figure 1, summary of the experiment).

Blood samples were collected under deep anesthesia from right atrium of each of three mice of each experimental group (single injection = PBS, Mok or VSV, double injection = PBS/PBS, Mok/Mok or VSV/VSV, and triple injection = PBS/PBS/PBS, Mok/Mok/Mok or VSV/VSV/VSV) one week after each intracerebral injection. These mice were then killed and brain slices prepared for immunochemistry. The blood samples were stored in 4°C overnight and sera were collected. The serum was frozen and stored in -80°C until use.

The coordinates for the hippocampus in mice were: 1.7 mm rostral and 1.5 mm lateral to lambda and -1.8 mm and -1.6 mm ventral to the dura. Animals were killed one week after injection and the brains were removed for histology.

Four mice were injected intrastrially with each pseudotype of the PGK-GFP-WPRE vector. A total of 60ng of p24 of vector was used for each animal (40ng of p24 of PV pseudotypes). Two of them were killed one week after injection and two were killed two weeks after injection.

Histology

Tissue preparation.

Animals were perfused with 4% PFA and brain or spinal cord were dissected and post-fixed for 2 hours in the fixative. Then, they were incubated in 15% sucrose in PBS for 48h at 4°C, and frozen in cold isopentane (-50°C).

Tissue sections (20 μ m thick) were cut with a microtome cryostat. All coronal slices throughout the striatum and the substantia nigra and longitudinal slices throughout the whole spinal cord were collected.

Vector delivery to pre-immunized mice

Three doses of inactivated wild type Mokola virus (0.2 μ g, 1 μ g and 5 μ g) or PBS (control group) were injected intraperitoneally into animals (n = 5 for each condition).

After twenty-six days, serum was collected by eye puncture for neutralizing antibody assays. Mice were then anaesthetized by intraperitoneal injection of a 1: 1 solution of ketamine/xylazine (1.5 ml/kg of body weight in 0.9% NaCl), installed in a stereotatic injection apparatus and given 30 ng of p24 Mok-PGK-GFP vector by injection into the left striatum at a rate of 0.5 μ l/min. Fourteen days following the intrastriatal injection, serum was collected, and

all mice were then sacrificed and brains were removed, as described below (see figure 4a, experimental protocol).

Immunohistochemistry.

Immunohistochemistry was performed on brain sections to detect the transgene (GFP), the phenotype of transduced cells (GFAP and NeuN) and immune cell markers (CD4 and CD8).

For GFP immunohistochemistry, mice were perfused intracardially with cold 4% paraformaldehyde. Brains were removed and fixed for 24 h in the perfusion buffer and saturated in 30% sucrose. Fixed tissues were sectioned serially on a microtome cryostat (20 μ m brain sections). The sections were first treated with 0.3% hydrogen peroxide and preincubated in 0.2% gelatin and 0.25% Triton X-100 in PBS and then in 10% normal goat serum with 0.2% gelatin and 0.25% Triton X-100 in PBS. They were incubated with the primary rabbit polyclonal anti-GFP antibody (Abcam, Cambridge, UK) diluted 1: 3000 in 10% normal goat serum, 0.2% gelatin and 0.25% Triton X-100 in PBS overnight at 4°C. The sections were then incubated in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1: 200 in 0.2% gelatin and 0.25% Triton X-100 in PBS, and bound antibodies were revealed by the Vectastain Elite AB horseradish peroxidase method (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) with diaminobenzidine (DAB). The sections were stained with a neutral red solution, and dehydrated with a series of ethanol solutions and xylene, and coverslipped with Eukitt mountant.

GFAP and NeuN immunohistochemical analyses were performed according to previously described protocols (Sarkis et al., 2000) with a mouse anti-human GFAP monoclonal antibody (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) and monoclonal anti-NeuN antibody (Chemicon, Temecula, CA).

For CD4 and CD8 immunohistochemistry, mice were killed by cervical dislocation, brains were removed, directly frozen in cold isopentane and fixed in absolute ethanol at -20°C for 20 min. Fixed tissues were sectioned serially on a microtome cryostat (20 μ m brain sections). Endogenous peroxidase was blocked with 0.3% hydrogen peroxide, and double-color immunohistochemistry staining was performed. The sections were stained with rat anti-mouse CD4 (clone H129.19; Pharmingen) or rat anti-mouse CD8 (clone 53.6,7; Pharmingen) diluted 1: 100. All primary antibodies were monoclonal anti-mouse. Secondary antibodies were biotinylated rabbit anti-rat (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1: 200. For immunocytochemical visualization, the sections were incubated in avidin-peroxidase conjugate (Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) followed by DAB. For routine histology, sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E) and dehydrated with a series of ethanol solutions and xylene and then coverslipped with Eukitt mountant.

Quantification:

Semi-quantitative analysis were used to determine the area occupied by cells immunohistochemically stained with

anti-CD4, anti-CD8 or to determine the area of GFP immunoreactivity within 20 μ m brain sections.

Immunization of mice and titration of neutralizing antibodies

Inactivated and purified Mokola virus (derived from a cat isolate in Zimbabwe, (Foggin, 1982) was prepared as described . Briefly virus was purified from inactivated (BHK-21 cell supernatants by ultracentrifugation through a sucrose gradient.

Neutralizing antibodies in the serum of mice were titrated by the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) [39] with the previously described modifications (Desmaris et al., 2001). After 24h, the ability of the serum to neutralize a Mokola virus suspension *in vitro* otherwise infecting 80% of a BHK-21 cell culture was estimated. The Second International Standard (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) was used as a reference against the CVS strain of rabies virus and the viral neutralizing antibody titer is expressed in international units/ml (I.U ml⁻¹). For determination of the serum titer against Mokola virus, we took the serum dilution causing 50% inhibition of the fluorescent focus rate as having the same virus neutralizing antibody titer as that of the reference serum assayed against CVS.

Neutralization *in vitro*

A Mok-K pseudotyped lentiviral vector in which the CMV immediate-early promoter drives expression of the GFP protein gene was used to detect transduction. Neuronal CHP212 cells were plated in 24-well dishes at a density of 7.5x10⁴ cells in DMEM supplemented with 15% FCS. Next day, 200 μ l of fresh medium containing 20 ng of p24 of pTrip- CMV-GFP vector and serial dilutions (1: 10) of serum samples (starting at 1: 100, 1: 1000, etc.) were applied to nearly confluent CHP212 cells. The viral suspension was removed 24 hours later and the cells incubated with fresh medium for 48 hours. Cells were dissociated in 200 μ l of trypsin and fixed with 200 μ l of 2% formaldehyde. Fixed cells in suspension were analyzed for GFP staining with a Becton Dickinson FACScan flow cytometer. Data were analyzed with CELLQUEST software.

Statistical analysis

All results were expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). One-factor analysis of variance (ANOVA) was applied as appropriate, and subsequent group-to-group comparisons were made using the Fisher test. Differences were considered significant for values of $p < 0.05$.

RESULTS

Production and characterisation of VSV and MOK pseudotypes

Pseudotyped HIV-1 vectors were produced by triple transfection with the HIV genome transcomplementation plasmid (containing the gag and pol genes), the vector plasmid and the envelope plasmid. The VSV and MOK envelope expression plasmids were used to produce the corresponding pseudotype. Presence of cellular debris in the concentrated viral stocks can induce toxicity and lower the efficiency of transduction *in vivo*. Thus, supernatants of the transfected cells were treated with Dnase to reduce the presence of DNA/protein aggregates in the stocks and then concentrated by ultracentrifugation. Finally, remaining cellular debris were eliminated by serial centrifugations at medium speed to clear the stocks from potentially toxic components. Both pseudotypes were produced in parallel with the only difference between the processes being the envelope plasmid used. The stocks were titrated by assaying the capsid p24 protein by ELISA. The titers of VSV were higher than that of the MOK-pseudotypes (Table 1), although there was substantial variability between stocks.

To confirm that the G molecules were expressed at the surface of the virions, stocks of each pseudotype were analysed by electron microscopy after labelling the glycoprotein with specific antibodies coupled to colloidal gold. Gold particles, and thus the G proteins were observed at the surface of the virions of both pseudotypes (data not shown). The efficiency of transduction may depend on the number of G molecules anchored at the virion surface. Electron microscopy does not allow measurement of the number of G molecules because the immunoreactivity of the primary antibodies differs from one another. Thus, we used quantitative western blotting to assay the G molecules for each pseudotype (figure 1). The intensity of the G band from the vectors was compared to a standard scale of purified G molecules (for VSV-G) or purified wild-type virus (for MOK-G). For VSV, there was 0.5 to 2 μ g of G per μ l of vector (from a viral stock containing 89 ng of p24/ μ l). For MOK, there was 10 to 20ng of G per μ l (from a viral stock containing 30 ng of p24/ μ l). Thus, MOK-G proteins were about 30 fold less abundant than VSV-G protein on the surface of the virions (Table 2).

In vitro transduction of neural cells

We tested whether the pseudotypes were able to transduce various neural cell lines *in vitro* and primary cultures of neurones. Pseudotyped Trip-CMV- GFP vectors (20 ng of p24) with VSV or MOK envelopes were used. The percentage of GFP+ cells was quantified by flow cytometry (FACS) (figure 2). VSV pseudotypes transduced all the cell types tested with very high efficacy. MOK pseudotypes transduced CHP212, SKNSH (both human neuroblastoma), CathB, Path1 and Path2 cells efficiently. Finally, the transduction of cortical primary neurones was tested. VSV and MOK vectors were able to transduce these cells (with 50ng of p24). These findings thus suggest that the three envelopes do not use the same receptor(s) to enter cells.

Rhabdoviruses enter the cells *via* the pH-dependent endocytic pathway. We therefore tested the effects of two inhibitors of endosome/lysosome acidification, chloroquine and ammonium chloride (NH₄Cl), on transduction by the pseudotyped viruses (figure 3). Chloroquine (0.1 and 0.5 mM) similarly inhibited the transduction of CHP212 cells by both pseudotypes of a Trip-PGK-GFP-W vector (figure 3A). Similarly, NH₄Cl inhibited the transduction of CHP212 cells by both pseudotypes (figure 3B). However, inhibition was weaker for the VSV than for the MOK pseudotypes. Taken together, these observations confirm that the pseudotyped viruses enter the cells *via* the lysosomal/endosomal pathway *via* a fusion process.

***In vivo* transduction after stereotactic injection into the adult mouse brain**

We investigated infection by the pseudotyped viruses *in vivo* following direct injection into the brain. C57Bl6 mice were stereotactically inoculated in the striatum with 20 ng of p24 of pTrip-CMV-GFP vector. One week after injection, the expression of the GFP was analysed in cryostat-cut tissue sections by direct fluorescence or by anti-GFP immunohistochemistry. GFP fluorescence was very intense for VSV and MOK pseudotypes. Anti-GFP immunohistochemistry was performed. The number of sections in which GFP was expressed and the relative number of infected cells were determined (Table 3). The results were consistent with the findings of GFP direct fluorescence analysis: expression from VSV and MOK pseudotypes were similar (figure 4). For both pseudotypes the neutral red counterstaining was similar to that for PBS control injections, and there was no visible damage and very little infiltration by macrophages. Also after a single injection of the vectors, the cellular immune reaction was comparable to that observed after a saline injection, assessed by CD4 and CD8 immunostaining. Thus, the tissue appeared to be undamaged (see figure 11).

The transduced target cells were characterised using immunohistofluorescence techniques with anti-GFAP (specific for astrocytes) and anti-NeuN (specific for neurones) antibodies. Cy3 secondary antibodies were used, and confocal microscopy for localisation of GFP and Cy3 staining (red). In contrast to what was observed *in vitro*, MOK-pseudotyped Trip-CMV-GFP vectors only infected glial cells (figure 5C and 5E). Neurons were not transduced by MOK-pseudotyped Trip-CMV-GFP vector (figure 5D and 5F). VSV-pseudotyped Trip-CMV-GFP vector transduced astrocytes with high efficiency (figure 5A) but also transduced neurones (figure 5B) (grossly estimated to be less than 30% of the transduced cells).

Because the tropism may also depend on the area of injection, MOK pseudotypes of Trip-CMV-GFP were injected into the hippocampus to determine the phenotype of transduced cells in this structure. This structure is organised in strata of neurones and of glial cells that can be easily distinguished. Only the glial layer of cells showed GFP expression and the GFP co-localised with anti-GFAP staining. A few ramifications of astrocytes in the neuronal layer were GFP+, but no NeuN- expressing-cells were transduced. This confirms that MOK pseudotypes only transduce glial cells *in vivo* in mouse (figure 6E).

The absence of transgene expression in neurones following administration of MOK pseudotypes may have

been due to specific tropism of these vectors for glial cells, or to poor expression of the CMV promoter in neurones. Thus, MOK pseudotype of a vector containing another expression cassette was tested: we repeated the experiment using pseudotypes of the Trip-PGK-GFP-W vector, in which GFP expression is under the control of the ubiquitous PGK promoter and the WPRE regulatory element. VSV pseudotypes mostly transduced neurones (figure 6B), and astrocytes to a lower level (figure 6A), in accordance with results obtained by other teams. In contrast, MOK pseudotypes only transduced cells of astrocytic phenotype (figures 6C and D).

In summary, VSV pseudotypes were able to transduce both neurones and glial cells in the mouse brain; with the CMV-GFP cassette there was an apparent preference for glial cells and with the PGK-GFP-WPRE cassette for neurones. In contrast, MOK pseudotypes only transduced astrocytes, irrespective of the expression cassette.

***In vivo* transduction after stereotactic injection into the adult rat brain**

To verify whether the tropism of MOK pseudotypes in other species is similar, we injected lentiviral MOK pseudotypes bearing a CMV-GFP-WPRE or a PGK-GFP-WPRE expression cassettes in the rat brain. In four rats, the left striatum was injected with 100 ng of the MOK-CMV-GFP-WPRE vector and the right striatum with 200 ng of the MOK-PGK-GFP-WPRE vector. Tropism of the vector was verified by immunostaining of astrocytes using an anti-GFAP antibody and immunostaining of neurons using an anti-NeuN antibody (Figure 7). Surprisingly the results were different from that observed in the mouse brain. The MOK-PGK-GFP-WPRE tropism was very similar to that of the VSV-PGK-GFP-WPRE, i.e. a majority of neuronal cells transduced. With the CMV driven expression cassette, the tropism was very predominantly glial, however, few neuronal cells could also be transduced.

***In vivo* transduction after stereotactic injection into the adult non-human primate brain**

In order to determine the tropism of the MOK pseudotypes in primate brain, we performed stereotactic injection of these vectors in maccacus fascicularis. In a first set of experiment, we established the injection conditions using a VSV-PGK-GFP-WPRE vector, using two doses in each of the striata. One month after injection, the animal was sacrificed, perfused and analysed. As seen on figure 9, after tridimensional reconstruction of the GFP expressing area, the whole striatum could be transduced with both doses, and the entire striatonigral pathway was stained, indicating that neuronal cells were very efficiently targeted by this vector. However, at the doses used, macroscopic tissue damage was observed, indicating that the dose used was too high.

In a second set of experiment, we injected one animal with two low doses of MOK-pseudotyped vectors in the left and right striatum, respectively with a MOK-CMV-GFP-WPRE vector and a MOK-PGK-GFP-WPRE vector. At the doses used, no major tissue damage was observed, and expression of the transgene was very high. The tropism was determined by anti-GFAP and anti-NeuN staining, and showed that the PGK driven vector transduced a majority of glial cells, although a significative number of neuronal cells could also be transduced (figure 8). The

CMV driven vector transduced almost exclusively glial cells, and only rare neurons could be transduced (figure 8). Thus, in the non-human primate, the tropism of the MOK-pseudotyped vectors is intermediate between that observed in the mouse and the rat brain.

Repeated injections of Mokola or VSV-pseudotyped lentiviral vectors into the mouse brain lead to sustained GFP expression

We investigated whether repeated injections of pseudotyped HIV-1-derived vectors into the nigrostriatal system elicit efficient and stable transgene expression. Mokola or VSV-G pseudotyped pTrip-CMV-GFP vector (1 μ l at 20 ng of p24 per μ l) were administered by stereotatic injection into the left striatum of immunocompetent C57Bl6/N mice. One week after the first injection, three animals were killed. The same vector (20 ng of p24) was injected into the right striatum of the remaining animals one month after the first injection. Three more animals were killed one week later, and the same quantity of the same vector was injected into the substantia nigra of the left hemisphere of the remaining animals one month later. The last group of animals (n=3) was killed one week after the last injection. The control group received one, two or three injections of vehicle (PBS) in the same conditions (see figure 10, summary of experiment). Immunohistochemistry was used to test brain sections from both hemispheres in every experimental group (single injection = PBS, Mok or VSV, double injection = PBS/PBS, Mok/Mok or VSV/VSV, triple injection = PBS/PBS/PBS, Mok/Mok/Mok or VSV/VSV/VSV) for GFP as a marker for transgene expression.

GFP-expressing cells were evenly distributed in the striata at both first and second injection sites, with both pseudotypes (see table 4). Expression of the transgene protein was not lower following the second injection into the contralateral side than after the first injection. Moreover, GFP+ cells were detected in the substantia nigra as well as in both sides of the striatum after the third injection (table 4), more than two months after the first injection (longest time studied). These data indicate that repeated injections of Mok-G or VSV-G pseudotyped CMV-GFP lentivirus, with a one month interval between injections, results in stable and efficient transduction. The phenotype of transduced cells was revealed by fluorescent immunolabeling with glial (anti-GFAP) and neuronal (anti-NeuN) markers. At all time-points, all cells transduced in the striatum by Mok-G pseudotyped vector and a majority of those by the VSV-G envelope were glial cells (data not shown).

Cellular immune response in the context of repeated injections

We assessed the inflammatory response induced by repeated injections of lentivirus. Sections of transduced striatum and substantia nigra were examined by neutral red staining. No macroscopic damage was observed in the tissues of any of the animals. For the Mok and VSV groups, there were scattered infiltrates (comparable to those observed after an injection of PBS). For the Mok/Mok and VSV/VSV groups, infiltrates were visible but remained confined to the site of injection. For the Mok/Mok/Mok and VSV/VSV/VSV groups, infiltrates

were found over an extensive area, around the last site of injection (substantia nigra), and numerous inflammatory cells were detected around the blood vessels.

Cytotoxic responses were evaluated by immunohistological tests for the presence of CD4+ and CD8+ lymphocytes at the injection sites. There were few CD4 + and CD8 + lymphocytes in the brains of the single-injection Mok and VSV groups (comparable to PBS group) but more in the Mok/Mok, VSV/VSV, Mok/Mok/Mok and VSV/VSV/VSV groups on both sides of the striatum, and in the ipsilateral substantia nigra for the triple-injected groups (table 5 and figure 11). The immune response to the injection of vehicle was negligible with infiltrates restricted to the needle track, irrespective of the number of injections. Thus, the inflammatory and cytotoxic factors induced in the brain after repeated injection of MOK-G or VSV-G pseudotyped lentiviral vectors do not impair GFP expression.

Humoral immune response to repeated injections

We studied the humoral reaction in response to the exposure to the envelope glycoprotein (MOK-G or VSV-G); these glycoproteins are known to induce neutralizing antibodies in animals. Neutralizing antibodies generally bind to the virus surface thereby preventing virus attachment to cellular receptors and uptake into the cell. Consequently, such antibodies may hamper the effectiveness of repeated injections of a vector. To assess the production of neutralizing antibodies in response to previous exposure to the pseudotyped vectors, we titrated anti-G antibodies in mice sera one week after each injection of pseudotyped CMV-GFP lentiviral vectors. Titers were estimated from the inhibition, by collected sera from VSV or MOK-pseudotype injected animals, of cell infection by the wild-type VSV or Mokola virus, respectively. After a single injection, the titer of specific anti-G antibodies was low in the MOK and VSV groups: the titer hardly attained the threshold defining seroconversion after vaccination (I.U > 1). After the second injection, all animals had clearly seroconverted and the neutralizing antibody titer was even higher following the third injection. However, for the same number of injections, the titer of neutralizing antibodies in the VSV group was always higher than that in the MOK group (figure 12).

Thus, although neutralizing anti-G antibody titers after two or three injections clearly indicate that the animal seroconverted (i.e. were able to survive a challenge with the wild-type VSV or Mokola virus) the induced antibodies did not prevent the successful repeated transduction in the brain.

High titers of neutralizing anti-G antibodies do not neutralize the vectors

We investigated whether the presence of very high titers of neutralizing antibodies in the serum prevented *in vivo* transduction with MOK-pseudotyped vectors. A humoral anti-G reaction was provoked by intraperitoneal injection (vaccination) with various doses of inactivated wild type Mokola virus (5 mice per group: saline solution, 0.2 µg, 1 µg or 5 µg of purified virus). One month later, neutralizing antibodies were titrated in serum collected from all animals and, animals were injected (one month later) with the Mok pTrip-PGK-GFP vector (30 ng of p24).

Three weeks after the injection of vector, serum antibodies were titrated and brains were examined for the expression of GFP (figure 13a).

The neutralizing anti-G antibody titers were proportional to the quantity of inactivated wild type virus (vaccine) initially injected; thus some were very high, up to several dozens of I.U. The injection of Mokola pseudotyped pTrip-PGK-GFP vector into the pre-immune animals induced the humoral memory response: the titer of neutralizing anti-G antibodies increased (figure 13b). GFP in the striatum was determined by semi-quantitative analysis. There was no difference in the abundance of GFP in the experimental groups (figure 14). Thus, transduction of striatal cells was equally effective independent of the neutralizing anti-G antibody titer. The titers of the antibodies were determined as the neutralization of wild type Mokola virus *in vitro*, and therefore, possibly, the antibodies raised against the G protein of Mokola cannot neutralize Mokola pseudotyped vectors, although they neutralize wild type Mokola virus. We tested this by *in vitro* transduction of CHP212 cells by MOK-pseudotyped vectors in presence of various dilutions of mouse serum containing anti-G antibodies. At all serum dilutions tested, the neutralization of the vectors was complete *in vitro*, showing that the anti- G neutralizing antibodies can neutralize both wild type Mokola virus and MOK-pseudotyped lentiviral vector. In a control experiment, VSV-G pseudotyped vectors were not neutralized by this serum, showing the specificity of the neutralization. These experiments suggest that the reason why the transduction is not blocked *in vivo* is because the neutralizing antibodies do not have effective contact with the vector during the stereotatic injection.

DISCUSSION

We report a study of the properties of pseudotyped lentiviral vectors using the glycoprotein from two different rhabdoviruses: VSV of the vesiculovirus genus and the Mokola virus of the lyssavirus genus.

Production of VSV and MOK pseudotypes

We first describe efficient production of the both pseudotypes in 293T cells. The pseudotypes present G molecules at the vector surface, as demonstrated by gold- immunodetection and electron microscopy. The transduction efficiency of the pseudotyped viruses varied according to the cells used. This suggests that the vectors use different cellular receptors that are differently expressed at the cell surface of the various cells used. Thus, the transduction unit assay appears inadequate for comparing the titers of pseudotypes with different rhabdovirus glycoproteins. Infectivity may also depend on the abundance of G molecules at the surface of the pseudotypes. Quantitative western blot indicated a higher expression of the VSV-G than the MOK- G on pseudotyped vectors. However, the VSV and the MOK-pseudotyped vectors had similar efficiency of transduction *in vivo*. This may be due to a difference in the affinity of the envelopes to their respective receptors. We thus produced Mokola pseudotypes using various amounts of the envelope plasmid during the production process to test whether this may influence their efficiency. We did not observe any difference of these stocks both in terms of efficiency and tropism (data not shown).

Tropism of MOK-pseudotyped lentiviral vectors

VSV-pseudotyped Trip-CMV-GFP vector mostly transduced astrocytes in the mouse brain, with less than 30% of transduced cells being neurones. This result contrasts with previously published data for VSV pseudotypes (Blomer et al., 1997; de Almeida et al., 2001). Vectors used in this study bear a central flap whereas the cited previous studies used a vector without a flap. Therefore, we repeated the analysis using both the Trip-CMV-GFP vector and the HR'-CMV-GFP vector, that had been used by other teams, in the rat brain. The majority of transduced cells in all cases were astrocytes (data not shown). However, when a different expression cassette (the Trip-PGK-GFP-WPRE vector) was pseudotyped with the VSV-G, most of the transduced cells (over 80%) were neurones, and the proportion that were astrocytes was small, consistent with the previously published data (de Almeida et al., 2001). Thus, the central flap sequence does not influence the tropism of the vectors.

In the mouse brain, MOK-pseudotyped vectors only transduced astrocytes, irrespective of the vector used (Trip-CMV-GFP, Trip-PGK-GFP-WPRE and HR'-CMV-GFP). The level of GFP expression was higher using the CMV promoter than the PGK. Taken together with the results obtained for the VSV pseudotypes, these results suggest that the CMV promoter is highly active in astrocytes and the PGK is highly active in the neurones in a lentiviral context. The production process has been optimised to avoid stock toxicity (low amount of plasmids,

Dnase treatment and cell debris elimination), thus it is unlikely that the glial tropism was a consequence of enhanced CMV promoter activity associated with a glial reaction. Indeed, tissue analysis revealed very little tissue damage with all the vectors, comparable to the saline solution injection after a single injection. It is also unlikely that an excess of vector dose may saturate the transduction and trigger a tissue reaction that could lead to biased tropism. As mentioned above, very low tissue reaction has been observed. Moreover, the amount of total particles used in our study is very low. This was made possible by the use of the central flap in our vectors, which allows to reduce the amount of injected vector by enhancing the transduction efficiency (Zennou et al., 2001). We only injected 20 ng of p24 of CMV- GFP or 60 ng of p24 of PGK-GFP in the striatum of mice, when other teams often inject 100 ng or more of p24 using vectors devoid of the central flap. In summary, in the mouse brain, VSV-pseudotyped vectors are able to transduce either glial cells or neurones, depending on the promoter used. MOK-pseudotyped vectors only transduced glial cells, probably due to a selective adsorption of the vectors by this cell type.

Rabies viruses primarily infect neurones. However, a number of studies have reported rabies viral antigens and virions in human (Lamas et al., 1980; Feiden et al., 1985) and murine astrocytes (Schneider, 1969; Iwasaki and Clark, 1975) and in murine ramified microglial cells (Sugamata et al., 1992). Ray et al. (Ray et al., 1997), have shown that rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. The MOK-G gene we used was obtained from cell-culture- adapted strains (Bahloul et al., 1998). Adaptation of a neurotropic virus in a non-neuronal cell line may change its tropism: the G gene can accumulate mutations resulting in the alteration of the specific binding of the G protein to neuronal receptors. The strains from which the MOK-G gene was obtained was maintained in BSR cells (Desmaris et al., 2001). Thus, the failure of the MOK-pseudotyped vectors to transduce neurones *in vivo* in the mouse brain may be a consequence of adapting the viral strains in a non-neuronal cell line. A recent study corroborates this hypothesis by comparing two vectors pseudotyped with envelopes derived from two variants of rabies differing in the cell lines there were serially passaged in. The authors show that avian retroviruses pseudotyped with the envelope of the rabies strain CVS-N2C (passaged in mouse neuroblastoma cells) are highly neurotropic *in vitro* and *in vivo*, whereas vectors pseudotyped with the CVS-B2C (passaged in BHK-21 cells) are not selective for neurones (Parveen et al., 2003). Another possibility is that the conformation of the G in lentiviral pseudotypes is different from the G in its native virus. Rhabdovirus glycoproteins form trimers at the surface of the virions (Gaudin et al., 1992). These trimers at least in VSV are stabilised *in vitro* by the M protein (Lyles et al., 1992), which is absent from the lentiviral pseudotypes. The structure of the G molecules on lentiviral vector pseudotypes is unknown and this structure may have consequences for the tropism of the vector.

Differential tropism was observed in other species. In the rat brain, the tropism of the MOK-pseudotyped vectors was very similar to the VSV-pseudotypes tropism, with a slight higher proportion of astrocyte. In non-human primates, the tropism of MOK-pseudotyped vectors was intermediate between the tropism observed in the mouse

brain and the rat brain. This differential tropism may result from altered affinity of the MOK putative receptors in the various species, or from the expression of a MOK receptor at the surface of neuronal cells in the rat and non-human primate, but not in the mouse.

Immune reaction

We studied the consequences of repeated injections of a HIV-1 derived lentiviral vectors pseudotyped with either VSV glycoprotein derived from the vesicular stomatitis virus or Mokola glycoprotein. We found that VSV-G and MOK-G pseudotyped lentiviral vectors can be successfully administered to the brain at least three times, with injections one month apart. There was effective and sustained transduction associated with each injection.

A major issue for viral delivery systems is vector-associated toxicity that leads to innate and adaptive immune responses. This problem applies equally to approaches involving direct injection into the brain (Schaar et al., 1994; Wood et al., 1996). In our study, an influx of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes was induced, and inflammatory cells appeared around the site of injection. The extent of both these phenomena was proportional to the number of injections, five weeks after the first viral administration. These immune responses could be the consequence of the presence of either the viral or the GFP proteins, or both.

In recent work, Baekelandt et al. demonstrated that antibodies against GFP are raised in the serum of mice injected twice with HIV-1-derived lentivirus encoding GFP but do not greatly interfere with transgene expression (Baekelandt et al., 2002). Our experiments corroborate this result, as GFP expression was stable despite the continuing recruitment of CD4⁺ cells which stimulate both cytotoxic T lymphocytes and antibody producing B-cells at the injection sites. To assess the involvement of the GFP transgene in the cellular immune response, we injected a VSV-G pseudotyped pTrip-PGK-GFP-WPRE vector into the striatum, 30 days after an injection of either the same construct or of an empty VSV-G pseudotyped vector (no transgene) (Sarkis C., unpublished data). There were more CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in the group that received the GFP encoding vector twice than in the group that initially received the empty vector. This suggests that the cellular immune reaction is mainly directed against GFP rather than the envelope proteins.

This may also explain the higher T-cell recruitment in the double- and triple-injected MOK groups than in VSV groups. Indeed, with MOK pseudotypes, GFP is exclusively expressed in glial cells that may have a role in antigen presentation in the CNS (Cornet et al., 2000), unlike neurons that do not express major histocompatibility complex (MHC) molecules (Hart and Fabry, 1995). The immune response induced by GFP expression is therefore stronger for MOK-G pseudotyped vector than for VSV-G pseudotypes. However, only small numbers of animals were used for semi-quantification of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, and the results remain to be confirmed. Recently, Abordo-Adesida et al showed similar results using a systemic vaccination protocol by a lentiviral vector after the brain injection (Abordo-Adesida et al., 2005). Interestingly, they show that systemic immunization after CNS injection, with the lentiviral vector expressing the same transgene as a vector injected into the CNS, caused

a decrease in transgene expression in the CNS, concomitantly with an infiltration of inflammatory cells into the CNS parenchyma at the injection site. However, peripheral immunization with a lentiviral vector carrying a different transgene did not diminish transgene expression, or cause CNS inflammation. Thus, this work suggest that the stimulation of adaptive immune responses against lentiviral vectors was effective in causing a decrease in transgene expression only if the immune response was directed against the transgene.

Another major issue relating to the immune response is the inhibition of viral transduction by neutralizing antibodies in the serum, especially in the context of repeated injections (Bromberg et al., 1998). The blood brain barrier (BBB) restricts the entrance of leukocytes, and soluble factors such as immunoglobulins and cytokines, into the CNS; it thus confers an immunologically privileged status on the brain. After the delivery of viral vectors to the CNS by stereotatic surgery, the BBB is temporarily breached: influx of immune effectors from the periphery is possible, as is induction of MHC expression (Byrnes et al., 2005). We found neutralizing anti-G antibodies in all mice, one week after each injection of lentivirus vectors into the brain, but this does not abolish transgene expression. Presumably, the disruption of the BBB during the stereotatic operation allows the lentivirus vector injected into the brain to prime an anti-lentiviral neutralizing antibody response. The antibody titer increased with the number of injection, and indeed, no circulating antibodies were detected before injection of vector and therefore could not be the consequence of a pre-existing infection with wild type rhabdovirus.

The severity and risk of deleterious immune responses and other toxic side effects are both dependent on vector dose. Here, the dose of lentiviral vector injected into the brain (20 ng of p24 protein) was sufficiently high to elicit weak cellular and humoral responses (the animals seroconverted after two or three injections), but three injections of vector could be given without loss of transgene expression. As demonstrated for adenoviral vectors (Lowenstein and Castro, 2002), there may be a threshold level for lentiviral particles: doses of lentivirus below this threshold may cause reversible cytokine and cellular-mediated inflammation; doses above this threshold may elicit a stronger humoral response, chronic inflammation, significant cytotoxicity and eventually lead to a decline in transgene expression. The doses we administered were presumably below this threshold because transgene expression was not abolished. To test for the existence of such a threshold, pseudotyped lentiviral vectors were injected in the presence of very large amounts of circulating anti-G neutralizing antibodies (several dozens of I.U) obtained by pre-immunization of mice by peripheral intraperitoneal injection Mokola wild-type virus. Further injection of MOK-pseudotyped pTrip-PGK-GFP vector significantly induced the humoral memory response in the pre-immune animals, as assessed by the increase of neutralizing anti-G antibodies. Nevertheless, striatal cells were effectively transduced in the injected brain areas, and there was no correlation between humoral immune response and expression level. This is confirmed by Abordo-Adesida et al (Abordo-Adesida et al., 2005), showing that systemic immunization preceding injection of lentiviral vectors into the CNS determined that preexisting anti-lentiviral immunity, regardless of the transgene, did not affect transgene expression.

It appears, therefore, that pre-existing immunity to the lentivirus does not preclude efficient transduction

with the viral vector. Repeated and effective administration of these viral vectors into the CNS should therefore be possible. We believe that *in vivo* transduction is not neutralized because there is no contact between the viral antigens and neutralizing antibodies during the stereotatic injection. Note that MOK-pseudotyped vectors are correctly recognized and neutralised by systemic antibodies formed against the G protein of wild type Mokola virus. Moreover, systemic anti-MOK antibodies are not neutralizing for other pseudotypes and were unable to neutralize VSV-G pseudotyped vectors in our cross-presentation study.

The vector load is a major issue for gene therapy applications. Transgene expression needs to be high for clinical use of lentiviral vectors in the CNS. Optimizing the transgene expression could allow lower viral loads to be administered and thus reduce vector-associated toxicity. The pseudotyped HIV-1 derived vectors we used have various biosafety properties: they carry the central DNA flap sequence that stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain by improving nuclear import of the preintegration complex (Zennou et al., 2001) resulting in increased transgene expression. Combining several regulatory elements into the vector may enhance expression levels by more than the sum of the individual components. Baekelandt V et al. (Baekelandt et al., 2002) showed that the DNA flap and the posttranscriptional *cis*-acting regulatory element of woodchuck hepatitis virus (WPRE), an element that increases transgene expression by stimulating various steps of RNA processing (Zufferey et al., 1999), had a synergistic effect. Likewise, in recent work, combinations of posttranscriptional regulatory elements successfully enhanced gene expression from HIV-derived vectors (Brun et al., 2003). Thus, to improve the performance of lentiviral vectors, posttranscriptional regulation, as well as posttranslational regulation, of gene expression should be optimized by the design of gene delivery systems.

In summary, a single injection of lentivirus vectors into the brain lead to weak cellular and humoral immune responses, whatever the pseudotype of the vector. The immune responses increased with the number of injections, but did not prevent lentivirus infection of cells or abolish transgene expression. Likewise, pre-existing immunity to lentivirus does not preclude efficient transduction with the viral vector and does not impede the potential readministration of viral vectors into the CNS. Thus, lentiviral vectors pseudotyped by the envelope of Mokola appear to be suitable for multiple injections, in particular when glial tropism is sought. This is a valuable attribute for clinical use particularly in situations where patients can benefit from several interventions.

AKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by fellowships from the Association Française contre les Myopathies (to C.Sarkis) and Vaincre les Maladies Lysosomales (to C. Serguera), and by grants from the Association Française contre les Myopathies, Institut de Recherche sur la Moelle Epinière, Rétina France and Centre National de la Recherche Scientifique.

We thank Marie-Christine Prévost and Christine Schmitt for gold immunolabelling experiment and electron microscopy. We thank Christophe Pencole and Sylvie Carpaye for their help with animal maintenance and experimentation. We are grateful to Flavie Luciani and Aurélie de Malibrant for their technical assistance.

REFERENCES

1. **Abordo-Adesida, E., A. Follenzi, C. Barcia, S. Sciascia, M. G. Castro, L. Naldini, and P. R. Lowenstein.** 2005. Stability of lentiviral vector-mediated transgene expression in the brain in the presence of systemic antivector immune responses. *Hum Gene Ther* **16**:741-51.
2. **Baekelandt, V., A. Claeys, K. Eggermont, E. Lauwers, B. De Strooper, B. Nuttin, and Z. Debyser.** 2002. Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Hum Gene Ther* **13**:841-53.
3. **Bahloul, C., Y. Jacob, N. Tordo, and P. Perrin.** 1998. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* **16**:417-25.
4. **Balliet, J. W., and P. Bates.** 1998. Efficient infection mediated by viral receptors incorporated into retroviral particles. *J Virol* **72**:671-6.
5. **Barkats, M., S. Millecamps, P. Abrioux, M. C. Geoffroy, and J. Mallet.** 2000. Overexpression of glutathione peroxidase increases the resistance of neuronal cells to Abeta-mediated neurotoxicity. *J Neurochem* **75**:1438-46.
6. **Bensadoun, J. C., N. Deglon, J. L. Tseng, J. L. Ridet, A. D. Zurn, and P. Aebischer.** 2000. Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp Neurol* **164**:15-24.
7. **Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-3.
8. **Berkowitz, R., H. Ilves, W. Y. Lin, K. Eckert, A. Coward, S. Tamaki, G. Veres, and I. Plavec.** 2001. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *J Virol* **75**:3371-82.
9. **Blomer, U., L. Naldini, T. Kafri, D. Trono, I. M. Verma, and F. H. Gage.** 1997. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* **71**:6641-9.
10. **Bromberg, J. S., L. A. Debruyne, and L. Qin.** 1998. Interactions between the immune system and gene therapy vectors: bidirectional regulation of response and expression. *Adv Immunol* **69**:353-409.
11. **Brun, S., N. Faucon-Biguët, and J. Mallet.** 2003. Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implications for gene therapy. *Mol Ther* **7**:782-9.
12. **Burns, J. C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, and J. K. Yee.** 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8033-7.
13. **Byrnes, A. P., R. E. MacLaren, and H. M. Charlton.** 1996. Immunological instability of persistent adenovirus vectors in the brain: peripheral exposure to vector leads to renewed inflammation, reduced gene expression, and demyelination. *J Neurosci* **16**:3045-55.
14. **Byrnes, A. P., J. E. Rusby, M. J. Wood, and H. M. Charlton.** 1995. Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neuroscience* **66**:1015-24.
15. **Castellanos, J. E., M. Martinez, O. Acosta, and H. Hurtado.** 2000. Nerve growth factor and neurotrophin-3 modulate the rabies infection of adult sensory neurons in primary cultures. *Brain Res* **871**:120-6.
16. **Chan, S. Y., R. F. Speck, M. C. Ma, and M. A. Goldsmith.** 2000. Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *J Virol* **74**:4933-7.
17. **Chazal, N., G. Singer, C. Aiken, M. L. Hammarskjöld, and D. Rekosh.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 particles pseudotyped with envelope proteins that fuse at low pH no longer require Nef for optimal infectivity. *J Virol* **75**:4014-8.
18. **Chirmule, N., K. Propert, S. Magosin, Y. Qian, R. Qian, and J. Wilson.** 1999. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**:1574-83.
19. **Corbeau, P., G. Kraus, and F. Wong-Staal.** 1998. Transduction of human macrophages using a stable HIV-1/HIV-2-derived gene delivery system. *Gene Ther* **5**:99-104.
20. **Cornet, A., E. Bettelli, M. Oukka, C. Cambouris, V. Avellana-Adalid, K. Kosmatopoulos, and R. S. Liblau.** 2000. Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *J Neuroimmunol* **106**:69-77.
21. **de Almeida, L. P., D. Zala, P. Aebischer, and N. Deglon.** 2001. Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **8**:433-46.
22. **Denesvre, C., C. Carrington, A. Corbin, Y. Takeuchi, F. L. Cosset, T. Schulz, M. Sitbon, and P. Sonigo.** 1996. TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions. *J Virol* **70**:4380-6.
23. **Desmaris, N., A. Bosch, C. Salaun, C. Petit, M. C. Prevost, N. Tordo, P. Perrin, O. Schwartz, H. de Rocquigny, and J. M. Heard.** 2001. Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. *Mol Ther* **4**:149-56.
24. **Engelstadter, M., C. J. Buchholz, M. Bobkova, S. Steidl, H. Merget-Millitzer, R. A. Willemsen, J. Stitz, and K. Cichutek.** 2001. Targeted gene transfer to lymphocytes using murine leukaemia virus vectors pseudotyped with spleen necrosis virus envelope proteins. *Gene Ther* **8**:1202-6.
25. **Feiden, W., U. Feiden, L. Gerhard, V. Reinhardt, and A. Wandeler.** 1985. Rabies encephalitis: immunohistochemical investigations. *Clin Neuropathol* **4**:156-64.

26. **Foggin, C. M.** 1982. Atypical rabies virus in cats and a dog in Zimbabwe. *Vet Rec* **110**:338.
27. **Gaudin, Y., R. W. Ruigrok, C. Tuffreau, M. Knossow, and A. Flamand.** 1992. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* **187**:627-32.
28. **Halbert, C. L., E. A. Rutledge, J. M. Allen, D. W. Russell, and A. D. Miller.** 2000. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* **74**:1524-32.
29. **Harrison, A. K., and F. A. Murphy.** 1978. Lyssavirus infection of muscle spindles and motor end plates in striated muscle of hamsters. *Arch Virol* **57**:167-75.
30. **Hart, M. N., and Z. Fabry.** 1995. CNS antigen presentation. *Trends Neurosci* **18**:475-81.
31. **Indraccolo, S., S. Minuzzo, F. Feroli, F. Mammano, F. Calderazzo, L. Chieco-Bianchi, and A. Amadori.** 1998. Pseudotyping of Moloney leukemia virus-based retroviral vectors with simian immunodeficiency virus envelope leads to targeted infection of human CD4+ lymphoid cells. *Gene Ther* **5**:209-17.
32. **Iwasaki, Y., and H. F. Clark.** 1975. Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. II. Experimental rabies in mouse. *Lab Invest* **33**:391-9.
33. **Kafri, T., U. Blomer, D. A. Peterson, F. H. Gage, and I. M. Verma.** 1997. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* **17**:314-7.
34. **Kahl, C. A., J. Marsh, J. Fyffe, D. A. Sanders, and K. Cornetta.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Ross River virus and Semliki Forest virus. *J Virol* **78**:1421-30.
35. **Kang, Y., C. S. Stein, J. A. Heth, P. L. Sinn, A. K. Penisten, P. D. Staber, K. L. Ratliff, H. Shen, C. K. Barker, I. Martins, C. M. Sharkey, D. A. Sanders, P. B. McCray, Jr., and B. L. Davidson.** 2002. In vivo gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins. *J Virol* **76**:9378-88.
36. **Kobinger, G. P., D. J. Weiner, Q. C. Yu, and J. M. Wilson.** 2001. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol* **19**:225-30.
37. **Lamas, C. C., A. J. Martinez, R. Baraff, and J. Bajwa.** 1980. Rabies encephaloradiculomyelitis. Case report. *Acta Neuropathol (Berl)* **51**:245-7.
38. **Le Gall, S., M. C. Prevost, J. M. Heard, and O. Schwartz.** 1997. Human immunodeficiency virus type I Nef independently affects virion incorporation of major histocompatibility complex class I molecules and virus infectivity. *Virology* **229**:295-301.
39. **Lentz, T. L., T. G. Burrage, A. L. Smith, and G. H. Tignor.** 1983. The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus. *Yale J Biol Med* **56**:315-22.
40. **Lowenstein, P. R., and M. G. Castro.** 2002. Progress and challenges in viral vector-mediated gene transfer to the brain. *Curr Opin Mol Ther* **4**:359-71.
41. **Lyles, D. S., M. McKenzie, and J. W. Parce.** 1992. Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *J Virol* **66**:349-58.
42. **Mastakov, M. Y., K. Baer, C. W. Symes, C. B. Leichtlein, R. M. Kotin, and M. J. During.** 2002. Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain. *J Virol* **76**:8446-54.
43. **Mazarakis, N. D., M. Azzouz, J. B. Rohll, F. M. Ellard, F. J. Wilkes, A. L. Olsen, E. E. Carter, R. D. Barber, D. F. Baban, S. M. Kingsman, A. J. Kingsman, K. O'Malley, and K. A. Mitrophanous.** 2001. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum Mol Genet* **10**:2109-21.
44. **Millecamps, S., H. Kiefer, V. Navarro, M. C. Geoffroy, J. J. Robert, F. Finiels, J. Mallet, and M. Barkats.** 1999. Neuron-restrictive silencer elements mediate neuron specificity of adenoviral gene expression. *Nat Biotechnol* **17**:865-9.
45. **Miller, A. D., J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson, and M. V. Eiden.** 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* **65**:2220-4.
46. **Mitrophanous, K., S. Yoon, J. Rohll, D. Patil, F. Wilkes, V. Kim, S. Kingsman, A. Kingsman, and N. Mazarakis.** 1999. Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther* **6**:1808-18.
47. **Mochizuki, H., J. P. Schwartz, K. Tanaka, R. O. Brady, and J. Reiser.** 1998. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol* **72**:8873-83.
48. **Nakajima, T., K. Nakamaru, E. Ido, K. Terao, M. Hayami, and M. Hasegawa.** 2000. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther* **11**:1863-74.
49. **Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, and D. Trono.** 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**:263-7.
50. **Navarro, V., S. Millecamps, M. C. Geoffroy, J. J. Robert, A. Valin, J. Mallet, and G. L. Gal La Salle.** 1999. Efficient gene transfer and long-term expression in neurons using a recombinant adenovirus with a neuron-specific promoter. *Gene Ther* **6**:1884-92.
51. **Parveen, Z., M. Mukhtar, M. Rafi, D. A. Wenger, K. M. Siddiqui, C. A. Siler, B. Dietzschold, R. J. Pomerantz, M. J. Schnell, and R. Dornburg.** 2003. Cell-type-specific gene delivery into neuronal cells in vitro and in vivo. *Virology* **314**:74-83.

52. **Perrin, P., M. Tino de Franco, C. Jallet, F. Fouque, S. Morgeaux, N. Tordo, and J. H. Colle.** 1996. The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses. *Res Virol* **147**:289-99.
53. **Perrin, P., P. Versmisse, J. F. Delagneau, G. Lucas, P. E. Rollin, and P. Sureau.** 1986. The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA; advantages of purified glycoprotein over whole virus. *J Biol Stand* **14**:95-102.
54. **Poeschla, E. M., F. Wong-Staal, and D. J. Looney.** 1998. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* **4**:354-7.
55. **Ray, N. B., C. Power, W. P. Lynch, L. C. Ewalt, and D. L. Lodmell.** 1997. Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. *Arch Virol* **142**:1011-9.
56. **Reiser, J.** 2000. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther* **7**:910-3.
57. **Sarkis, C., C. Serguera, S. Petres, D. Buchet, J. L. Ridet, L. Edelman, and J. Mallet.** 2000. Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:14638-43.
58. **Schlegel, R., M. C. Willingham, and I. H. Pastan.** 1982. Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *J Virol* **43**:871-5.
59. **Schmitz, H., R. Wigand, and W. Heinrich.** 1983. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* **117**:455-66.
60. **Schneider, L. G.** 1969. [The rabies pathogenesis in mice. II. Spread of virus in the CNS]. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **212**:1-13.
61. **Sugamata, M., M. Miyazawa, S. Mori, G. J. Spangrude, L. C. Ewalt, and D. L. Lodmell.** 1992. Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. *J Virol* **66**:1252-60.
62. **Thomas, C. E., G. Schiedner, S. Kochanek, M. G. Castro, and P. R. Lowenstein.** 2000. Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7482-7.
63. **Thoulouze, M. I., M. Lafage, M. Schachner, U. Hartmann, H. Cremer, and M. Lafon.** 1998. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* **72**:7181-90.
64. **Tuffereau, C., J. Benejean, D. Blondel, B. Kieffer, and A. Flamand.** 1998. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo J* **17**:7250-9.
65. **Varnavski, A. N., Y. Zhang, M. Schnell, J. Tazelaar, J. P. Louboutin, Q. C. Yu, A. Bagg, G. P. Gao, and J. M. Wilson.** 2002. Preexisting immunity to adenovirus in rhesus monkeys fails to prevent vector-induced toxicity. *J Virol* **76**:5711-9.
66. **Watson, H. D., G. H. Tignor, and A. L. Smith.** 1981. Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. *J Gen Virol* **56**:372-82.
67. **Wood, M. J., A. P. Byrnes, D. W. Pfaff, S. D. Rabkin, and H. M. Charlton.** 1994. Inflammatory effects of gene transfer into the CNS with defective HSV-1 vectors. *Gene Ther* **1**:283-91.
68. **Wood, M. J., H. M. Charlton, K. J. Wood, K. Kajiwara, and A. P. Byrnes.** 1996. Immune responses to adenovirus vectors in the nervous system. *Trends Neurosci* **19**:497-501.
69. **Zennou, V., C. Serguera, C. Sarkis, P. Colin, E. Perret, J. Mallet, and P. Charneau.** 2001. The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* **19**:446-50.
70. **Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono, and T. J. Hope.** 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**:2886-92.
71. **Zufferey, R., D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini, and D. Trono.** 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**:871-5.

LEGENDS TO TABLES AND FIGURES

TABLE 1

Titration of stocks of pseudotyped lentiviral vectors determined by p24 ELISA. Titers are expressed in ng of p24 per microlitre of concentrated vector. Stocks of VSV, MOK or PV-pseudotyped vectors were prepared and titrated simultaneously for each vector.

TABLE 2

G protein assays. G protein was assayed by quantitative western blot (see figure 1). The total amount of G per vector was normalised to the p24 concentration.

TABLE 3

Diffusion and expression of pseudotyped lentiviral vectors. Aliquots (20ng of p24) of VSV, MOK or PV-pseudotyped vectors (n=2 for MOK and VSV and n=3 for PV) were injected into the striatum of mice. The diffusion of the vector was calculated by counting of the number of brain sections in which GFP expression was detected and by multiplying it by 20 (as the thickness of the sections is 20 μ m). The relative efficiency of transduction was estimated by scoring the intensity of expression for each section and summing the total scores for each brain (semi-quantification). The relative results are shown in the third column.

TABLE 4

Semi-quantitative (sm) and diffusion (d) analysis expression of GFP transgene.

The semi-quantification was performed by scoring the intensity of expression for each section and summing the total scores for each brain.

The diffusion of the vector was calculated by counting of the number of brain sections in which GFP expression was detected and by multiplying it by 20 (as the thickness of the sections is 20 μ m).

Values are the means for 2 experiments (single-injected and double-injected groups with VSV (VSV) and Mokola (Mok) pseudotyped lentiviral vectors) and 1 experiment (triple-injected group). SNC: substantia nigra pars compacta

TABLE 5

Semi-quantitative analysis of the cellular immune response in the VSV, Mok, VSV/VSV, Mok/Mok groups, VSV/VSV/VSV and Mok/Mok/Mok groups (n=1 for each group). The relative expression of CD4+ and CD8+ cells was estimated by scoring the intensity of expression for each section and summing the total scores for each brain

(semi-quantification). See illustrations for each level in Figure 2: (-) in 3.c; (+/-) in 1.; (+) in 2.b; (++) in 2.a and (+++) in 3.e

FIGURE 1

Quantitative western blot of VSV-G, MOK-G and PV-G. Various amounts of purified VSV-G and PV-G and of VSV and PV pseudotyped vectors were run on a gel. The G protein in a wild-type Mokola virus was assayed (see material and methods section), and various amounts of the wild type Mokola virus and of MOK-pseudotyped vectors were run on the gel together. Only the most informative lanes are shown. Purified VSV-G (1 μ g and 0,1 μ g) was run in lane 1 and 2; wild-type Mokola virus containing 10 ng of G in lane 5. One and 0,5 μ l of VSV; 2,5 and 0,5 μ l of MOK-pseudotyped vector stocks were run in lanes 3-4 and 6-7 respectively.

FIGURE 2

In vitro transduction of neural cells with VSV, MOK and PV pseudotyped vectors.

For cell lines, 10^5 cells were infected with each vector (20 ng of p24) and cells were harvested 48 h later. For primary neurones, 10^5 cells were infected with each vector (50 ng of p24) and cells were harvested 24 h later. (A) Percentage of cells expressing GFP after incubation with Trip-CMV-GFP vectors pseudotyped with VSV-G, expressed as the average percentage of cells that were GFP+ cells in two independent transduction experiments \pm SD. (B) Percentage of cells expressing GFP after incubation with Trip-CMV-GFP vectors pseudotyped with MOK-G, expressed as the average percentage of cells that were GFP+ cells in two independent transduction experiments \pm SD. (D) Percentage of primary rat cortical neurones expressing GFP with Trip-CMV-GFP vectors pseudotyped with VSV, MOK or PV-G, expressed as the average percentage of cells that were GFP+ cells in two independent transduction experiments \pm SD.

FIGURE 3

Effect on infection of inhibitors of endosomal acidification. CHP212 cells were incubated with pseudotyped lentiviral vectors (Trip-PGK-GFP-WPRE). One microlitre of concentrated viral stock was incubated with the cells in the presence or absence of inhibitor. (A) Percentage of cells expressing GFP after incubation with pseudotypes in the presence of a 0.1 mM or 0.25 mM chloroquine, expressed as the average percentage of two independent transduction experiments. Results are presented as the percentage of untreated controls (black column). (B) Percentage of cells expressing GFP after incubation with pseudotypes with 5 mM, 15 mM or 30 mM ammonium chloride, expressed as the average percentage of two independent transduction experiments. Results are presented as the percentage of untreated controls (black column).

FIGURE 4

Gene expression in mouse brain after intrastriatal injection of Trip-CMV-GFP vectors pseudotyped with VSV-G and MOK-G. Aliquots of 20 ng of p24 of vector in a total volume of 1 microliter were injected slowly into the brain using a stereotactic apparatus. Animals were killed one week later. Coronal cryosections were stained for GFP using a polyclonal anti-GFP antibody, and slices were counterstained with neutral red. Representative sections are shown for each pseudotype. Intensity of staining and diffusion were similar for VSV and MOK-pseudotyped vectors.

FIGURE 5

Brain cell tropism of Trip-CMV-GFP vectors pseudotyped with VSV-G or MOK-G. Astrocytes were labelled with an anti-GFAP polyclonal antibody (A and C). Transduced astrocytes, in yellow, are visible for the three pseudotypes. Neurone nuclei were labelled with an anti-NeuN monoclonal antibody (B and D). VSV- pseudotypes transduced neurones as demonstrated by the presence of yellow nuclei. MOK-pseudotyped vector did not transduce neurones.

FIGURE 6

Brain cell tropism of Trip-PGK-WPRE vectors pseudotyped with VSV, MOK after injection into the striatum (A-D). Astrocytes were labelled (red) with an anti-GFAP polyclonal antibody (A, C). Both pseudotypes transduced astrocytes (yellow). Neurone nuclei were labelled (red) with an anti-NeuN monoclonal antibody (B, D). VSV- pseudotypes transduced neurones (yellow) whereas MOK-pseudotyped vectors did not. (E) Brain cell tropism of Trip-CMV-GFP vector pseudotyped with MOK-G after injection into the hippocampus. Anti-NeuN immunostaining showing that neurones are not transduced. Transduced astrocytes are recognised morphologically and are visible above and under the neuronal layer.

FIGURE 7

Brain cell tropism of Trip-CMV-GFP-WPRE vectors pseudotyped with Mok after injection into the striatum/
Neurone nuclei were labelled (red) with an anti-NeuN monoclonal antibody (A,C). Mok-CMV-GFP-WPRE vector transduced only few neurons while a strong neuronal transduction was obtained with the Mok-PGK-GFP-WPRE vector (yellow). Astrocytes were labelled (red) with an anti-GFAP polyclonal antibody (B, D). Mok-CMV-GFP-WPRE transduced astrocytes while only very few astrocytes are transduced by the Mok-PGK-GFP-WPRE vector (yellow).

FIGURE 9

Three-dimensional reconstitution of the VSV-PGK-GFP-WPRE-injected brain of *macaca fascicularis*. Injection was performed bilaterally in the putamen. In A, GFP expression in the putamen. In B, anterograde transport of GFP is revealed, indicating major transduction of striatal neurons.

FIGURE 10

Experimental protocol of repeated injections of lentiviral vectors.

FIGURE 11

Study of cellular immune response after single (1.), double (2.) and triple (3.) injections. Immunohistochemical staining for CD4 and CD8 in the striata and substantia nigra of mice 7 days (1.), 37 days (2.) and 67 days (3.) after stereotatic injection of Mok-CMV-GFP or VSV-CMV-GFP lentiviral injection. The numbers of CD4+ (black arrows) and CD8+ cells (black arrowheads) increased with the numbers of injection, for both Mok-G and VSV-G pseudotyped vectors. Scale bar: 135 μ m (1., 2., 3.a, d, e, f) and 270 μ m (3.b, c). The semi-quantitative analysis is presented in table 2.

FIGURE 12

Study of humoral memory response after repeated injections.

Neutralizing anti-G antibodies were determined as described in Material and Methods after single (open bars and light stippled bars), double (light dotted bars and dark stippled bars) and triple (dark dotted bars and solid bars) injections of pseudotyped lentiviral vectors (VSV and Mokola). Data represent means \pm SEM for three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared to single-injected group, and o $p < 0.05$, compared to the double-injected group.

FIGURE 13

a) Experimental protocol of lentiviral injection into pre-immunized mice striatum.

b) Study of memory humoral response.

Neutralizing anti-G antibodies were determined as described in Material and Methods 26 days after intraperitoneal injection of three doses of inactivated Mokola virus (0,2 μ g, 1 μ g and 5 μ g) and 14 days after injection of Mok-PGK-GFP lentiviral vector into pre-immunized mice striatum.

Data are representative of five independent experiments and expressed as the means \pm SEM. * $p < 0.05$, statistically different from control group, $p < 0.05$ different from the lower dose of vaccine.

FIGURE 14

Semi-quantitative analysis of GFP expression in pre-immunized mice with four different doses of vaccine, 14 days after lentiviral injection.

The semi-quantification of GFP expression was performed by scoring the intensity of expression for each section and summing the total scores for each striatum (n=5 for each dose). Transduction of striatal cells was equally effective independent of the quantity of inactivated vaccine initially injected.

Article 2 : La sécrétion locale de GDNF par les astrocytes striataux transduits par un vecteur lentiviral protège la voie nigrostriée sans formation de sprouting ectopique et délétère.

Local Secretion of GDNF by Lentivirally Transduced Striatal Astrocytes Protects Nigrostriatal Pathway Without Generation of Deleterious Ectopic Sprouting.

H. Mammeri, N. Hanoun, M. Hamon, C. Sarkis and J. Mallet.

En préparation

I. Contexte scientifique

Lorsqu'en 2002 cette étude fut lancée, différents groupes, dont le nôtre, avaient démontré le potentiel de la stratégie thérapeutique fondée sur l'utilisation du GDNF, soit par injection de la protéine purifiée soit par transfert de gène codant le GDNF. Les travaux effectués dans les modèles animaux de la MP avaient permis de mettre en évidence les propriétés neurotrophiques, neuroprotectrices et régénératrices du GDNF et de les mettre à profit pour protéger la voie nigrostriée et obtenir une récupération fonctionnelle. Stratégie nouvelle et excitante, la thérapie génique est apparue comme une approche prometteuse de transfert du GDNF dans le cerveau et une alternative à l'injection directe de la protéine.

Un grand nombre d'études ont été centrées sur l'optimisation de cette stratégie avec des résultats prometteurs. Toutefois, des publications émanant du groupe d'Anders Bjorklund ont mis en évidence une limite rencontrée par l'utilisation des vecteurs lentiviraux pseudotypés par l'enveloppe de VSV et des vecteurs AAV (Kirik et al., 2000a ; Georgievska et al., 2002b). Le tropisme majoritairement neuronal de ces vecteurs cible l'expression du GDNF aux neurones striataux. Or, ces neurones projetant dans le GP, le NEP et la SN, le GDNF y produit un sprouting des fibres dopaminergiques qui innervent ces zones. Le sprouting aberrant induit dans le NEP et la SN a un effet négatif sur la récupération fonctionnelle (Georgievka et al., 2002b).

Zones de projection des neurones striataux.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le striatum est composé de différents types de neurones (pour une revue exhaustive, lire Parent & Hazrati, 1995a, b, c). Parmi ceux-ci,

les neurones majoritaires sont des neurones épineux de taille moyenne. Ces neurones striataux projettent dans différentes zones cérébrales soit par la voie « directe », dans le GP, le NEP et la SNr (le GPe, le GPi et la SNr chez le primate) soit par la voie « indirecte » vers le GP (le GPe chez le primate). Ces trois cibles sont spécifiquement sous l'influence de l'une des régions du striatum : la zone dorso-médiane sensorimotrice, la zone dorso-latérale associative et la zone ventrale limbique. Le GP et la NEP reçoivent majoritairement une contribution de la zone sensorimotrice par rapport à la zone associative, alors que l'inverse est retrouvé pour la SNr. Le NEP serait donc lié aux traitements des informations motrices alors que la SNr serait liée aux traitements des informations associatives.

Ces deux structures forment les zones de sortie des ganglions de la base et semblent impliquées dans les symptômes de la MP, par la sur-activation des neurones GABAergiques consécutives à la perte des neurones dopaminergiques innervant le striatum. Par ailleurs, la lésion ou la stimulation à haute fréquence du GPi/NEP aboutissent à l'arrêt des bradykinésies et des dyskinésies induites par la prise de L-dopa (Olanow and Obeso, 2000), suggérant un rôle important de ces noyaux dans la survenue et le contrôle des symptômes de la MP.

Le GP, le NEP et la SNr reçoivent une innervation dopaminergique par les neurones de la SNc, qui jouent un rôle dans la modulation de la transmission synaptique dans ces aires. Le transport du GDNF au sein de ces structures entraîne la formation de sprouting de ces fibres dopaminergiques. Alors que le sprouting au sein du GP ne semble pas empêcher la récupération fonctionnelle, il semble que celui touchant le NEP et la SNr ait des effets négatifs (Kirik et al., 2000 ; Georgievska et al., 2002). Il est donc primordial de prévenir l'apparition de sprouting dans ces zones pour obtenir un effet thérapeutique par TG.

La dispersion de la protéine dans des zones ectopiques est un problème majeur. Il n'est en effet pas cliniquement concevable qu'une molécule ayant des effets aussi puissants puisse se disperser dans le cerveau et ainsi désorganiser la communication neuronale dans des zones ectopiques. Dans le but d'empêcher la génération ectopique de sprouting dans les zones de projection des neurones striataux, nous nous sommes proposés de restreindre l'expression du GDNF aux astrocytes striataux en utilisant les vecteurs décrits dans l'article I. Cette stratégie permettrait ainsi de prévenir le transport axonal de la protéine. Dans un premier temps, la distribution cérébrale du facteur a été étudiée. Dans un second temps, l'effet du ciblage astrocytaire de la synthèse de GDNF sur la protection de la voie nigrostriée contre la dégénérescence induite par l'injection de 6-OHDA a été évalué.

Nous avons préalablement démontré que la combinaison pCMV et enveloppe Mok permettait une transduction majoritaire des astrocytes (article I). Cette propriété a été utilisée

pour restreindre l'expression du GDNF aux astrocytes striataux et ainsi prévenir la dispersion du GDNF dans le cerveau.

II. Résultats

II.1. Vecteurs lentiviraux pseudotypés par Mokola codant le GDNF

Des vecteurs lentiviraux codant le GDNF placé sous le contrôle de pCMV (Mok-GDNF) ont été construits et leur capacité à produire du GDNF a été testée *in vitro* après infection de cellules C6 et *in vivo* après injection dans le striatum de rats.

In vitro, la transduction de cellules C6 avec des dilutions différentes de vecteurs permet une synthèse de GDNF importante (jusqu'à 15 ng en 24 h) (données non présentées). Il est intéressant de noter qu'une forte synthèse de GDNF est obtenue pour une dose faible de vecteur (20 ng de p24), indiquant que ces vecteurs sont très efficaces.

In vivo, après injection intrastriatale de Mok-GDNF, une synthèse efficace de GDNF est mesurée 10 jours après injection (2,5 ng par mg de tissu) pour une faible dose de 30 ng de p24 de vecteur injectée (table I). Cette synthèse diminue ensuite pour atteindre un plateau à environ 1,5 ng par mg de tissu. Il est important d'observer que l'expression du GDNF perdure pendant au moins un an. Ces résultats démontrent que les vecteurs Mok-GDNF permettent une synthèse de GDNF efficace et à long terme.

II.2. thérapie génique

a) protocole de thérapie génique

Le protocole que nous avons utilisé permet de mettre à profit les propriétés neuroprotectrices et neurorégénératives du GDNF, sans toutefois pouvoir les discerner. Les vecteurs Mok-GDNF ou Mok-GFP ont été injectés dans le striatum de rats 10 jours avant une injection intrastriatale de 6-OHDA, qui conduit à la dégénérescence rétrograde des neurones dopaminergiques de la SN. Ces animaux ont été maintenus en vie pendant 16 ou 52 semaines : Un premier groupe d'animaux a été testé pour son comportement moteur induit par injection d'amphétamine une fois par mois. Au bout de 16 semaines, les animaux ont été sacrifiés pour effectuer un dosage par HPLC des taux de DA, DOPAC et HVA présents dans leur striatum. Parallèlement, un dosage par ELISA des taux de GDNF dans le striatum et la SN a été réalisé. Un second groupe d'animaux a été sacrifié à 16 semaines en vue d'études immunohistologiques. Enfin, un troisième d'animaux a été maintenu en vie pendant 52 semaines afin d'étudier la longévité de l'expression du GDNF par dosage ELISA.

b) Distribution du GDNF au sein des ganglions de la base

La quantification du GDNF dans la SN après injection de Mok-GDNF a été réalisée par dosage ELISA, à 10 jours, 16 et 52 semaines après injection. Aucune différence n'a été retrouvée entre les animaux injectés avec Mok-GDNF et les animaux contrôles (injectés avec Mok-GFP et non injectés), ce qui sous tend qu'aucun transport axonal significatif du GDNF n'est détecté (table I).

Pour étudier plus finement la distribution du GDNF au sein des ganglions de la base, des immunohistochimies dirigées contre le GDNF ont été réalisées (fig. 1). Un marquage intense de GDNF est retrouvé dans l'ensemble du striatum dans sa partie rostrale et médiane (fig. 1A). Le marquage diffus révèle la présence extracellulaire de GDNF (fig. 1F). Au niveau du site d'injection, de nombreuses cellules exprimant le GDNF sont retrouvées (fig. 1F). Plus caudalement, le marquage s'éteint au niveau du striatum et est retrouvé au niveau du GP (fig. 1B). Un marquage faible et diffus est retrouvé au niveau du NEP (fig. 1c-1G) et de la SN (fig. 1D-1H) chez les animaux présentant de forts taux de GDNF striataux, indiquant un transport antérograde de GDNF. Quelques neurones isolés dans la SN sont marqués positivement (fig. 1H), indiquant un transport rétrograde de la protéine du striatum à la SN. Du côté intact contralatéral à l'injection, aucun marquage positif pour le GDNF n'est détecté dans le striatum (fig. 1E), dans le GP, le NEP et la SN (données non présentées). De même, chez les animaux injectés avec le vecteur Mok-GFP, aucun marquage positif n'est retrouvé dans ces zones (données non présentées). Ces données suggèrent que le GDNF est fortement exprimé au sein du striatum et qu'il est transporté rétrogradement et antérogradement vers les zones de projection des neurones striataux dans lesquelles il est présent à l'état de traces, indétectables par dosage ELISA.

c) Protection de la voie nigrostriée

Afin d'étudier l'effet de l'expression par les astrocytes striataux du GDNF sur la protection de la voie nigrostriée, des marquages immunohistochimiques dirigés contre la TH ont été réalisés sur des sections correspondant au striatum, au GP, au NEP et la SN. Au niveau du striatum, la protection de l'innervation a été quantifiée après analyse densitométrique. Au niveau de la SN, la protection des neurones dopaminergiques a été quantifiée par comptage direct des neurones dans chaque groupe.

Chez les animaux contrôles injectés avec Mok-GFP, l'injection de 6-OHDA a entraîné la perte de 73% des neurones de la SN (Fig. C) et la dégénérescence de 70% des fibres dopaminergiques striatales (Fig. 3A) en comparaison avec le côté intact contralatéral à la lésion (fig. 2C, D). Par ailleurs, une forte dégénérescence des fibres dopaminergiques du GP (Fig. 3H-K), du NEP (Fig. 4A-D) et de la SNr (fig. 2C') a été observée.

En revanche, chez les animaux traités par Mok-GDNF, une protection significative a été obtenue. En effet, la dégénérescence ne touche que 37% des neurones dopaminergiques (Fig. 2A, D) et 40% des fibres dopaminergiques du striatum (fig. 3B-F). Par ailleurs, une conservation des fibres au niveau du GP (Fig. 3I-L), NEP (Fig. 4B-E) et SNr (Fig. 2A') a été obtenue. Dans le striatum, le GDNF produit un sprouting des fibres dopaminergiques (Fig 3F, flèches). Dans le GP, un intense sprouting des fibres dopaminergiques a été généré par le GDNF (Fig 3I-L). En revanche, malgré une légère détection de GDNF dans le NEP et la SNr, les fibres dopaminergiques protégées semblent organisées et aucun sprouting aberrant ou excessif n'a été observé (Fig 4E comparer avec 4F, Fig. 2A' comparer avec 2B').

Ces résultats démontrent que la restriction de la synthèse de GDNF par les astrocytes permet de protéger la voie nigrostriée de la dégénérescence induite par la 6-OHDA, sans génération de sprouting délétère.

d) Effet du GDNF sur le maintien de l'homéostasie de la DA

Afin d'évaluer l'impact de la synthèse astrocytaire de GDNF sur l'homéostasie dopaminergique, des dosages des taux striataux de DA, DOPAC et HVA ont été effectués, 16 semaines après lésion. Les résultats nous montrent que le traitement permet une conservation de 60% de la production de DA chez les animaux traités contre 27% chez les animaux contrôles (Fig 5A). Par ailleurs, les ratios DOPAC/ DA et HVA/DA, indicateurs de l'état du métabolisme de la DA pour maintenir l'homéostasie de la DA (Zigmond et al., 1990) ont été calculés (Fig. 5B-C). Chez les animaux non traités, les deux indicateurs sont augmentés significativement par rapport aux contrôles non lésés, ce qui suggère une compensation de la perte neuronale par l'augmentation du métabolisme de la DA par les neurones restants. Après quatre mois, la perte neuronale est trop importante pour obtenir une compensation efficace et le métabolisme est donc maintenu à un niveau élevé. En revanche, chez les animaux traités par Mok-GDNF, des valeurs physiologiques sont obtenues, ce qui suggère qu'après 16 semaines, le système serait totalement compensé et qu'il n'y a plus de nécessité d'optimiser le métabolisme de la DA afin de compenser la perte neuronale.

Ces données indiquent que le traitement par Mok-GDNF permet une conservation de la production de DA et que son niveau de production est suffisant pour compenser efficacement la perte des neurones de la SN.

e) correction du comportement moteur

Pour déterminer si la protection de la voie nigrostriée et le maintien de l'homéostasie de la DA sont suffisants pour induire une récupération motrice, le comportement rotatoire induit par l'injection d'amphétamine a été évalué pendant 16 semaines (Fig. 6). Quatre semaines après la lésion, une réduction importante de l'asymétrie motrice a été observée chez les animaux traités en comparaison avec les animaux contrôles. Une diminution de l'asymétrie motrice a été ensuite observée pour les deux groupes. Dans le cas des animaux traités, à partir de 8 semaines, une correction complète de l'asymétrie motrice a été obtenue et s'est maintenue jusqu'à au moins 16 semaines. Malgré une réduction significative de l'asymétrie chez les animaux contrôles, le déficit comportemental s'est stabilisé à une valeur élevée indiquant que les animaux restent fortement lésés.

Ces résultats montrent que la synthèse astrocytaire de GDNF permet une récupération totale et stable du comportement moteur.

III. Conclusion

Dans cette étude, nous montrons que l'injection intrastriatale d'un vecteur pseudotypé par l'enveloppe du virus de Mokola et codant le GDNF permet de restreindre la libération du GDNF au striatum et au GP. Un transport résiduel dans le NEP et la SN a été mis en évidence. Ceci pourrait être dû à un transport axonal, soit après recapture du GDNF par les neurones, soit directement par des neurones transduits par le vecteur. En effet, nous avons montré que quelques neurones étaient transduits par ces vecteurs (article I). Néanmoins, le point important repose sur le fait que les faibles quantités de GDNF transportées dans ces zones ne semblent pas générer de sprouting aberrant, ce qui diffère fortement du transport de la protéine dans le cadre de l'utilisation des vecteurs AAV et lentiviraux pseudotypés par VSV.

L'injection de Mok-GDNF dans un modèle de la MP permet de protéger les neurones et les fibres dopaminergiques de la voie nigrostriée. Cette protection est partielle (environ 60%) mais permet une récupération totale du comportement moteur. Ceci peut être dû au fait que l'atteinte du système nigrostrié est compensée efficacement comme le démontre le retour à des valeurs normales des indices du métabolisme dopaminergique.

En conclusion, l'utilisation d'un vecteur lentiviral codant le GDNF pseudotypé par l'enveloppe Mokola permet de prévenir la dégénérescence de la voie nigrostriée et les déficits moteurs engendrés tout en évitant la génération de sprouting ectopique aberrant.

Local Secretion of GDNF by Lentivirally Transduced Striatal Astrocytes
Protects Nigrostriatal Pathway Without Generation of Deleterious Ectopic
Sprouting

Hamid Mammeri¹, Naima Hanoun², Michel Hamon², Chamsy Sarkis¹ and Jacques Mallet¹.

¹ Unité Mixte de Recherche (UMR) 7091, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Pierre et Marie Curie, Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs (LGN), Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 75013, Paris, France.

² Unité Mixte de Recherche U677, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université Pierre et Marie Curie, NeuroPsychoPharmacologie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France

Correspondence should be addressed to Jacques Mallet.

LGN-CNRS UMR 7091, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Bat. CERVI, 83 boulevard de l'hôpital, 75013, Paris, France.

Email : mallet@chups.jussieu.fr

Fax: (33) 01 42 17 75 33

ABSTRACT

GDNF gene therapy using viral vectors has emerged as a promising strategy for the treatment of Parkinson's disease (PD). Nevertheless, since currently used gene transfer vector preferentially transduced neurons, GDNF was transported to projection areas of neurons, generating aberrant ectopic sprouting, which raised the question of their suitability for neuroprotective gene therapy of PD. Indeed, undesired sprouting in output areas of basal ganglia such as endopeduncular nucleus (EP) or substantia nigra (SN) was shown to be detrimental to functional recovery in rats.

In order to prevent the dispersion of GDNF, its expression was restricted to striatal astrocytes by using a lentiviral vector pseudotyped by the Mokola envelope. Injection of the vector into the striatum induced intense and sustained expression of GDNF for at least one year. GDNF was detected almost exclusively in the striatum and globus pallidus. In contrast to previous studies, only slight residual detection of GDNF was found in EP and SN, insufficient to induce aberrant sprouting.

To test whether astrocytic expression of GDNF protected nigrostriatal pathway, a GDNF-coding lentiviral vector was injected in the striatum of rats prior to 6-OHDA lesion. We showed that nigral dopamine neurons and TH striatal fibers were efficiently protected against 6-OHDA lesion compared to control animals. Protected neurons could synthesise dopamine, sufficiently to induce full restoration of motor behaviour, suggesting a full compensation of the lesion.

Taken together, our results suggested that a lentiviral vector pseudotyped by Mokola would be the most suitable vector to PD neuroprotective gene therapy.

Key words: lentiviral vectors, Mokola, GDNF, astrocytes, striatum, Parkinson's disease, gene therapy

INTRODUCTION

Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) is a powerful and specific neuroprotective agent for dopaminergic neurons (Lin et al., 1993). Numerous studies have demonstrated its high potential in the treatment of Parkinson's disease in rodent and non-human primates, by protecting dopaminergic neurons, enhancing dopaminergic function and inducing dopaminergic fibers sprouting (Gash et al., 1995, 1996; Rosenblad et al., 1998, 1999; Kirik et al., 2000; Iravani et al., 2001; Grondin et al., 2002). Nevertheless, recent clinical trials failed to clearly demonstrate the efficiency of GDNF in PD patients (Nutt et al., 2003; Gill et al., 2003; Patel et al., 2005; Lang et al., 2006). One reason lies on the use of a catheter tip to inject the protein in the brain that

seemed to be a major limit to the action of GDNF (for reviews, Sherer et al., 2006; Dass et al., 2006).

Direct gene transfer of GDNF has appeared as the most efficient strategy to deliver GDNF into the brain and an attractive alternative to the injection of the recombinant protein. GDNF gene therapy in PD animal models was performed using adenoviral vectors (Bilang-Bleuel et al., 1997; Choi-Lundberg et al., 1997), adeno-associated vector {McCown et al., 1996; Mandel et al., 1997; Kirik et al., 2000a ; Mandel et al., 2000} or lentiviral vector (Bensadoun et al., 2000; Kordower et al., 2000; Georgievska et al., 2002a; Georgievska et al., 2002b; Azzouz et al., 2004). Optimal therapeutic effect of GDNF was achieved after striatal injection of GDNF vectors, before the lesion was induced (Bjorklund et al., 1999). Nevertheless, this promising approach faced as major limitation as the vectors transduce numerous neurons (Naldini et al., 1996a; Bensadoun et al., 2000). Consequently, GDNF is anterogradely transported to the projection areas of the striatum: the globus pallidus (GP), the endopeduncular nucleus (EP) and substantia nigra (SN) (Bjorklund et al., 2000; Georgievska et al., 2002b). As a result, the release of GDNF in the areas produced dopaminergic fibers sprouting, which had negative effects on functional recovery in rats (Georgievska et al., 2002a).

To obtain optimal effect of GDNF and to avoid side effects, it seems critical to prevent generation of sprouting induced by the GDNF dispersion in the EN and the SN. This might be achieved by restricting GDNF liberation to the striatum *via* transducing non-neuronal cells. For this purpose, we restricted GDNF expression to astrocytes to prevent axonal transport of GDNF, using high efficient and non immunogenic lentiviral vector (Naldini et al., 1996; Zennou et al., 2001; Georgievska et al., 2002). Astrocytes targeting was obtained by pseudotyping lentiviral vector with the G protein of the lyssavirus Mokola, for which we have previously shown an almost exclusive restriction of expression to astrocytes in mouse, rat and monkey (Brizard et al., submitted).

In that context, this work aimed at studying (1) the effect of astrocytic expression of GDNF by a Mokola pseudotyped-lentiviral vector on the distribution of GDNF throughout the brain and (2) its ability to protect nigrostriatal pathway in a rat model of PD. We showed that this approach allowed efficient protection of the nigrostriatal pathway and complete restoration of the motor behaviour, without generation of ectopic sprouting in striatal neurons projections.

RESULTS

Characterization of Mokola pseudotyped lentiviral vectors

Stocks of Mokola pseudotyped vector expressing GDNF under the control of CMV promoter (Mok-GDNF) were produced as described previously (Brizard et al., submitted). *In vitro* functional characterization of Mok-GDNF was performed by transduction of C6 cells with different dilutions of the vector (20, 5 and 1 ng of p24). ELISA assay on the media revealed synthesis and secretion of GDNF by C6 cells (about 30, 6 and 1.3 ng/ml respectively) whereas no GDNF was detected in non-transduced cells. These results indicated that Mok-GDNF allowed efficient *in vitro* expression of high level of GDNF.

To establish functionality of Mok-GDNF *in vivo*, rats were injected in their striatum with 30 ng of p24 of this vector. As seen in table 1, synthesized GDNF in striatum determined by ELISA assay was 2.2 ng per mg of tissue, ten days after vector injection. These results showed the ability of Mok-GDNF to express high level of GDNF with a low amount of vector *in vivo*. No GDNF was assayed in Mok-GFP injected and non-injected animals (table 1).

Finally, to confirm that Mok vectors induced restriction of expression to astrocytes in the rat brain (Brizard et al., submitted), Mok-GFP was injected into the striatum. One week after injection, animals were sacrificed and cryostat brain sections were performed. Immunohistofluorescence detection was carried out using antibodies against GFP and NeuN (specific to neurons) or GFAP (specific to astrocytes). As shown in figure XXX, Mok-GFP vector induced an intense expression of the GFP protein in striatum. Double staining showed major co-localization of GFP and GFAP staining, demonstrating expression of GFP mainly in astrocytes. Careful analysis revealed that rare neurons were also stained with GFP antibody, suggesting a slight transduction of striatal neurons. Taken together, these data confirmed that Mok-GFP targeted almost exclusively astrocytes in the rat brain when transgene expression was driven by the CMV promoter.

Design of the experimental gene therapy

In order to evaluate the impact of astrocytes restricted expression of GDNF on dispersion of GDNF and protection of nigrostriatal pathway, Mok-GDNF was stereotaxically injected into the left striatum of rats (n=48). As control, a second group of animals was similarly injected with Mokola pseudotyped vector encoding GFP placed under the control of a CMV promoter (n=27) (Mok-GFP). One week after, 6 animals of each group were sacrificed for GDNF assay in SN and striatum. All remaining animals were injected unilaterally in their left striatum with 6-OHDA, which induced a loss of about 70% of DA nigral neurons. A first group of animals were allowed to survive during 16 weeks after lesion, during which time they were tested for their motor behaviour with the amphetamine induced motor asymmetry test, every 4 weeks. At 16 weeks, behaviour tested animals were sacrificed to assay (1) DA and its metabolites in striatum and to correlate DA remaining and behaviour restoration and (2) GDNF in striatum and SN. A second independent group of animals was injected and sacrificed 16 weeks after injection for histological analysis. Finally, a last group of GDNF treated animals was sacrificed 52 weeks after lesion to measure long-term expression of GDNF.

Substantial and sustained expression of GDNF in striatum

Time course of GDNF expression induced by Mok-GDNF transduction in lesioned rats was analysed by ELISA assay in striatum and SN homogenates at 1, 16 and 52 weeks after lentiviral vector injection. As shown in table 1, GDNF expression in mok-GDNF-transduced striatum at 1 week was about 400 times higher than (about 2.5 ng per mg of striatum) than non injected striatum or Mok-GFP transduced striatum. No significant expression of GDNF was induced in Mok-GFP injected striatum compared to intact striatum. GDNF expression was decreased at 16 weeks after vector injection in Mok-GDNF injected rats (about 1.1 ng per mg of striatum) and

remained stable at 52 weeks (1,68 ng per mg of tissue), indicating that Mok-GDNF vector displayed sustained and high level of GDNF after a single injection in the striatum.

In the SN, no difference could be detected for GDNF assayed by ELISA at 1 week and 16 weeks between the Mok-GDNF, Mok-GFP and the non-injected group (table 1), suggesting an absence of measurable transport of GDNF in the SN after striatal injection of Mok-GDNF vector.

GDNF distribution throughout the nigrostriatal pathway

To further study the transport of GDNF through striatonigral pathway, the distribution of GDNF was analysed by immunohistochemistry. Animals were sacrificed four months post lesion and immunohistochemistries using antibody anti-GDNF was performed on brain slices. Four sections within this pathway were chosen for illustration: central striatum (fig. 2A), caudal striatum and the GP (fig. 2B), the EP (fig. 2C) and the SN (fig. 2D). Strong staining was obtained in all injected animals, from the rostral part to the caudal part of the striatum, consistent with the GDNF assay. As expected for the GP, a structure adjacent to the striatum, staining could also be detected. In contrast, only marginal staining of GDNF could be found in the EN (2C-2G) and in the SN (2D-2H) in animals in which the most intense striatal staining of GDNF was found, indicating a minor transport of the protein through dopaminergic fibers. In the SN of these animals, scarce neurons also display GDNF staining in their cellular body, suggesting slight retrograde transport of GDNF from striatum (2H). No GDNF was detected in GFP non-injected control striatum (2E) and in other studies areas (data not shown). Similar absence of staining was found in GFP injected animals (data not shown). Taken together, these data demonstrated that although high expression is obtained in striatum after Mok-GDNF injection, only minor transport to projection zone can be observed.

Protection of the nigrostriatal pathway

To evaluate the effect of the GDNF expression in striatal astrocytes on nigrostriatal pathway in 6-OHDA lesioned rats, TH immunohistochemistries were performed at 16 weeks after lesion.

In the control GFP-treated group, striatal injection of 6-OHDA resulted in a dramatic neuronal loss (73 % of the intact side) in the SN (fig. 2, compare B and C). Densitometry analysis revealed a similar loss of TH innervation in the striatum (70 % of the intact side), more pronounced in the central and the dorsal part (fig. 3A). This important striatal denervation was associated with near complete absence of TH positive fibers in the SN (fig. C), the GP (fig. 3G and 3J), and the EN (fig. 4A and 4D).

In contrast, significant protection of TH neurons of the SN was obtained (63 % of intact side) in the Mok-GDNF-treated group (fig. 2, compare A and B). Densitometric analysis showed that intensity of TH fibers in the striatum was 60% of intact side (fig. 3B), by the protection of fibers and sprouting formation against toxin insult (fig. 3, compare E and F). Similarly, protection of TH fibers was obtained in the SN (fig. 2, compare A and B), the GP (fig. 3, compare H and I) and the EN (fig. 4, compare B and C). Abundant TH staining could also be visualized in the GP (fig. 3H and 3K), indicating important sprouting formation in this area. In contrast, no aberrant ectopic spouting was found in the SN (fig. 2A) and EN (fig.4 compare E and F). In these areas, fibers organization appeared normal. Taken together, these data suggest that the astrocytes targeting with Mok-GDNF significantly protected DA neurons and TH fibers from 6-OHDA induced degeneration, and most importantly prevent generation of aberrant sprouting in the EP and the SN.

Effect of Mok-GDNF on dopamine synthesis and turn-over

To examine whether nigral DA neurons and striatal TH positive fibers were able to synthesise DA, DA was assayed on dissected striatum of Mok-GDNF and Mok-GFP treated rats at 16 weeks post lesion using high performance liquid chromatography assay (fig. 5). Results showed that about 60 % of DA remained in striatum of

Mok-GDNF treated group compared to contralateral intact side whereas 27 % of DA was found in Mok-GFP treated group (Figure 6, $p < 0.003$), indicating that partial preservation of nigrostriatal pathway was coupled to an equivalent conservation of dopamine synthesis throughout the striatum.

Similarly, to study whether DA turn-over was modified, DA metabolites DOPAC and HVA were assayed and DOPAC/DA and HVA/DA ratios were calculated. As shown in figures 5B and 5C, no significant differences were found between GDNF-injected striatum and the intact side for DOPAC/DA and HVA/DA ratios (respectively, 0.27 vs 0.23 and 0.17 vs 0.13). However, for both ratios, a significant increase was found in the GFP-treated group compared to intact group (0.59 vs 0.36 and 0.26 vs 0.16 respectively). These results indicated that dopamine turn-over in GDNF-treated animals was not increase suggesting that the synthesized dopamine in this group is sufficient to obtain full compensation.

Amphetamine induced rotational behaviour

To examine whether intrastriatal injection of Mok-GDNF vector induced improvement of motor behaviour, an amphetamine induced rotational asymmetry test was performed every 4 weeks post lesion during 16 weeks (fig. 6)). At 4 weeks post lesion, Mok-GDNF treated animals exhibited a significant reduction of motor asymmetry compared to Mok-GFP treated animals (respectively 343 ± 55 and 957 ± 153 turns per 90 min, $p < 0.0001$). At 8 weeks, a near complete absence of motor asymmetry was observed for GDNF treated animals (30 ± 11 turns per 90 min) compared to the control (540 ± 140 turns per 90 min, $p < 0.0001$). This absence of rotational behaviour was confirmed at 12 and 16 weeks (respectively -12 ± 4 and -14 ± 10 turns per 90 min, $p < 0.0001$ compared to the control).

DISCUSSION

In this study, we showed that targeting of GDNF expression to striatal astrocytes was efficient to protect the nigrostriatal pathway without formation of aberrant sprouting in projection areas of striatal neurons. This strategy led to full compensation of the dopaminergic system was obtained, traduced by a complete and stable restoration of the motor behaviour.

Dispersion of GDNF throughout the brain is a major issue, since transported GDNF generated aberrant sprouting in projection areas of transduced striatal neurons (Kirik et al., 2000; Georgievska et al., 2002). This ectopic sprouting could be deleterious because of the potential generation of side effects due to disorganization of neuronal transmission in these areas. In particular, it has been supposed that the absence of spontaneous motor behavioural recovery observed in rats could be explained by this aberrant sprouting (Georgievska et al., 2002). To restrict GDNF expression to striatal astrocytes and prevent anterograde transport of the protein by transduced striatal neurons, we used a lentiviral vector pseudotyped by the Mokola envelope (Brizard et al., submitted). Strong expression of GDNF was detected by ELISA in striatum while no detection was found in SN. Only weak GDNF staining was found by immunohistochemistry in SN and EP, that is likely to result of residual anterograde transport of the protein from striatum. This result is consistent with the transduction pattern of Mok-lentiviral vector, that a very poor percentage of neurons was reported to be transduced (Brizard et al., submitted; our study). In contrast to others studies, no aberrant sprouting was found in SN and EP. In these structures, fibers appeared normal and well organized showing that the amount of GDNF in these structures is not sufficient to induce significant deleterious effects. On the other hand, as expected, intense sprouting of TH fibers was found in GP of GDNF treated animals, which is likely to result from the diffusion of the protein from striatum to the close GB, as reported in previous works (Kirik et al., 2000a; Kirik et al., 2000b; Rosenblad et al., 1999; Rosenblad et al., 2000; Georgievska et al., 2002a; Do Thi et al., 2004). The intense sprouting in GB has been reported to be not detrimental to the improvement of the motor behaviour (Kirik et al., 2000a). To further restrict GDNF localization to the striatum, vector dose could be decrease as GDNF transport in EP and SN was almost undetectable in animal exhibiting less GDNF expression in striatum. Moreover, the use of the astrocyte specific promoter GFAP should enhance this restriction. Nevertheless, the use of the GFAP promoter in a VSV-pseudotyped lentiviral vector led to a non exclusive expression of the transgene to striatal astrocytes (Jackobsson et al., 2003; Jackobsson et al., 2004). In that case, 0.13 ng of GDNF per mg of tissue could be detected in the SN, which could not exclude the potential generation of aberrant ectopic sprouting. In constrast, the combination of the GFAP and the Mokola envelope should lead to an enhance astrocytes restriction.

Various strategies have been used to restrict GDNF main localization to striatum. Approaches using intra-striatal deliver of the purified protein were intensively studied leading to phase I clinical trial. Although benefits were reported in PD patients, this strategy is limited by practical and safety issues related to potential risks of infection, and the poor diffusion of GDNF in the striatum. Intra-striatal grafts of cells genetically modified to produce GDNF were also tested but no significant protection of the nigrostriatal pathway and behavioural recovery was obtained in animal models (Cunningham and Su, 2002; Sajadi et al., 2005; Duan et al., 2005; Ericson et al., 2005). In contrast, in the present study, striatal injection of mok-GDNF protected nigral neurons and TH fibers from 6-OHDA-induced toxicity. These results are consistent with previous works consisting in intra-striatal injection of purified GDNF (Rosenblad et al., 1998, 1999; Kirik et al., 2000) or injection of a GFAP promoter containing-adenoviral vector (Do Thi et al., 2004) which restricted localisation of GDNF to striatum. These results reinforced previous data suggesting that intra-striatal localization of GDNF was necessary and sufficient to induce protection of the nigrostriatal pathway and to allow behavioural recovery, in contrast to SN localization (Kirik et al., 2000a, 2000b).

We showed that only traces of GDNF were detected in SN after intrastriatal injection of the Mok-GDNF vector. As nigral dopaminergic neurons were protected, it appeared that the presence of the factor in SN could be dispensable to induce neuroprotection. Hence, our results argue in favour of a retrograde propagation of GDNF-initiated signals from terminal axons to nigral dopamine soma without transport of GDNF, as demonstrated in sympathetic neurons (Coulpier and Ibanez, 2004) and for the NGF-induced neuronal survival signals (MacInnis et al., 2002). By analogy with NGF and its TrkA receptor (Senger and Campenot, 1997), this propagation could be achieved by successive and rapid retrograde tyrosine phosphorylation of RET receptors all along the axonal membrane. Further studies are needed to verify the veracity of the “domino” hypothesis (MacInnis et al., 2002) in the case of the nigrostriatal pathway.

Associated with protection of TH neurons and fibers, GDNF treatment allowed a maintain of 60 % of dopamine content compared to 27 % in GFP treated animals, both compared to the contralateral intact side. Interestingly, this amount of dopamine was sufficient to restore full motor behaviour, suggesting an activation of mechanisms to compensate neuronal death. In particular, DA turn over was shown to be increase in response to the lesion (Bernheimer et al., 1973; Zigmond and Stricker, 1980). Here, DOPAC/DA and HVA/DA ratios, reflecting DA turn over, were found to be normal in GDNF-injected striatum compared to the intact side in contrast to GFP-injected striatum. This indicated that other compensatory mechanisms could be activated in GDNF-treated animals, like an increase in post-synaptic D2-receptors responses (Bezard et al., 2001) or up regulation of the enkephalin gene expression in striatal neurons (Bezard et al., 2001).

An other important point in our work is the relatively low amount of vector needed to obtain a high expression of GDNF, which has an important implication for biosafety. The dose used in this study was 30 ng of p24 per striatum which is 3 to 10 fold smaller than doses used in other studies (Bensadoun et al., 2000; Rosenblad et al., 2003; Lo Bianco et al., 2004; Brizard et al., 2006). This high level of expression could be explained by (1) the presence of the central flap in the lentiviral vector (Zennou et al., 2001), (2) the use of the efficient CMV promoter (Corti et al., 1999; Serguera et al., 2001) and (3) the presence of the WPRE sequence (Zufferey et al., 1999). Moreover, targeting astrocytes might favour optimal conditions of expression and release of GDNF as these cells naturally synthetize and secrete the factor. Besides, astrocytes are known to possess a strong machinery of secretion (Serguera et al., 2001). On the other hand, as the quantity of GDNF synthesized was 10 fold above the therapeutic threshold (Kirik et al., 2000; Bjorklund et al., 2000), it should be possible to decrease the dose of vector to further improve biosafety and prevent diffusion of the factor to GB, EP and SN (Sajadi et al., 2005). In perspective of clinical application, optimal biosafety could be achieved by (1) regulated GDNF expression (Vogel et al, 2002; Georgievska et al., 2004) and (2) preventing lentiviral vector integration (Yáñez-Muñoz et al., 2006; Phillippe et al., in press).

Gene therapy using viral vectors appears as a promising therapeutical strategy. However, since Ad vector, AAV and VSV pseudotyped-lentiviral vector have shown some main limits, it should be reconsidered whether the use of these vectors would be appropriate for PD gene therapy using GDNF. The present study indicates that Mokola pseudotyped-lentiviral vector is the most suitable vector for GDNF gene transfer in PD gene therapy.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant lentiviral vector production

Plasmid construction: The encapsidation plasmid p8.91 and pGMok, encoding the Mokola G, have been described previously {Zufferey et al., 1997; Bahloul et al., 1998}. pTrip-CMV-GFP-WPRE (Mok-GFP) was derived from the pTrip-CMV-GFP (Zennou et al., 2001) by deleting the U3 region of the 3' LTR and by inserting the GFP-WPRE cassette from pHR'-PGK-GFP-WPRE (gift from D. Trono). pTrip-CMV-hGDNF-WPRE (Mok-GDNF) was derived from pTrip-CMV-GFP-WPRE by replacing the GFP cassette by the human GDNF cDNA.

Lentiviral production: Viral particles were produced by transient transfection of 293T cells. For a 10-cm dish, 10 µg of p8.91, 10 µg of the vector plasmid (Mok-GFP or Mok-GDNF) and 5 µg of the envelope plasmid (pGMok) were used. High titer stocks were obtained by ultracentrifugation as previously described (Zennou et al., 2001) and were stock at -80°C. The stocks were titrated and normalised for the p24 antigen, assayed by ELISA (Promega). The final titers of the Mok-GDNF vector and the Mok-GFP vector were respectively 30 ng/µL and 150 ng/µL.

Cell culture and in vitro transduction

Twenty-four well culture plates were seeded with $5 \cdot 10^4$ C6 cells per well in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum, glutamine (4 mM) and glucose. The next day, cells were transduced with 30, 10 and 2 ng of p24 of Mok-GDNF. Vectors were left on for 12 hours before medium was replaced by serum free DMEM. After 20 hours of incubation, medium was collected and stored at -80°C for further ELISA analysis.

Subjects

Two groups of Sprague Dawley female rats weighting approximately 220 g at the beginning of the experiment were used (Janvier, Le Genest St Isle, France). They were maintained, 3 in each cage, in a 12:12 h light dark cycle with free access to rat chow and water. The first group (n=24) was composed of Mok-GFP injected control animals, the second group (n=40) included Mok-GDNF treated animals.

Surgical procedures

For all surgical procedures, animals received an intramuscular injection of a 1:1 solution of ketamine/xylazine (1 ml/kg of body weight). All injections were given using a 10 µl Hamilton syringe fitted with a glass micropipette using a Kopf stereotaxic frame (Kopf instrument, Tujunga, CA). A thin needle (0.34 µm) was used for injections in the brain. The rate of injection was precisely controlled by an automatic infusion pump (marque..).

Injection of lentiviral vectors

Animals were placed in a stereotaxic frame with the mouthbar set at 0 mm. A total of 30 ng of p24 of Mok-GDNF or Mok-GFP (10 ng of p24/ µl in PBS) was injected into the left striatum (AP: + 0.7 mm from bregma / L: +3 mm / V: -5.5; -5; -4.5 mm) at a rate of 0,25 µl/ min. After the cessation of injection, the needle was left in place for 4 min before being slowly withdrawn from the brain.

6-OHDA lesions

Two weeks after lentiviral injections, animals received stereotaxic injection of 16 µg of 6-OHDA- HCl (Sigma, in ice-cold ascorbate saline) at a speed of 0,5 µl/min, into their left striatum at the following coordinates: AP: + 1.2 mm from bregma / L: + 2.5 mm / V: -5; -4.6; 4.2 mm ventral to dural surface).

Behavioural analysis

Animals were tested monthly for amphetamine-induced turning for 4 months after 6-OHDA injections. Motor asymmetry was monitored in automated rotometer bowls for 90 min, after an injection of D-amphétamine sulfate (Sigma, 2.5 mg/kg, i.p). A net rotation asymmetry score for each test calculated by subtracting turns contralateral to 6-OHDA lesion from turns ipsilateral to the lesion.

Biochemical analysis

In vivo determination of GDNF level: Two weeks or 18 weeks after lentiviral vectors injection, 8 animals of each group were deeply anesthetized and decapitated. The brains were rapidly removed and striata and SN were dissected out and homogenized in lysis buffer containing EDTA-free protease inhibitor cocktail (Boeringer), at the final concentration of 80 mg/ml. (wet weight per volume). After centrifugation (10 min, 13000g), GDNF level was determined by ELISA using GDNF Emax Immunoassay system kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the supplier's recommendations.

Histology

At one week or 4 months after viral vector injection, animals were deeply anesthetised with pentobarbital and perfused through ascending aorta with 100 ml isotonic saline followed by 300 ml ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 phosphate buffer, pH 7.4.

TH and GDNF immunochemical procedures were performed as described previously (Kordower et al., 2000; Do Thi et al., 2004; Brizard et al., 2006). Briefly, for TH immunochemistry, the sections were preincubated in 10 % goat serum (GS) and then incubated overnight at room temperature with with a 1:1000 dilution of rabbit anti-TH antibody (Bodeau-Pean et al., 1999) in 5% GS. For GDNF immunochemistry, sections were preincubated with 5% normal horse serum (NHS) and then incubated with a 1:250 goat anti-GDNF antibody (R&D systems) in 2% NHS. Appropriate biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories) directed against the species in which the primary antibody was raised were used in all case. The sections were then incubated with avidin-biotin-complex for 1h (ABC; Vector Laboratories). The reaction was then visualized using 3,3-diaminobenzidine (Sigma) as chromogen.

Morphometric analysis

The number of surviving TH neurons in SN was determined by counting TH immunoreactive cells in sections between the coordinates AP: - 4.3 and – 5.8 from bregma (Paxinos and Watson, 1998), corresponding to SN, excluding the ventral tegmental area. Results were expressed as the percentage of TH immunoreactive cells counted in SN of the injected side to those counted in SN of the intact contralateral side.

The denervation of injected striatum was analysed using the AIDA 2.43 software. Optical density was measured on TH stained sections corresponding to the whole striatum (between AP: +1.7 and +0.2 from bregma). The intensity of TH staining in injected striatum was expressed as a percentage of the contralateral intact side.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean \pm s.e.m (standard error to the mean). Differences between groups were analysed by using ANOVA followed, when significant ($p < 0.05$) by *t*-test.

FIGURES AND TABLES

TABLE 1: GDNF assay by ELISA in SN and Striatum, 1w, 16w and 52 w after intrastriatal injection of Mok-GDNF vector. Nd: Non-disponible, bd: below detection. ^a p<0.05 compared to GDNF value at 16w and 52w.

FIGURE 1: GDNF distribution in basal ganglia 4 months after intrastriatal injection of the Mok-GDNF vector. GDNF was strongly detected in the striatum (A) and the GP (B). Numerous GDNF-containing cells were observed at the site of injection (F). In contrast, poor staining was obtained in the EP (C, G) and SN (D, H), indicating a slight anterograde transport of the protein. In the SN, few GDNF-containing neurons were detected, suggesting a retrograde transport of the protein. No GDNF was detected in the striatum of non injected animals (intact, E) or in Mok-GFP-injected animals (data not shown). An absence of GDNF detection was also obtained in the GP, the EP and the SN of intact and Mok-GFP-injected animals (data not shown). Scale bar: 350 μ m in A (apply also to B-C-D-E) and 100 μ m in F (apply also to G-H).

FIGURE 2: GDNF protected TH nigral neurons and fibers from 6-OHDA-induced toxicity. TH immunostaining was performed in the SN of GDNF (A-A') or GFP (C-C') injected animals and compared to the non-injected contralateral side (intact, B-B'), four months after injection. Striatal astrocyte expression of GDNF allowed protection of 60% of nigral TH neurons relative to the intact side (D), while only 27% of TH neurons were found in GFP-injected animals. Intrastriatal injection of Mok-GDNF vector led to the protection of nigral TH fibers (compare A' with C'). No aberrant sprouting was detected in the SN of GDNF-injected animals and fibers organization appeared normal, compared to the intact side (B-B'). scale bar: 350 μ m * p< 0.05

FIGURE 3: Protection of TH innervation in the striatum and GP after intrastriatal injection of the Mok-GDNF vector. TH immunostaining was performed in the striatum of GDNF (B-F) or GFP(A-E) and compared to non-injected-contralateral side (C-G). 6-OHDA injection resulted in the degeneration of TH fibers in the striatum (A-E) and in the GP (H-K) of GFP-treated animals. Significant protection of TH innervation was found in GDNF-treated animals compared to GFP-injected animals (N), in the striatum (B-F) and the GP (I-L). High magnificence microphotography revealed sprouting of TH fibers induced by Mok-GDNF injection in the striatum (F, arrows) and in the GP (L). Scale bar: 350 μ m in A (apply also to B-C-H-I-J) and 100 μ m in E (apply also to F-G-K-L-M). * p<0.05.

FIGURE 4: Absence of aberrant sprouting in the EP following Mok-GDNF injection in the striatum. TH immunistaining were performed on EP sections of Mok-GFP (A-D) or Mok-GDNF (B-E) and compared to the non-injected contralateral side (C-F). 6-OHDA injection led to the loss of TH innervation of of the EP in Mok-GFP-injected animals (A-D), while Mok-GDNF injection protected TH fibers (B-E). Fibers in EP appeared normal and well organized in Mok-GDNF-treated animals and no aberrant sprouting was generated.

FIGURE 5: HPLC assay of DA and metabolites DOPAC and HVA. GDNF treatment led to the conservation of 60% of striatal DA in Mok-GDNF-treated animals while only 30% remained in Mok-GFP-treated animals (A). No difference for DOPAC/DA and HVA/DA ratios, reflecting DA turn over, was observed in Mok-GDNF-injected striatum (B and C) compared to non-injected intact contralateral side. In constrast, these ratios were significantly elevated in Mok-GFP-injected animals (B and C). * p<0.05, ** p<0.001.

FIGURE 6: Behavioural test. Four weeks after lesion and each month after, mok-GDNF (n= 42) and Mok-GFP (n=21) treated animals were injected with D-amphetamine and their motor asymmetry was recorded for 90

minutes. At 4 weeks, Mok-GDNF treated animals exhibited a significant reduction of motor asymmetry. Beyond 8 weeks, there was no motor asymmetry observed in Mok-GDNF treated animals compared to Mok-GFP treated animals ($p < 0.0001$).

DISCUSSION GENERALE

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des conditions de transfert de gène thérapeutique du GDNF dans le cadre d'une thérapie génique de prévention de la MP. Cette optimisation repose sur le ciblage de l'expression à une population particulière de cellules nerveuses, les astrocytes striataux, permettant d'éviter la dispersion par transport antérograde de la protéine thérapeutique dans le cerveau du patient ainsi que la génération d'effets biologiques ectopiques et potentiellement délétères.

Une première partie du travail repose sur la caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés par l'enveloppe Mokola, chez le rat, la souris et le primate non humain. Nous avons montré que ce vecteur permettait un ciblage de l'expression restreint aux astrocytes chez la souris, que cette expression soit gouvernée par le promoteur PGK ou CMV. Chez le rat, le tropisme du vecteur dépend du type de promoteur utilisé : le promoteur CMV permet une transduction préférentiellement astrocytaire tandis que le promoteur PGK permet une transduction majoritairement neuronale. Chez le singe, une expression astrocytaire quasi exclusive est obtenue avec le pCMV alors que l'utilisation du pPGK aboutit à une expression aussi bien dans les neurones que dans les astrocytes.

La seconde partie de ce travail correspond à la thérapie génique expérimentale dans un modèle de rat de la MP, en utilisant un vecteur pseudotypé par l'enveloppe Mokola pour diriger l'expression du GDNF dans les astrocytes striataux. Le GDNF est faiblement détecté dans les zones de projection striatale. Cependant, la génération de sprouting ectopique est prévenue suggérant que la quantité de GDNF transporté est insuffisante pour induire un sprouting significatif. Nous avons montré que le traitement au GDNF protège les neurones et les fibres dopaminergiques de la voie nigrostriée ainsi que la synthèse de DA, ce qui a pour conséquence un rétablissement du comportement moteur *via* une forte compensation physiologique.

Bien que des conclusions claires et optimistes puissent être tirées de ce travail, il convient évidemment de confronter ces résultats à la littérature et d'en exposer les limites.

I. Bilan du travail

Au cours de la première partie de ce travail, des vecteurs lentiviraux pseudotypés par l'enveloppe Mokola ont été construits puis caractérisés.

1.1. Pseudotypage des vecteurs lentiviraux par l'enveloppe Mokola

Le pseudotypage des vecteurs lentiviraux par l'enveloppe de Mokola aboutit à un tropisme différentiel selon l'espèce étudiée et selon le promoteur utilisé pour exprimer le

transgène. Chez la souris, le tropisme des pseudotypes Mokola est exclusivement astrocytaire, ce qui suggère une expression du récepteur de Mokola uniquement à la surface des astrocytes. A ce jour, ce récepteur, qui interagirait avec Mok-G et qui permettrait l'adsorption du virus à la cellule, n'a pas été identifié. L'absence de l'expression du récepteur à la surface des neurones chez la souris pourrait avoir pour conséquence une absence d'infection des neurones. Le récepteur pourrait être exprimé uniquement à la surface des astrocytes, expliquant la différence de transduction. En revanche, chez le rat et le singe, le récepteur de Mokola pourrait être exprimé non seulement à la surface des astrocytes mais aussi des neurones. La transduction préférentielle des neurones ou des astrocytes chez le rat et le singe serait ensuite définie par le promoteur utilisé.

Ceci étant, les éléments influant sur le tropisme n'étant pas connus, les seules données actuelles ne permettent pas de prédire quel sera le tropisme de ces vecteurs chez l'homme.

La caractérisation du tropisme des vecteurs Mokola est limitée par l'absence de quantification précise de la proportion de neurones et d'astrocytes transduits par les différents vecteurs utilisés. Bien que chez la souris il semble que la restriction astrocytaire soit totale, nous n'avons pas évalué précisément cette proportion chez le rat et le singe.

Avantage des vecteurs pseudotypés par l'enveloppe de Mokola

L'avantage majeur des lentivecteurs pseudotypés par Mokola réside en ce qu'il permet une restriction astrocytaire très importante, évaluée à au moins 90% en fonction de l'espèce. La transduction neuronale est plus faible que celle obtenue avec les lentivecteurs pseudotypés par VSV, les adénovecteurs ou les vecteurs AAV (tous les trois transduisent fortement les neurones), tout comme avec les vecteurs pourvus du pGFAP astrocytaire. Le lentivecteur pseudotypé par Mokola est à ce jour le vecteur le plus efficace pour transduire spécifiquement les astrocytes. Des optimisations doivent être apportées pour permettre de restreindre de façon encore plus importante l'expression aux astrocytes. Une manière d'optimiser la restriction astrocytaire de l'expression serait de combiner l'enveloppe Mokola avec le pGFAP. Quelques points devront être examinés :

- En particulier, il conviendra de vérifier la longévité de l'expression obtenue avec pGFAP. En effet, dans le travail de Do Thi et collègues (Do Thi et al., 2004), une diminution de l'expression du GDNF est observée après injection d'un Ad-pGFAP-GDNF, qui peut être due à l'extinction du pGFAP. Aucune diminution de l'ADN viral n'a été détectée.
- D'autre part, le pGFAP est un promoteur beaucoup plus faible que le pCMV, ce qui implique la nécessité d'étudier précisément l'efficacité de l'expression. Il faudra éventuellement utiliser des doses de vecteurs beaucoup plus importantes (Morelli et al., 1999; Jakobsson et al., 2003), ce qui diminuera la biosécurité.

- Enfin, la spécificité du pGFAP pour les astrocytes est sujette à débats et les résultats en termes de restriction varient en fonction des publications, ce qui nécessite certains éclaircissements.

Applications du ciblage astrocytaire

Les applications des vecteurs lentiviraux permettant un ciblage de l'expression aux astrocytes sont nombreuses et couvrent aussi bien le champ thérapeutique que le champ fondamental. Dans le contexte thérapeutique, ces vecteurs permettent de restreindre la libération du facteur thérapeutique au site d'injection et d'éviter ainsi la diffusion et son action dans des zones ectopiques. Toutes les protéines diffusibles à effet paracrine sont concernées, excepté celles qui agissent directement au niveau des neurones comme les protéines anti-oxydantes SOD ou GPx (Barkats et al., 2006). En règle générale, toute thérapie impliquant un transfert de gène d'une molécule à effet paracrine doit être reconsidérée par rapport à la nécessité absolue ou non de transduire les neurones. Par exemple, dans le cas de la TG de la maladie de Huntington, l'injection d'un lentivecteur pour le transfert de gène du CNTF a été réalisée dans le striatum de souris modèle de la maladie (Pereira de Almeida, 2001). Bien que des effets bénéfiques aient été constatés, la question de la diffusion de ces facteurs dans le cerveau doit être soulevée dès lors que, dans cette étude, les cellules transduites par le vecteur lentiviral sont exclusivement des neurones. Une même remarque est apportée pour une étude portant sur l'utilisation du vecteur adénoviral exprimant le BDNF chez le rat (Bemelmans et al., 1999). Un autre avantage du ciblage astrocytaire réside dans la forte sécrétion permise par les astrocytes en particulier pour des stratégies impliquant une forte libération d'un facteur diffusible telles que le traitement de la mucopolysaccharidose de type VII par la β -glucuronidase (Serguera et al., 2001).

Dans le cadre de la recherche fondamentale, la restriction astrocytaire ouvre la possibilité d'étudier l'effet de la surexpression d'une protéine diffusible sur zone particulière du SNC, ou d'une protéine telle qu'un facteur de transcription sur les astrocytes. Le développement et la vectorisation du système d'ARNi dans un lentivecteur (Szulc et al., 2006) permet en outre d'envisager d'éteindre spécifiquement un gène dans les astrocytes *in vivo* au moins chez la souris.

1.2. Injection intrastriatale de Mok-GDNF

Le ciblage astrocytaire de l'expression chez le rat obtenu par les vecteurs lentiviraux pseudotypés par l'enveloppe de Mokola a été exploité pour restreindre l'expression du GDNF aux astrocytes striataux. L'expression et la distribution du GDNF ont été étudiées.

Synthèse du GDNF par Mok-GDNF

L'injection intrastriatale du vecteur Mok-GDNF chez le rat permet d'obtenir une forte synthèse de GDNF à 10 jours, environ 2,5 ng par mg de tissu. Cette synthèse diminue ensuite pour se maintenir à environ 1,5 ng par mg de tissu, jusqu'à au moins un an. La cinétique d'expression est cohérente avec l'utilisation de pCMV pour lequel un pic d'expression est obtenu lors des premières semaines (Sarkis et al., 2000 ; Serguera et al., 2001). De plus, dans notre étude, le pic d'expression observé pourrait être lié à la réaction astrocytaire : en effet, l'insertion de l'aiguille dans le striatum entraîne une réaction inflammatoire transitoire induisant une activation des astrocytes. Or, les astrocytes activés, en particulier ceux transduits par le vecteur, vont proliférer et le nombre de cellules pouvant synthétiser le GDNF exogène va augmenter en conséquence. On peut donc penser que lors de la réaction inflammatoire, la synthèse de GDNF exogène pourrait être augmentée. Il en est de même pour l'injection de la 6-OHDA, entraînant aussi une réaction inflammatoire (Grunblatt et al., 2000). Avec le temps, la réaction inflammatoire diminue et on peut penser que la synthèse de GDNF diminue de même. Des preuves de l'activation astrocytaire et de réaction inflammatoire ayant été fournies chez l'homme atteint de la MP (pour une revue, Hirsch et al., 2005), cibler les astrocytes pourrait ainsi fournir un moyen de produire le facteur de façon optimale.

Il est important de noter que la dose de vecteur utilisée pour ces expériences (30 ng de p24), 3 à 10 fois moindre que les doses utilisées dans les précédentes études. Cependant, la quantité de GDNF synthétisée (de l'ordre de 1 à 2 ng par mg de tissu) est comparable (Bensadoun et al., 1999 ; Georgievska et al., 2002a). La grande efficacité du vecteur est liée à l'utilisation combinée du pCMV, promoteur permettant une synthèse forte du transgène (Corti et al., 1999), de la séquence WPRE (Zufferey et al., 1998), et de la séquence flap (Zennou et al., 2000, 2001). En outre, le ciblage astrocytaire pourrait être optimal pour libérer le GDNF : ce sont en effet les cellules qui physiologiquement synthétisent et libèrent le GDNF. D'un autre côté, la sécrétion d'un facteur exogène par ces cellules est beaucoup plus forte que celle obtenue avec d'autres types cellulaires (Serguera et al., 2001). En prenant 0,2 ng par mg de tissu comme valeur thérapeutique expérimentale chez le rat (Kirik et al., 2000a), les doses de vecteurs pourraient être encore diminuées. Ceci a des implications très intéressantes pour la biosécurité dans le cadre d'une application clinique, dont l'une des optimisations consiste en la diminution des doses de vecteurs injectées.

Distribution du GDNF dans les ganglions de la base

La présence du GDNF dans le GP peut être expliquée par la diffusion directe de la protéine du site de libération dans le striatum vers le GP, structure adjacente au striatum. Dans cette structure, un sprouting des fibres dopaminergiques est généré par le GDNF. Ce résultat est cohérent avec les précédentes études basées sur le transfert de gène utilisant des vecteurs ciblant majoritairement les neurones (Kirik et al., 2000b; Georgievska et al., 2002a; Georgievska et al., 2002b), les astrocytes striataux (Do Thi et al., 2004) ou sur l'injection directe de la protéine (Rosenblad et al., 1999 ; Kirik et al., 2000b). La diffusion du GDNF jusqu'au GP, structure adjacente au striatum, est donc indépendant du mode d'administration du GDNF. Cependant, Kirik et ses collègues ont démontré que le sprouting dans le GP n'est pas délétère pour la récupération fonctionnelle évaluée par des tests moteurs induits par l'amphétamine et des tests moteurs spontanés (Kirik et al., 2000a, 2000b). Des études plus approfondies doivent être menées pour déterminer l'impact de ce sprouting ectopique dans le GP sur la capacité du GP à inhiber le NST, sur la récupération fonctionnelle et sur la génération d'effets secondaires (dyskinésies...).

La faible quantité de GDNF détectée par immunohistochimie dans le NEP et dans la SN sous tend un transport axonal de la protéine dans ces structures. Deux hypothèses peuvent expliquer le transport résiduel de GDNF du striatum vers le NEP et la SN : premièrement, le GDNF libéré dans le striatum peut être recapté par les corps cellulaires et les terminaisons au niveau du striatum et pourrait subir un transport antérograde et rétrograde jusqu'aux zones de projections (Tomic et al., 1995). Ceci expliquerait le marquage positif pour le GDNF retrouvé pour quelques neurones de la SN. Deuxièmement, l'injection du vecteur Mok-GDNF mène à la transduction majoritaire des astrocytes striataux mais aussi de quelques neurones striataux (article I).

Néanmoins, même si un transport de GDNF subsiste, la quantité de GDNF présente dans la SN est en-dessous du seuil de détection par ELISA, c'est à dire quelques picogrammes par mg de tissu. Cette valeur est bien en dessous de la valeur expérimentale nécessaire à une action biologique du GDNF c'est à dire 200 pg par mg de tissu (Kirik et al., 2000). Dans ces zones, nous n'avons en effet pas retrouvé de sprouting aberrant ou excessif induit par le GDNF détecté, ce qui démontre que même si un transport résiduel de la protéine existe, la quantité de GDNF mise en jeu dans les zones de projection est insuffisante pour générer un biologique significative. Le ciblage astrocytaire par les vecteurs Mok-GDNF permet donc de prévenir cet effet secondaire inhérent à la transduction des neurones striataux (Kirik et al., 2000a; Georgievska et al., 2002b).

Par ailleurs, l'utilisation du vecteur Mok-GDNF permet de restreindre plus fortement la libération de GDNF dans le striatum que l'utilisation d'un vecteur lentiviral pseudotypé par VSV en combinaison avec un pGFAP, spécifique des astrocytes. En effet, dans ce cas, un transport détectable de GDNF par ELISA (environ 0,13 ng par mg de tissu) est rapporté (Jacobsson et al., 2004), valeur proche de la valeur thérapeutique seuil expérimentale de 0.2 ng par mg de tissu (Kirik et al., 2000a).

Cependant, nous n'avons pas clairement démontré que le GDNF est synthétisé par les astrocytes. Deux éléments nous permettent de le supposer fortement: (1) l'injection d'un vecteur Mok-CMV-GFP-WPRE, identique à celui portant le GDNF à la place de la GFP, transduit quasi-exclusivement les astrocytes (article I) et (2) après l'injection du vecteur Mok-CMV-GDNF-WPRE dans le striatum, un très léger transport de la protéine dans les zones de diffusion est observé, ce qui indique une transduction neuronale mineure. Ce faible pourcentage de neurones transduits par le vecteur Mok-CMV-GDNF-WPRE est cohérent avec les résultats obtenus avec le vecteur Mok-CMV-GFP-WPRE. L'expression astrocytaire restreint du GDNF sera évaluée prochainement par la technique de double marquages immunofluorescents dirigés contre le GDNF et NeuN/GFAP. Cette expérience est en cours de mise au point au laboratoire.

1.3. Protection de la voie nigrostriée

L'expression astrocytaire quasi exclusive du GDNF par Mok-GDNF permet de protéger les neurones et les fibres de la voie nigrostriée de la lésion induite par le 6-OHDA. Cette protection n'est pas totale et se situe à environ 60% de conservation par rapport à une voie nigrostriée intacte. En ce qui concerne les neurones de la SN, la protection est cohérente avec les études précédentes utilisant le même protocole de protection (expression du GDNF au niveau du striatum avant la lésion). En effet, ces études rapportent une protection de 50 à 70 % des neurones de la SN. Ainsi, nos résultats vérifient que l'expression du GDNF au niveau du striatum par l'infusion intracérébrale ou le transfert de gène n'est pas optimale pour une protection totale (supérieure à 90%) des neurones de la SN (Kirik et al., 2000a, 2000b). Une protection totale est obtenue lorsque le GDNF est exprimé directement au niveau de la SN (Hoffer et al., 1994 ; Sullivan et al., 1998). Cependant, dans ce cas, les fibres striatales ne sont pas efficacement protégées, un sprouting important au niveau de la SN et du thalamus ventral est observé et aucun comportement moteur n'est maintenu (Choi-Lundberg et al., 1997 ; Kirik et al., 2000a, 2000b). Ceci montre que la protection totale des neurones de la SN n'est ni nécessaire ni suffisante pour obtenir une récupération fonctionnelle (Kirik et al., 2000b).

Dans notre étude, la conservation de 60% des taux de DA obtenue par la restriction astrocytaire de l'expression du GDNF est suffisante pour induire une récupération fonctionnelle totale dans le test de rotamétrie induite par l'injection d'amphétamine. Ce résultat confirme que le point crucial pour une thérapie efficace réside dans la conservation de la synthèse de DA striatale plus que la protection des neurones de la SN seuls.

Hypothèses concernant le mode d'action du GDNF sur la voie nigrostriée

La restriction de la localisation du GDNF au striatum permet non seulement une protection des fibres dopaminergiques striatales mais aussi des neurones dopaminergiques de la SN ce qui est en accord avec la protection obtenue lors de l'injection intrastriatale de GDNF ou les greffes intrastriatales. La nécessité de la présence du GDNF au niveau de la SN n'est pas claire. Celle-ci est un point crucial pour la compréhension de l'action du GDNF et l'optimisation de la stratégie de thérapie par le GDNF. Trois hypothèses peuvent expliquer la protection des neurones de la SN sans expression directe du facteur dans la SN :

- le transport de la protéine au niveau des corps cellulaires de la SN par transport axonal. Dans la SN, le GDNF agirait directement sur ces récepteurs RET et GFR α induisant la neuroprotection. Le transport du GDNF du striatum vers la SN peut s'effectuer par transport soit antérograde soit rétrograde. Le transport antérograde peut être mis en évidence par l'injection intrastriatale d'un vecteur codant le GDNF ciblant préférentiellement les neurones (Kirik et al., 2000a ; Georgievska et al., 2002). Concernant le transport rétrograde, Tomac et ses collègues ont démontré le transport du GDNF après injection striatale de la protéine radiomarquée (Tomac et al., 1995). Cependant, aucune quantification n'a été effectuée et il semble que seule une sous population des neurones dopaminergiques soient impliquée dans ce transport (Tomac et al., 1995). Des études ultérieures rapportent une détection par immunocytochimie du GDNF dans les neurones de la SN après injection de la protéine purifiée ou la greffe de cellules génétiquement modifiées, confirmant le transport rétrograde du GDNF mis en évidence par Tomac. Néanmoins, ces études ne montrent pas de neuroprotection (Duan et al., 2005 ; Sajadi et al., 2005), ce qui suggère que la protection des neurones de la SN ne serait pas principalement liée à la présence du facteur dans les corps cellulaires.

- la protection de la dégénérescence rétrograde des fibres dopaminergiques induite par la 6-OHDA. Ceci empêcherait la mort des corps cellulaires. A ce jour, cette question n'est pas tranchée. Aucun travail ne rapporte l'effet de la restriction striatal du GDNF (par injection de protéine ou par greffe de cellules génétiquement modifiées) sur la protection des neurones de la SN suite à une injection intranigral de 6-OHDA, entraînant la mort massive et rapide des corps cellulaires. Cette question doit être étudiée car si chez l'homme les

neurones dopaminergiques dégénèrent avant les fibres, il convient de s'assurer que l'injection intrastriatale de GDNF permettra de protéger ces neurones.

- la propagation rétrograde du signal induit par le GDNF le long des membranes plasmiques, à partir des terminaisons striatales vers les corps cellulaires. La propagation rétrograde du signal induit par le GDNF a été mise en évidence *in vitro* dans des neurones sympathiques (Coulpier and Ibanez, 2004). En outre, un phénomène identique a été décrit pour le signal de survie neuronale induit par le NGF (MacInnis and Campenot, 2002). Par analogie avec le NGF et son récepteur Trk A, on peut supposer que la propagation rétrograde, de type « domino » comme le décrit MacInnis, pourrait être obtenue par la phosphorylation rétrograde successive et rapide des récepteurs RET le long de la membrane axonale. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse intéressante.

Effet du ciblage astrocytaire de l'expression du GDNF sur la synthèse de la dopamine

L'expression astrocytaire du GDNF permet de maintenir une synthèse de DA correspondant à 60% de celle mesurée dans un striatum intact, soit une chute de 40%. Néanmoins, bien que partielle, la protection de la synthèse de DA est suffisante pour corriger totalement le comportement moteur. Ceci implique donc que des systèmes de compensation autres que le rétablissement des niveaux striataux de DA sont mis en place. En effet, l'injection d'amphétamine a pour conséquence de libérer l'ensemble des vésicules contenant la DA des terminaisons synaptiques. Ainsi, si aucun déséquilibre n'est mis en évidence entre le côté lésé et le côté intact, bien que le taux de DA du côté lésé soit de 60%, des mécanismes de compensation en aval du système de libération de la DA ont dû se mettre en place. Cette hypothèse est renforcée par la mesure de la vitesse de renouvellement de la DA, retrouvée à un niveau normal, ce qui suggère que la voie nigrostriée n'est pas dans un contexte de synthèse accrue pour pallier la perte neuronale. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce résultat. En particulier, une augmentation de la sensibilité ou du nombre de récepteurs post-synaptiques à la DA pourrait être impliquée. Des expériences de *binding* pourraient être effectuées pour vérifier cette hypothèse en quantifiant la sensibilité des récepteurs dopaminergiques. Par ailleurs, l'injection d'apomorphine, agoniste des récepteurs D2, entraîne un déséquilibre entre les deux hémisphères chez les animaux unilatéralement lésés à la 6-OHDA et par conséquent un comportement rotatoire quantifiable. Dans notre étude, si une hypersensibilisation des récepteurs D2 est supposée entre autre responsable de la récupération fonctionnelle observée, elle serait révélée par l'injection d'apomorphine qui devrait entraîner un comportement rotatoire. D'autres phénomènes peuvent intervenir,

tels que l'augmentation de l'expression du gène de l'enképhaline ou la modification des propriétés électrophysiologiques du NEP et du NST (Bezard et al., 2003).

Chez les animaux contrôles, une diminution de l'asymétrie motrice est observée lors du test induit par l'amphétamine. Ce résultat peut être expliqué par une récupération fonctionnelle spontanée chez ces animaux, rapportée dans des études précédentes (Do Thi et al., 2004). Cependant, même si des mécanismes de compensation sont mis en jeu, ils ne permettent pas de compenser la perte neuronale (70% de mort neuronale et une chute de 70% de la DA striatale). En effet, la vitesse de renouvellement de la DA chez ces animaux contrôles est significativement supérieure à celle mesurée dans le striatum intact, indiquant un mécanisme mis en place pour augmenter la disponibilité de la DA extracellulaire. De plus, il est important de constater que l'asymétrie motrice atteint un pallier à 300 tours par 90 minutes soit environ 4 tours par minutes. Or, d'après Hudson et ses collègues, les animaux présentant une asymétrie motrice à partir de 5-6 tours par minutes possèdent une lésion d'au moins de 90% des neurones dopaminergiques de la SN. Ainsi, les animaux contrôles seraient encore fortement lésés même s'ils présentent une récupération spontanée.

1.4. Limites du protocole de thérapie génique

Relevance du modèle animal utilisé pour la TG expérimentale

Pour tester l'efficacité de protection de la voie nigrostriée du ciblage astrocytaire de l'expression du GDNF, nous avons opté pour le modèle de rat de la MP basé sur l'injection intrastriatale unilatérale de 6-OHDA. Comme décrit dans l'introduction, l'injection intrastriatale de la toxine permet d'obtenir une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN rétrograde et progressive, entre la deuxième et quatrième semaine suivant l'injection (Sauer et Oertel, 1994). Ce modèle simple à mettre en œuvre et reproductible permet de tester aisément les traitements expérimentaux et leur aptitude à protéger les neurones et les fibres de la dégénérescence rétrograde, nous plaçant ainsi dans les conditions similaires à celles supposées dans la MP (Bernheimer et al., 1973). Cependant, il demeure hasardeux de comparer une dégénérescence réalisée en quelques semaines à celle obtenue au cours de plusieurs années. De plus, les mécanismes de dégénérescence induits par l'action de la 6-OHDA ne reproduisent que très partiellement ceux impliqués dans la MP. Il sera donc important de vérifier nos données dans des modèles plus proches de la MP humaine, par exemple par injection chronique de MPTP chez la souris et le singe, qui permettent d'obtenir en particulier une agrégation d' α -synucléine ou reproduire plus fidèlement les phases pré-symptomatiques.

Limites du test comportement par injection de l'amphétamine

Un des avantages de l'injection unilatérale de 6-OHDA réside dans la possibilité d'obtenir un test fonctionnel simple basé sur l'injection d'amphétamine. La mesure du comportement rotatoire induit permet d'évaluer la récupération fonctionnelle induite par le traitement. Cependant, ce type de test induit par l'injection d'une drogue ne permet d'obtenir de résultats informatifs sur la récupération de l'aptitude motrice spontanée de l'animal. Or, dans l'étude de Biljana Georgievska parue en 2002 (Georgievska et al., 2002b), bien que les tests de rotamétrie induite par l'amphétamine permettent de montrer une récupération fonctionnelle, le sprouting aberrant ectopique serait responsable de l'absence de récupération motrice lors des tests moteurs spontanés sans induction pharmacologique (staircase test, forelimb stepping test et cylinder test). Donc, des tests moteurs spontanés de ce type devraient être réalisés, afin de dépasser les limites imposées par le test comportemental induit par l'amphétamine et de s'assurer que la restriction du GDNF aux astrocytes striataux et l'absence de sprouting ectopique permettent une récupération du comportement moteur spontané.

II. Futur de la thérapie de protection par le GDNF de la MP

Vers un besoin urgent de traitement de la MP

L'augmentation de l'espérance de vie qui a eu lieu durant le XXe siècle et dont ont principalement bénéficié les pays occidentaux s'est accompagnée d'un accroissement inquiétant de la prévalence des maladies touchant les personnes âgées telles que la maladie d'Alzheimer et la MP. Des pays à forte population tels que la Chine et l'Inde connaissent depuis dix ans un développement phénoménal qui laisse présager d'une élévation conséquente de l'espérance de vie. Dans les prochaines décennies, il faudra donc envisager une élévation très importante du nombre de personnes atteignant l'âge de développer des maladies neurodégénératives et, en conséquence, une augmentation significative du nombre de personnes atteintes de la MP.

Ce futur préoccupant requiert l'élaboration de politiques de santé publique et de recherche efficaces afin de prévenir l'apparition de la MP. En premier lieu, l'urgence impose la sensibilisation de la population aux éléments pouvant augmenter le risque de développer la MP ou pouvant constituer une protection. Par exemple, la sensibilisation aux risques provoqués par l'exposition aux pesticides, associée à un effort considérable des pouvoirs publics pour limiter leur utilisation, en particulier dans le secteur de l'agriculture intensive. Une étude récente de l'Institut Français de l'Environnement montre en effet une pollution importante des sources d'eaux en France : sur 607 points de mesure de la qualité des rivières, des pesticides ont été retrouvés dans 96% des cas (*le Monde* daté 20-21 août 2006). Les eaux souterraines, à renouvellement plus long, ne sont pas épargnées, 61% des échantillons étudiés montraient des concentrations inquiétantes de pesticides. Ce bilan n'est pas spécifique à la France et touche tous les pays industrialisés dont les Etats-Unis et le Japon, plus gros utilisateurs de pesticides avant la France. Heureusement, des signaux d'alerte sont de plus en plus envoyés par les employés agricoles et les médecins afin que la dangerosité de certains métiers et produits soit reconnue et prise en compte (*l'Humanité* du 19 février 2005). Une récente décision de justice a permis une première avancée avec la reconnaissance de la MP comme maladie professionnelle (*le Monde* daté du 23 septembre 2006).

Au niveau mondial, la recherche de la compétitivité et du profit laisse entrevoir le pire en ce qui concerne l'exposition des populations, en particulier les plus pauvres, aux agents toxiques agricoles et industriels. En parallèle de toute recherche scientifique visant à prévenir le développement de la MP, un effort politique pressant de sensibilisation et de protection des populations doit donc être entrepris à l'échelle mondiale.

Ce constat inquiétant est renforcé par le fait qu'il n'existe pas de traitement permettant de ralentir ou d'arrêter la progression de la maladie. Seuls existent des traitements permettant de contrôler les symptômes, sans empêcher la mort des neurones dopaminergiques. Ainsi, un effort de recherche important est effectué depuis des décennies pour trouver des agents thérapeutiques permettant de protéger ou régénérer les neurones dopaminergiques. De toutes les thérapies expérimentales évaluées depuis quelques années destinées à prévenir la MP, l'utilisation des facteurs neurotrophiques est la voie de recherche la plus prometteuse. En effet, à ce jour, les facteurs neurotrophiques sont considérés comme les seules molécules susceptibles d'avoir des effets protecteurs ou restauratifs efficaces sur les neurones dopaminergiques. Plusieurs molécules trophiques des neurones dopaminergiques ont été testées, parmi lesquelles l'epidermal growth factor (EGF), le basic fibroblast growth factor (bFGF), le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), sonic hedgehog, la NTN et le GDNF (Shults et al., 1995; Svendsen et al., 1996; Horger et al., 1998; Collier and Sortwell, 1999; Pearce et al., 1999; Baldassarre et al., 2002). Parmi toutes ces molécules, le GDNF est celle qui possède l'action la plus puissante et la plus spécifique sur les neurones dopaminergiques, ce qui la positionne à une place privilégiée pour la régénération et la prévention de la MP.

Pour traiter les déficits moteurs, la protection par GDNF pourrait se révéler adéquate. Cependant, pour les 40% des patients développant des démences, reflétant la dégénérescence des neurones non dopaminergiques, le traitement par le GDNF visant à protéger la voie nigrostriée pourrait n'avoir aucune influence. Pour traiter efficacement tous les patients atteints de la MP, développant ou non des démences, un traitement touchant tous les neurones atteints du SNC doit être utilisé. Récemment, un traitement par immunisation contre l'alpha-synucléine a montré des résultats encourageants chez un modèle de souris de la MP (Masliah et al., 2005).

Les résultats obtenus avec le GDNF sont prometteurs mais imprécis

De nombreuses études documentent les effets puissants du GDNF chez différents animaux modèles. Le passage à la clinique au cours d'essais cliniques a fourni des résultats contradictoires et mitigés. Ainsi, plusieurs questions soulevées attendent encore une réponse claire : tout d'abord, les différentes études cliniques n'apportent pas clairement la preuve de l'efficacité du GDNF chez l'homme, même si certains effets moléculaires attendus et comparables à ceux obtenus chez l'animal ont été clairement observés : augmentation de la recapture de la fluorodopa au niveau du site d'injection, formation de collatérales... Cependant, l'absence de reproductibilité des protocoles ne permet pas à ce jour de

comparer les effets de la protéine. En effet, les premiers essais de phase I ont été réalisés sans groupe témoin recevant un placebo (Matel & Gill, 2004). En conséquence, l'évaluation de l'effet placebo chez les individus traités au GDNF n'a pu être effectuée. Sachant que cet effet est très puissant dans la MP, il est plus que légitime de s'interroger sur les rôles de ce phénomène dans les effets bénéfiques sur les symptômes obtenus lors des premiers essais de phase I. D'autant que l'étude en phase II en double aveugle ne montre pas de différence entre les deux groupes traités au GDNF ou avec un placebo (Sherer et al., 2006). Il semble donc nécessaire de réaliser de nouveaux essais en double aveugle à plus grande échelle avec un protocole standardisé permettant la comparaison des résultats entre les différentes équipes. D'autre part, les individus inclus dans ces essais ont un parkinsonisme avancé, suggérant une perte neuronale intense. Le fait que le GDNF puisse générer à ce stade de la maladie une récupération de l'activité dopaminergique suffisante pour obtenir un effet bénéfique est une question qui reste aussi en suspens, justifiant à mon avis une réserve à émettre sur un traitement utilisant le GDNF chez des sujets présentant un stade avancé de la maladie.

D'autre part, plusieurs éclaircissements doivent être fournis avant de continuer ces essais cliniques. En particulier, alors que le GDNF permet de protéger les neurones dopaminergiques de différents processus lésionnels (lésion mécanique du MFB, lésion chimique à la 6-OHDA ou MPTP), l'action bénéfique du GDNF contre la toxicité de l' α -synucléine n'est pas encore clairement établie. Au contraire, une seule étude réalisée par l'équipe de Patrick Aebischer rapporte une absence de protection des neurones de la SN par le GDNF contre la toxicité induite par la surexpression de l' α -synucléine mutante A30P par un lentivecteur (Lo Bianco et al., 2004). Les niveaux d'expression obtenus avec le lentivecteur étant fortement supérieurs aux niveaux physiologiques, on peut penser que le GDNF ne peut pas agir bénéfiquement dans ces conditions. Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour confirmer ce résultat, cette première étude soulève des doutes concernant l'aptitude du GDNF à protéger les neurones dopaminergiques dans le contexte de la MP chez l'homme. Par ailleurs, les effets de la dispersion du GDNF dans le cerveau et du sprouting consécutif sur la récupération ou la survenue potentielle d'effets indésirables doivent être étudiés de façon approfondie. De plus, les mécanismes d'action du GDNF sur les neurones dopaminergiques de la SN doivent être clairement élucidés, en particulier la dispensabilité éventuelle du GDNF au niveau de la SN pour protéger les neurones. Ces données permettront d'optimiser la stratégie thérapeutique utilisant le GDNF en évitant en particulier la présence du GDNF au niveau de la SN, supposée délétère par le sprouting excessif généré. Enfin, des éléments sur la toxicité du GDNF ont récemment été apportés (Peck et al., 2005). Il est donc important d'étudier précisément chez l'animal les

effets potentiellement toxiques du GDNF pour s'assurer de la sécurité de l'utilisation du GDNF.

Quel que soit le mode d'administration, le meilleur site d'injection doit être établi afin d'obtenir une efficacité optimale du GDNF pour traiter la MP. Il a été suggéré pour les thérapies visant à améliorer la fonction dopaminergique nigrostriatale, que le site optimal serait le putamen post commissural (Olanow et al., 1996). En effet, les neurones de la SN qui dégénèrent dans la MP projettent dans cette structure et la perte en DA y est la plus importante. En outre, cette région est connectée au cortex moteur, contrairement au putamen antérieur et noyau caudé qui sont reliés à des aires associatives non motrices.

L'injection de la protéine ou le transfert du gène codant le GDNF dans des animaux préalablement lésés montre des effets modestes vis à vis de la récupération fonctionnelle, même si des effets bénéfiques sur la réinnervation ont été observés. Ainsi, la question du potentiel thérapeutique du traitement par le GDNF chez les individus en phase avancée de la MP reste encore en suspens. Le traitement par le GDNF ne semble pas adapté aux stades avancés de la maladie. En revanche, l'existence d'une phase pré-symptomatique rend particulièrement attractive l'utilisation du GDNF. En effet, agir au cours de cette période permettrait non seulement une action trophique du GDNF comme constatée lors de l'infusion chez des patients étant à un stade avancé (Love et al., 2005), mais surtout une action protectrice efficace des neurones dopaminergiques en dégénérescence ou encore intacts. Ainsi, deux stratégies utilisant le GDNF semblent réellement envisageables :

(1) L'administration de la protéine ou du gène lors de la survenue des symptômes. Les effets trophiques et protecteurs du GDNF sur les neurones dopaminergiques de la SN permettront de protéger les neurones et les fibres restants et de favoriser le métabolisme dopaminergique ce qui pourrait stopper, voire inverser, la progression de la maladie.

(2) L'administration de la protéine ou du gène durant la phase pré-symptomatique. En protégeant les neurones de la SN restants alors que leur nombre est encore suffisant pour obtenir une synthèse suffisante de DA, on pourrait théoriquement empêcher la survenue des symptômes. Cette approche constitue la thérapie idéale de la MP. Cependant, elle nécessite la mise au point de méthodes de diagnostic pré-symptomatique extrêmement fiables et pouvant être mis en place à grande échelle. La compréhension des mécanismes de compensation lors de cette phase est donc une voie de recherche primordiale afin de disposer de marqueurs biochimiques permettant d'étudier l'évolution de la maladie.

En conclusion, le GDNF est clairement une molécule au potentiel prometteur pour le traitement de protection de la MP. De nombreuses études ont permis d'étoffer le socle de connaissances concernant ses effets sur le système dopaminergique et les conditions d'une utilisation optimale. Les premiers essais cliniques restent à confirmer et révèlent la nécessité de disposer d'un système d'administration plus sûr et plus efficace. En outre, plusieurs travaux restent à entreprendre pour comprendre pleinement son action et ainsi optimiser et sécuriser son utilisation chez l'homme, point crucial pour sa future appartenance à la pharmacopée neurologique.

III. La thérapie génique pour exprimer le GDNF : quel avenir?

Le fait que le GDNF ne franchisse pas la BHE a entraîné le développement et l'utilisation de différentes méthodes pour permettre au GDNF d'atteindre sa cible. L'injection puis l'infusion intracérébrale de la protéine purifiée ont été les premières mises en œuvre, ce qui a permis de démontrer un grand nombre des propriétés du GDNF sur la voie nigrostriée chez le rongeur et le primate non humain. Les résultats encourageants ont ouvert la voie à différents essais cliniques de phase I et II. Cependant, plusieurs inconvénients caractérisent cette technique. Tout d'abord, l'utilisation d'un cathéter pourrait être en partie responsable des effets bénéfiques limités. En effet, ce système semble ne pas permettre une libération et une diffusion optimale au sein de la zone cible, ce qui expliquerait la restriction du GDNF recombinant au niveau du site de libération de l'amélioration de la recapture et les légers changements d'immunoréactivité à la TH (Gill et al., 2003). L'utilisation d'une protéine recombinante, pourrait être responsable de la génération d'anticorps dirigé contre cette protéine, reconnu comme étrangère. Par ailleurs, la réaction immunitaire dirigée contre la protéine exogène pourrait aussi être liée à la technique, en particulier on peut penser à la fuite de la protéine dans l'abdomen lors du remplissage de la pompe, ce qui soulève la question de la sécurité de l'implantation abdominale de la pompe.

Il est donc important de développer des stratégies alternatives pour libérer localement le GDNF de façon optimale et sûre. La TG se positionne comme une technique très prometteuse. Ses avantages par rapport à l'infusion intracérébrale sont :

- (1) La possibilité de libérer de façon continue et à long terme le GDNF ainsi que de permettre sa diffusion importante dans le tissu cible.
- (2) La possibilité de transférer l'ADNc codant le GDNF ayant le polymorphisme de l'individu et d'empêcher ainsi une réaction immunitaire dirigée contre la protéine exogène. Par ailleurs, La faible fuite du GDNF dans le liquide céphalorachidien est prévenue, qui limite la survenue de réaction immunitaire potentielle.
- (3) une sécurité technique importante, évitant en particulier les risques d'infection liés au cathéter implanté (Gill et al., 2003)
- (4) La possibilité de traiter un individu par une intervention unique, ce qui évite le remplissage fréquent de la pompe indispensable dans le cas de l'infusion.

Avant d'initier dans des essais cliniques de la MP, deux points primordiaux nécessitent d'être étudiés et clarifiés :

1. Sureté et fiabilité de la TG

La question cruciale, à ce jour sans réponse claire, est de savoir si la TG est une méthode sûre. Récemment, deux essais de TG se sont soldés par un échec de par les effets secondaires rencontrés. En 2002, un essai de TG basé sur l'utilisation d'un vecteur rétroviral pour traiter des patients atteints d'une déficience immunitaire combinée sévère a été arrêté après que trois des onze patients ont développé une leucémie (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Les analyses ADN ont révélé que le vecteur rétroviral s'était intégré dans 40 sites différents du génome hôte, incluant le gène LMO-2. Ce gène est lié à l'oncogénèse et contribue à la croissance anormale des lymphocytes T. Ainsi, il se révèle que la mutagenèse insertionnelle est un facteur à prendre très sérieusement en compte. Récemment, des lentivecteurs non intégratifs pourvus d'une intégrase mutée ont été mis au point dans différents laboratoires dont celui de Jacques Mallet (Nightingale et al., 2006). Ces vecteurs, bien que moins efficaces que les lentivecteurs intégratifs, pourraient éviter les risques liés à la mutagenèse insertionnelle.

Dans un second essai, un patient a développé une réaction immunitaire sévère dirigée contre un adénovecteur, le menant à la mort cinq jours après injection (Raper et al., 2003). Ce patient, qui souffrait d'une déficience en Ornithine Transcarbamylase (OTC), avait été traité par une infusion d'un adénovecteur codant l'OTC dans l'artère hépatique droite. L'issue fatale de ce traitement aurait été provoquée par l'exposition préalable du patient à un adénovirus, qui aurait entraîné la réaction autoimmune dirigée contre le vecteur. En outre, un autre patient de cet essai, traité avec des doses plus faibles de vecteur, a souffert lui aussi de fortes fièvres, ce qui suggère que l'exposition préalable des individus à un adénovirus suivi de l'injection d'un adénovecteur peut entraîner une réaction immunitaire sévère voire fatale. Cet essai met en relief l'obligation de sélectionner rigoureusement les personnes susceptibles de tolérer le transfert de gène viral.

2. Régulation de l'expression du transgène

Quel que soit le vecteur utilisé en clinique, la régulation de l'expression du transgène est un point primordial. En effet, à tout moment de la thérapie, le médecin doit être en mesure de contrôler la dose de molécule thérapeutique synthétisée et d'arrêter le traitement si des effets secondaires apparaissent. Notons que pour ce dernier cas, il n'est pas certain que l'arrêt du traitement par le GDNF permettrait de stopper certains effets secondaires, en particulier ceux éventuellement provoqués par une formation ectopique irréversible de collatérales. Différents systèmes de régulation ont été adaptés pour l'utilisation en transfert de gène par des vecteurs viraux. Parmi ceux-ci, le plus étudié est celui reposant sur la régulation par l'antibiotique tétracycline ou la doxycycline, un analogue plus efficace (Corti et

al., 1999; Déglon et al., 1999; Georgievska et al., 2004; Vogel et al., 2004). Mais, l'utilisation en clinique est entravée par l'immunogénicité de la protéine tetR fixant la tétracycline et par la fuite importante à l'état non activé. Bien que d'autres systèmes plus efficaces et plus sûrs aient été étudiés par la suite (Vogel et al., soumis), la faiblesse des données et des résultats ne permettent pas de disposer encore d'un système de régulation finement caractérisé et dont la sécurité d'utilisation soit suffisante pour une application à l'homme. De nombreuses études restent donc à effectuer pour s'assurer de l'efficacité et de la sécurité de ces systèmes, ce qui doit retarder d'autant plus l'application à l'homme du transfert de gène. Néanmoins, certaines approches thérapeutiques, en particulier le traitement de certains cancers par la surexpression de la protéine p53, pourraient être envisagées sans la régulation de la protéine thérapeutique. Dans ce cas précis, le but étant de détruire les cellules cancéreuses, on peut penser que l'excès du transgène ou du vecteur pourrait ne pas être délétère pour le patient.

Quel vecteur pour la TG de protection de la maladie de Parkinson ?

Plusieurs vecteurs différents ont été utilisés pour transférer le gène du GDNF dans le cerveau de modèles animaux de la MP : les vecteurs herpétiques, les adénovecteurs, les AAVecteurs et les lentivecteurs. A ce jour, les vecteurs herpès sont à exclure car ils provoquent une forte réaction immunitaire et inflammatoire qui conduit à une expression faible et à court terme du GDNF ainsi qu'un dommage important du tissu ciblé (Monville et al., 2004). En outre, aucun effet bénéfique de l'expression du GDNF par ces vecteurs n'a été encore rapporté.

Les mêmes inconvénients sont retrouvés pour les adénovecteurs de 1^{ère} et 3^{ème} génération utilisés pour exprimer le GDNF (Bilang-Bleuel et al., 1997 ; Choi-Lundberg et al., 1997 ; Do Thi et al., 2004). L'adénovecteur gutless, dépourvu de toute séquence virale, devrait permettre de diminuer la forte réaction immunitaire provoquée, sans néanmoins l'éradiquer totalement. Cependant, dans une logique de prévention de la dispersion du GDNF dans des zones cérébrales non désirées, le transport rétrograde de l'adénovecteur pose un problème préoccupant : En effet, le vecteur est transporté dans toutes les zones neuronales émettant des projections vers le striatum, en particulier la SN et le cortex cérébral. Dans ces structures, le GDNF serait donc synthétisé et libéré, aboutissant à la formation de sprouting, pouvant désorganiser la communication neuronale. Si le sprouting aberrant au niveau de la SN empêche la récupération fonctionnelle, qu'en sera-t-il du sprouting au niveau du cortex ? Les effets secondaires plus ou moins importants étant donc à envisager, des doutes légitimes pèsent sur le choix de ces vecteurs.

Les études utilisant l'AAVecteur pour exprimer le GDNF ont fourni des résultats prometteurs. Cependant, malgré l'absence de réaction immunitaire induite et la forte expression à long terme du GDNF, l'inconvénient majeur de ces vecteurs pour la TG de protection demeure leur tropisme préférentiellement neuronal qui ne pourra pas prévenir la dispersion de la protéine (Kirik et al., 2000a). Bien que certains sérotypes pourraient transduire plus fortement les astrocytes que le sérotype AAV-2 communément utilisé, il semble que la restriction astrocytaire soit loin d'être totale. L'utilisation de promoteurs spécifiques des astrocytes tels que le promoteur GFAP, de taille plus importante que les promoteurs viraux, rencontrera une limite constituée par la faible capacité de clonage dans les AAVecteurs (environ 4,5 kb). L'immunogénéicité potentielle des AAVecteurs chez des individus préimmunisés pose aussi un problème et nécessite donc de sélectionner les individus non immunisés pour recevoir une injection intracérébrale d'AAVecteur.

A ce jour, seuls les AAVecteurs ont été approuvés pour l'utilisation en thérapie génique expérimentale humaine. Depuis deux ans, trois essais cliniques ont été lancés en utilisant l'AAVecteur pour le traitement expérimental de la MP : l'injection de l'AAV-GAD dans le noyau sub-thalamique financé par Neurologix, l'injection de l'AAV-AADC dans le striatum financé par Avigen et enfin l'injection de l'AAV-NTN dans le striatum financé par Ceregene. On peut se demander pourquoi le premier essai clinique de TG de protection n'a pas été réalisé avec le gène du GDNF mais avec celui de la NTN. A ce jour, les données publiées avec la NTN sont faibles et les résultats mitigés. En effet, l'injection intrastriatale de la NTN chez le rat lésé à la 6-OHDA permet une forte protection des neurones dopaminergiques de la SN mais pas de protection des fibres dopaminergiques. En conséquence, aucune correction motrice n'est obtenue (Fjord-Larsen et al., 2005). On peut penser que les éventuels effets bénéfiques obtenus par l'équipe de Jeffrey Kordower dans des études non publiées mais qui ont fait l'objet « d'abstracts » auront réussi à faire pencher la balance bénéfique/risque du côté bénéfique... Cet essai reste tout de même prématuré. Car bien que ces vecteurs soient potentiellement non immunogènes, on ne peut passer sous silence la dispersion éventuelle de la NTN dans le SNC et les effets irréversibles potentiels produits par l'action de la NTN dans les zones de projection striatale, tout comme l'absence de preuve formelle de l'efficacité de la NTN chez l'animal. En outre, la synthèse de la NTN ne peut pas être abolie ni contrôlée. Ainsi, si des effets secondaires surviennent, il n'existera pas de moyen d'arrêter le traitement. Les patients seront condamnés à vivre le restant de leurs jours avec ce vecteur dans le cerveau, ce qui éthiquement paraît très douteux.

Enfin, le lentivecteur, en particulier celui dérivé du VIH-1 utilisé dans cette étude, possède aussi des caractéristiques intéressantes le positionnant en bonne place pour

envisager une application clinique. Le fait de pouvoir cibler préférentiellement les astrocytes pour l'expression localisée du GDNF est un nouvel élément crucial. Par ailleurs, le vecteur dérivé du VIH est très peu immunogène (comparable à l'injection de PBS, comme le montre notre étude) et la probabilité de « sauvetage », c'est-à-dire de générer un vecteur répliquatif, est très faible. Malgré cela, un travail de sécurisation de ces vecteurs reste encore à réaliser pour s'assurer de leur fiabilité pour une utilisation clinique de routine. En effet, tout comme pour le vecteur AAV, l'utilisation du vecteur lentiviral pour la TG du SNC chez l'homme est prometteuse mais encore prématurée. Le passage en clinique des lentivecteurs nécessite tout d'abord de disposer d'une méthode de production reproductible permettant l'obtention de stocks de vecteurs en grande quantité. De plus, il est important de déterminer quel est le risque du traitement par le lentivecteur chez les individus atteints du VIH et donc d'établir des critères stricts de sélection de la population pouvant être en mesure d'être traitée par ces vecteurs. Le choix de lentivecteurs dérivés du FIV ou de l'EIAV permettrait de sécuriser le transfert de gène chez l'homme, mais il n'est pas certain que les protéines virales de ces vecteurs ne seront pas reconnues par le système immunitaire humain. En outre, le risque d'intégration mutationnelle des lentivecteurs est une question majeure. Récemment, le développement de lentivecteurs non intégratifs a permis d'envisager de franchir cette limite. Chez le rongeur, ces vecteurs sont capables en effet d'exprimer un transgène dans le SNC sans intégration du génome viral (Yanez-Munoz et al., 2006). De nombreuses optimisations restent néanmoins à réaliser pour disposer d'un lentivecteur non intégratif permettant une expression efficace et à long terme. Enfin, au-delà de la sûreté des lentivecteurs, l'utilisation du vecteur dérivé du VIH doit faire face à des réticences de la population et même de certains chercheurs, de par l'origine du virus parent, ce qui nécessite un travail important de communication et de pédagogie.

Il est certain que l'évaluation précise de cette approche chez l'homme, passant par la vérification de la biosécurité et de l'efficacité des vecteurs, ne doit pas être entreprise directement chez des patients atteints de la MP. En effet, ces patients peuvent vivre longtemps avec leurs déficits et nous disposons de traitements pouvant pallier certains symptômes invalidants. L'évaluation du potentiel des lentivecteurs chez l'homme doit donc être réalisés chez des patients en phase terminale de maladies graves, comme les cancers, en transférant des gènes étant impliqués par exemple dans le contrôle de la douleur. Cette alternative aux essais cliniques prématurés impliquant des malades atteints de maladies non létales (en particulier, l'essai réalisé par Ceregene avec l'AAV-NTN), afin de tester les lentivecteurs paraît plus envisageable du point de vue éthique.

En conclusion, la thérapie génique des maladies du SNC demeure une thérapie prometteuse du futur qui en est encore à ces balbutiements. Un effort de recherche et de

développement doit donc être encore réalisé pour obtenir un système fiable, efficace et sûr. La responsabilité, la patience et le recul employés pour perfectionner et sécuriser cette approche seront les alliés de son utilisation la plus consciente, efficace et sûre possible pour le traitement de ces maladies désastreuses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abordo-Adesida E, Follenzi A, Barcia C, Sciascia S, Castro MG, Naldini L, Lowenstein PR (2005) Stability of lentiviral vector-mediated transgene expression in the brain in the presence of systemic antivector immune responses. *Hum Gene Ther* 16:741-751.
- Agid Y, Blin J (1987) Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system: clinical aspects. *Ciba Found Symp* 126:3-29.
- Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3:383-394.
- Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E (2001) Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:8108-8118.
- Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS (1996) High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70:2581-2585.
- Alam M, Schmidt WJ (2004) L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. *Behav Brain Res* 153:439-446.
- Anden NE, Magnusson T, Rosengren E (1964a) On the presence of dihydroxyphenylalanine decarboxylase in nerves. *Experientia* 20:328-329.
- Anden NE, Carlsson A, Dahlstroem A, Fuxe K, Hillarp NA, Larsson K (1964b) Demonstration and Mapping out of Nigro-Neostriatal Dopamine Neurons. *Life Sci* 3:523-530.
- Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF (1995) GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15:1465-1473.
- Auricchio A, Kobinger G, Anand V, Hildinger M, O'Connor E, Maguire AM, Wilson JM, Bennett J (2001) Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* 10:3075-3081.
- Azzouz M, Ralph S, Wong LF, Day D, Askham Z, Barber RD, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Mazarakis ND (2004) Neuroprotection in a rat Parkinson model by GDNF gene therapy using EIAV vector. *Neuroreport* 15:985-990.
- Baekelandt V, Claeys A, Eggermont K, Lauwers E, De Strooper B, Nuttin B, Debyser Z (2002) Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Hum Gene Ther* 13:841-853.
- Bahloul C, Jacob Y, Tordo N, Perrin P (1998) DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* 16:417-425.
- Baldassarre G, Bruni P, Boccia A, Salvatore G, Melillo RM, Motti ML, Napolitano M, Belletti B, Fusco A, Santoro M, Viglietto G (2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces proliferative inhibition of NT2/D1 cells through RET-mediated up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Oncogene* 21:1739-1749.
- Balliet JW, Bates P (1998) Efficient infection mediated by viral receptors incorporated into retroviral particles. *J Virol* 72:671-676.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM, Jr., Milbrandt J (1998) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21:1291-1302.
- Bankiewicz KS, Oldfield EH, Chiueh CC, Doppman JL, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1986) Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci* 39:7-16.
- Barbeau A (1960) Preliminary observations on abnormal catecholamine metabolism in basal ganglia diseases. *Neurology* 10:446-451.
- Barbeau A (1986) [At the frontiers of the brain--the neurologist and his literature]. *Union Med Can* 115:884-890.
- Barkats M, Horellou P, Colin P, Millecamps S, Faucon-Bigué N, Mallet J (2006) 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity is attenuated by adenoviral gene transfer of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* 83:233-242.
- Barneoud P, Parmentier S, Mazadier M, Miquet JM, Boireau A, Dubedat P, Blanchard JC (1995) Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience* 67:837-848.
- Barroso-Chinea P, Cruz-Muros I, Aymerich MS, Rodriguez-Diaz M, Afonso-Oramas D, Lanciego JL, Gonzalez-Hernandez T (2005) Striatal expression of GDNF and differential vulnerability of midbrain dopaminergic cells. *Eur J Neurosci* 21:1815-1827.

- Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F (1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 373:339-341.
- Behrstock S, Ebert A, McHugh J, Vosberg S, Moore J, Schneider B, Capowski E, Hei D, Kordower J, Aebischer P, Svendsen CN (2006) Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther* 13:379-388.
- Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, Kesavapany S, Miller DW, Petsko GA, Cookson MR (2005) Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5703-5708.
- Bemelmans AP, Horellou P, Pradier L, Brunet I, Colin P, Mallet J (1999) Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther* 10:2987-2997.
- Bemelmans AP, Bonnel S, Houhou L, Dufour N, Nandrot E, Helmlinger D, Sarkis C, Abitbol M, Mallet J (2005) Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. *J Gene Med* 7:1367-1374.
- Benabid AL (2003) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 13:696-706.
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol* 50:344-346.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382-389.
- Bensadoun JC, Deglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD, Aebischer P (2000) Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp Neurol* 164:15-24.
- Berendse HW, Booij J, Francot CM, Bergmans PL, Hijman R, Stoof JC, Wolters EC (2001) Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decreased sense of smell. *Ann Neurol* 50:34-41.
- Beresford IJ, Davenport AP, Sirinathsinghji DJ, Hall MD, Hill RG, Hughes J (1988) Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP+ into the nigrostriatal dopamine pathway--II. Differential localization of dopamine and cholecystokinin receptors. *Neuroscience* 27:129-143.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.
- Berger K, Przedborski S, Cadet JL (1991) Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Res Bull* 26:301-307.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438.
- Berkowitz R, Ilves H, Lin WY, Eckert K, Coward A, Tamaki S, Veres G, Plavec I (2001) Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *J Virol* 75:3371-3382.
- Bermingham N, Hillermann R, Gilmour F, Martin JE, Fisher EM (1995) Human glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5. *Hum Genet* 96:671-673.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20:415-455.
- Besset V, Scott RP, Ibanez CF (2000) Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 275:39159-39166.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-1306.
- Bezard E, Gross CE, Brotchie JM (2003) Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci* 26:215-221.
- Bezard E, Dovero S, Bioulac B, Gross CE (1997a) Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. *Neurosci Lett* 234:47-50.

- Bezard E, Crossman AR, Gross CE, Brotchie JM (2001) Structures outside the basal ganglia may compensate for dopamine loss in the presymptomatic stages of Parkinson's disease. *Faseb J* 15:1092-1094.
- Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B, Gross CE (1997b) A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res* 766:107-112.
- Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert JJ, Mallet J, Horellou P (1997) Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8818-8823.
- Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C, Kirik D (1997) Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 4:186-200.
- Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ (2000) Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res* 886:82-98.
- Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71:6641-6649.
- Bohn MC (2004) Motoneurons crave glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 190:263-275.
- Bonifati V, Oostra BA, Heutink P (2004) Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Mol Med* 82:163-174.
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P (2003) DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 24:159-160.
- Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M, Bredesen DE, Edery P, Mehlen P (2000) The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *Embo J* 19:4056-4063.
- Bouvier MM, Mytilineou C (1995) Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci* 15:7141-7149.
- Bowenkamp KE, Hoffman AF, Gerhardt GA, Henry MA, Biddle PT, Hoffer BJ, Granholm AC (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 355:479-489.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 249 Suppl 3:III/1-5.
- Bradford HF, Zhou J, Pliego-Rivero B, Stern GM, Jauniaux E (1999) Neurotrophins in the pathogenesis and potential treatment of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 80:19-25.
- Brizard M, Carcenac C, Bemelmans AP, Feuerstein C, Mallet J, Savasta M (2006) Functional reinnervation from remaining DA terminals induced by GDNF lentivirus in a rat model of early Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21:90-101.
- Bromberg JS, Debruyne LA, Qin L (1998) Interactions between the immune system and gene therapy vectors: bidirectional regulation of response and expression. *Adv Immunol* 69:353-409.
- Brown RG, Marsden CD (1988) 'Subcortical dementia': the neuropsychological evidence. *Neuroscience* 25:363-387.
- Brownell AL, Jenkins BG, Elmaleh DR, Deacon TW, Speelman RD, Isacson O (1998) Combined PET/MRS brain studies show dynamic and long-term physiological changes in a primate model of Parkinson disease. *Nat Med* 4:1308-1312.
- Brun S, Faucon-Bigué N, Mallet J (2003) Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implications for gene therapy. *Mol Ther* 7:782-789.
- Brundin P, Pogarell O, Hagell P, Piccini P, Widner H, Schrag A, Kupsch A, Crabb L, Odin P, Gustavii B, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Oertel WH, Quinn NP, Rehncrona S, Lindvall O (2000) Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazaroids in Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 7):1380-1390.
- Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A, Davies AM (1995) GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* 15:821-828.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8033-8037.

- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4546-4550.
- Byrnes KR, Wu X, Waynant RW, Ilev IK, Anders JJ (2005) Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. *Lasers Surg Med* 37:161-171.
- Cadet JL, Zhu SM (1992) The intrastriatal 6-hydroxydopamine model of hemiparkinsonism: quantitative receptor autoradiographic evidence of correlation between circling behavior and presynaptic as well as postsynaptic nigrostriatal markers in the rat. *Brain Res* 595:316-326.
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9103-9108.
- Carlsson A (1959) Detection and assay of dopamine. *Pharmacol Rev* 11:300-304.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127:471.
- Castellanos JE, Martinez M, Acosta O, Hurtado H (2000) Nerve growth factor and neurotrophin-3 modulate the rabies infection of adult sensory neurons in primary cultures. *Brain Res* 871:120-126.
- Chamberlin NL, Du B, de Lacalle S, Saper CB (1998) Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res* 793:169-175.
- Chan SY, Speck RF, Ma MC, Goldsmith MA (2000) Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *J Virol* 74:4933-4937.
- Chazal N, Singer G, Aiken C, Hammarskjold ML, Rekosh D (2001) Human immunodeficiency virus type 1 particles pseudotyped with envelope proteins that fuse at low pH no longer require Nef for optimal infectivity. *J Virol* 75:4014-4018.
- Chebrolu H, Slevin JT, Gash DA, Gerhardt GA, Young B, Given CA, Smith CD (2006) MRI volumetric and intensity analysis of the cerebellum in Parkinson's disease patients infused with glial-derived neurotrophic factor (GDNF). *Exp Neurol*.
- Chen S (1990) [Study of an MPTP-induced parkinsonian animal model in the rhesus monkey and the mechanism of the action of MPTP]. *Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi* 23:23-26, 62.
- Chen ZY, He ZY, He C, Lu CL, Wu XF (2000) A Structure-function Analysis of Human GDNF. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 32:243-247.
- Choi-Lundberg DL, Bohn MC (1995) Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Brain Res Dev Brain Res* 85:80-88.
- Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275:838-841.
- Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 100:111-114.
- Collier TJ, Sortwell CE (1999) Therapeutic potential of nerve growth factors in Parkinson's disease. *Drugs Aging* 14:261-287.
- Connor B, Kozlowski DA, Schallert T, Tillerson JL, Davidson BL, Bohn MC (1999) Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the striatum and substantia nigra of the aged Parkinsonian rat. *Gene Ther* 6:1936-1951.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT, Jr. (2000a) Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39:2552-2563.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. (2000b) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:571-576.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Harper JD, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. (2000c) Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. *Ann N Y Acad Sci* 920:42-45.
- Cookson MR, Xiromerisiou G, Singleton A (2005) How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease. *Curr Opin Neurol* 18:706-711.

- Corbeau P, Kraus G, Wong-Staal F (1998) Transduction of human macrophages using a stable HIV-1/HIV-2-derived gene delivery system. *Gene Ther* 5:99-104.
- Cornet A, Bettelli E, Oukka M, Cambouris C, Avellana-Adalid V, Kosmatopoulos K, Liblau RS (2000) Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *J Neuroimmunol* 106:69-77.
- Corti O, Sanchez-Capelo A, Colin P, Hanoun N, Hamon M, Mallet J (1999) Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12120-12125.
- Costa S, Iravani MM, Pearce RK, Jenner P (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor concentration dependently improves disability and motor activity in MPTP-treated common marmosets. *Eur J Pharmacol* 412:45-50.
- Coulpier M, Ibanez CF (2004) Retrograde propagation of GDNF-mediated signals in sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 27:132-139.
- Cousins MS, Salamone JD (1996) Skilled motor deficits in rats induced by ventrolateral striatal dopamine depletions: behavioral and pharmacological characterization. *Brain Res* 732:186-194.
- Cousins MS, Sokolowski JD, Salamone JD (1993) Different effects of nucleus accumbens and ventrolateral striatal dopamine depletions on instrumental response selection in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 46:943-951.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH (1977) Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science* 197:596-598.
- Crystal RG, Jaffe A, Brody S, Mastrangeli A, McElvaney NG, Rosenfeld M, Chu CS, Danel C, Hay J, Eissa T (1995) A phase 1 study, in cystic fibrosis patients, of the safety, toxicity, and biological efficacy of a single administration of a replication deficient, recombinant adenovirus carrying the cDNA of the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the lung. *Hum Gene Ther* 6:643-666.
- Cunningham LA, Su C (2002) Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 174:230-242.
- Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG (1988) Platelets as a model for neurones? *Experientia* 44:115-126.
- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398-399.
- Danos O, Mulligan RC (1988) Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6460-6464.
- Davidoff MS, Middendorff R, Koeva Y, Pusch W, Jezek D, Muller D (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors GFRalpha-1 and GFRalpha-2 in the human testis. *Ital J Anat Embryol* 106:173-180.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1:249-254.
- Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS (1999) A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12760-12765.
- de Almeida LP, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2001) Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8:433-446.
- de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2002) Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 22:3473-3483.
- DeKosky ST, Marek K (2003) Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 302:830-834.
- Denesvre C, Carrington C, Corbin A, Takeuchi Y, Cosset FL, Schulz T, Sitbon M, Sonigo P (1996) TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions. *J Virol* 70:4380-4386.
- Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N, Perrin P, Schwartz O, de Rocquigny H, Heard JM (2001) Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. *Mol Ther* 4:149-156.

- Do Thi NA, Saillour P, Ferrero L, Dedieu JF, Mallet J, Paunio T (2004) Delivery of GDNF by an E1,E3/E4 deleted adenoviral vector and driven by a GFAP promoter prevents dopaminergic neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 11:746-756.
- Double KL, Rowe DB, Hayes M, Chan DK, Blackie J, Corbett A, Joffe R, Fung VS, Morris J, Halliday GM (2003) Identifying the pattern of olfactory deficits in Parkinson disease using the brief smell identification test. *Arch Neurol* 60:545-549.
- Duan D, Yan Z, Yue Y, Engelhardt JF (1999) Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* 261:8-14.
- Duan D, Yang H, Zhang J, Zhang J, Xu Q (2005) Long-term restoration of nigrostriatal system function by implanting GDNF genetically modified fibroblasts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 161:316-324.
- Duisit G, Conrath H, Saleun S, Folliot S, Provost N, Cosset FL, Sandrin V, Moullier P, Rolling F (2002) Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat. *Mol Ther* 6:446-454.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463-8471.
- Dunnett SB, Iversen SD (1982a) Neurotoxic lesions of ventrolateral but not anteromedial neostriatum in rats impair differential reinforcement of low rates (DRL) performance. *Behav Brain Res* 6:213-226.
- Dunnett SB, Iversen SD (1982b) Spontaneous and drug-induced rotation following localized 6-hydroxydopamine and kainic acid-induced lesions of the neostriatum. *Neuropharmacology* 21:899-908.
- Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkeny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, et al. (1996) GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381:789-793.
- Duvoisin RC (1976) Parkinsonism: animal analogues of the human disorder. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 55:293-303.
- Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD (1996) Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 48:1-19.
- Ebendal T, Tomac A, Hoffer BJ, Olson L (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates fiber formation and survival in cultured neurons from peripheral autonomic ganglia. *J Neurosci Res* 40:276-284.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* 38:1236-1239.
- Ehringer H, Hornykiewicz O, Lechner K (1960) [The effect of chlorpromazine on catecholamine and 5-hydroxytryptamine metabolism in the rat brain.]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol* 239:507-519.
- Eidelberg E, Brooks BA, Morgan WW, Walden JG, Kokemoor RH (1986) Variability and functional recovery in the N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinsonism in monkeys. *Neuroscience* 18:817-822.
- Eketjall S, Fainzilber M, Murray-Rust J, Ibanez CF (1999) Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex. *Embo J* 18:5901-5910.
- Emborg ME, Carbon M, Holden JE, During MJ, Ma Y, Tang C, Moirano J, Fitzsimons H, Roitberg BZ, Tuccar E, Roberts A, Kaplitt MG, Eidelberg D (2006) Subthalamic glutamic acid decarboxylase gene therapy: changes in motor function and cortical metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Engel J, Schubert D, Bohn MC (1991) Conditioned media derived from glial cell lines promote survival and differentiation of dopaminergic neurons in vitro: role of mesencephalic glia. *J Neurosci Res* 30:359-371.
- Engelstadter M, Buchholz CJ, Bobkova M, Steidl S, Merget-Millitzer H, Willemsen RA, Stitz J, Cichutek K (2001) Targeted gene transfer to lymphocytes using murine leukaemia virus vectors pseudotyped with spleen necrosis virus envelope proteins. *Gene Ther* 8:1202-1206.
- Enomoto H, Hughes I, Golden J, Baloh RH, Yonemura S, Heuckeroth RO, Johnson EM, Jr., Milbrandt J (2004) GFRalpha1 expression in cells lacking RET is dispensable for organogenesis and nerve regeneration. *Neuron* 44:623-636.
- Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, Mandel RJ, Annett L, Kirik D (2005) Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using

- recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 25:769-777.
- Falck B, Torp A (1962) New evidence for the localization of noradrenalin in the adrenergic nerve terminals. *Med Exp Int J Exp Med* 6:169-172.
- Fang B, Wang H, Gordon G, Bellinger DA, Read MS, Brinkhous KM, Woo SL, Eisensmith RC (1996) Lack of persistence of E1- recombinant adenoviral vectors containing a temperature-sensitive E2A mutation in immunocompetent mice and hemophilia B dogs. *Gene Ther* 3:217-222.
- Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7:306-318.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301.
- Feiden W, Feiden U, Gerhard L, Reinhardt V, Wandeler A (1985) Rabies encephalitis: immunohistochemical investigations. *Clin Neuropathol* 4:156-164.
- Fjord-Larsen L, Johansen JL, Kusk P, Tornoe J, Gronborg M, Rosenblad C, Wahlberg LU (2005) Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified Neurturin construct. *Exp Neurol* 195:49-60.
- Foggini CM (1982) Atypical rabies virus in cats and a dog in Zimbabwe. *Vet Rec* 110:338.
- Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L (2000) Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25:217-222.
- Fornai F, Schluter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, Ruggieri S, Paparelli A, Sudhof TC (2005) Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3413-3418.
- Forno LS (1986) Lewy bodies. *N Engl J Med* 314:122.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60:600-608.
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, Ricaurte GA (1986a) Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 20:449-455.
- Forno LS, Sternberger LA, Sternberger NH, Strefling AM, Swanson K, Eng LF (1986b) Reaction of Lewy bodies with antibodies to phosphorylated and non-phosphorylated neurofilaments. *Neurosci Lett* 64:253-258.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344:710-719.
- Gash DM, Zhang Z, Ai Y, Grondin R, Coffey R, Gerhardt GA (2005) Trophic factor distribution predicts functional recovery in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol* 58:224-233.
- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380:252-255.
- Gaudin Y, Ruigrok RW, Tuffereau C, Knossow M, Flamand A (1992) Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 187:627-632.
- Gee JR, Keller JN (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1145-1150.
- Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A (2002a) Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp Neurol* 177:461-474.
- Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A (2004a) Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor using a lentiviral vector induces time- and dose-dependent downregulation of tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *J Neurosci* 24:6437-6445.
- Georgievska B, Kirik D, Rosenblad C, Lundberg C, Bjorklund A (2002b) Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastriatal GDNF gene transfer using a lentiviral vector. *Neuroreport* 13:75-82.
- Georgievska B, Jakobsson J, Persson E, Ericson C, Kirik D, Lundberg C (2004b) Regulated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor into rat striatum, using a tetracycline-dependent lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 15:934-944.
- German DC, Dubach M, Askari S, Speciale SG, Bowden DM (1988) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonian syndrome in *Macaca fascicularis*: which midbrain dopaminergic neurons are lost? *Neuroscience* 24:161-174.

- Giasson BI, Lee VM (2000) A new link between pesticides and Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1227-1228.
- Giasson BI, Lee VM (2003) Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 114:1-8.
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276:2380-2386.
- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34:521-533.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9:589-595.
- Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB (1996) Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem* 66:2004-2010.
- Glinka YY, Youdim MB (1995) Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 292:329-332.
- Gotham AM, Brown RG, Marsden CD (1986) Depression in Parkinson's disease: a quantitative and qualitative analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49:381-389.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
- Grondin R, Gash DM (1998) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* 245:P35-42.
- Grondin R, Zhang Z, Yi A, Cass WA, Maswood N, Andersen AH, Elsberry DD, Klein MC, Gerhardt GA, Gash DM (2002) Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain* 125:2191-2201.
- Grunblatt E, Mandel S, Youdim MB (2000) MPTP and 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration as models for Parkinson's disease: neuroprotective strategies. *J Neurol* 247 Suppl 2:II95-102.
- Guttman M, Fibiger HC, Jakubovic A, Calne DB (1990) Intracarotid 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration: biochemical and behavioral observations in a primate model of hemiparkinsonism. *J Neurochem* 54:1329-1334.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
- Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehncrona S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, Lindvall O (2002) Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 5:627-628.
- Hagell P, Schrag A, Piccini P, Jahanshahi M, Brown R, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Odin P, Wenning GK, Morrish P, Gustavii B, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O (1999) Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain* 122 (Pt 6):1121-1132.
- Halbert CL, Rutledge EA, Allen JM, Russell DW, Miller AD (2000) Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* 74:1524-1532.
- Hantraye P, Varastet M, Peschanski M, Riche D, Cesaro P, Willer JC, Maziere M (1993) Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience* 53:169-178.
- Harrison AK, Murphy FA (1978) Lyssavirus infection of muscle spindles and motor end plates in striated muscle of hamsters. *Arch Virol* 57:167-175.
- Hart MN, Fabry Z (1995) CNS antigen presentation. *Trends Neurosci* 18:475-481.
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson LC, et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266:1062-1064.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-348.
- Hirsch EC, Breidert T, Rousset E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:214-228.
- Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17:427-442.

- Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, Lin LF, Gerhardt GA (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett* 182:107-111.
- Hoglinger GU, Feger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem* 84:491-502.
- Hollerman JR, Grace AA (1990) The effects of dopamine-depleting brain lesions on the electrophysiological activity of rat substantia nigra dopamine neurons. *Brain Res* 533:203-212.
- Horellou P, Mallet J (1997) Gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 15:241-256.
- Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E, Jr., Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA, Phillips HS (1998) Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 18:4929-4937.
- Hudson J, Granholm AC, Gerhardt GA, Henry MA, Hoffman A, Biddle P, Leela NS, Mackerlova L, Lile JD, Collins F, et al. (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor augments midbrain dopaminergic circuits in vivo. *Brain Res Bull* 36:425-432.
- Hughes NR, McKnight AT, Woodruff GN, Hill MP, Crossman AR, Brotchie JM (1998) Kappa-opioid receptor agonists increase locomotor activity in the monoamine-depleted rat model of parkinsonism. *Mov Disord* 13:228-233.
- Hurelbrink CB, Barker RA (2001) Prospects for the treatment of Parkinson's disease using neurotrophic factors. *Expert Opin Pharmacother* 2:1531-1543.
- Ichitani Y, Okamura H, Matsumoto Y, Nagatsu I, Iyata Y (1991) Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res* 549:350-353.
- Indraccolo S, Minuzzo S, Feroli F, Mammano F, Calderazzo F, Chieco-Bianchi L, Amadori A (1998) Pseudotyping of Moloney leukemia virus-based retroviral vectors with simian immunodeficiency virus envelope leads to targeted infection of human CD4+ lymphoid cells. *Gene Ther* 5:209-217.
- Irizarry MC, Kim TW, McNamara M, Tanzi RE, George JM, Clayton DF, Hyman BT (1996) Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:889-895.
- Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH (1995) Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med* 1:1189-1194.
- Ischiropoulos H, Beckman JS (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111:163-169.
- Iwakuma T, Cui Y, Chang LJ (1999) Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 261:120-132.
- Iwamoto T, Taniguchi M, Asai N, Ohkusu K, Nakashima I, Takahashi M (1993) cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene* 8:1087-1091.
- Iwasaki Y, Clark HF (1975) Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. II. Experimental rabies in mouse. *Lab Invest* 33:391-399.
- Jakobsson J, Georgievska B, Ericson C, Lundberg C (2004) Lesion-dependent regulation of transgene expression in the rat brain using a human glial fibrillary acidic protein-lentiviral vector. *Eur J Neurosci* 19:761-765.
- Jakobsson J, Ericson C, Jansson M, Bjork E, Lundberg C (2003) Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. *J Neurosci Res* 73:876-885.
- Jellinger K (1987) Neuropathological substrates of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 24:109-129.
- Jenner P, Rupniak NM, Rose S, Kelly E, Kilpatrick G, Lees A, Marsden CD (1984) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett* 50:85-90.
- Johnston RE, Dillon-Carter O, Freed WJ, Borlongan CV (2001) Trophic factor secreting kidney cell lines: in vitro characterization and functional effects following transplantation in ischemic rats. *Brain Res* 900:268-276.
- Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM (1997) Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 17:314-317.
- Kafri T, van Praag H, Ouyang L, Gage FH, Verma IM (1999) A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* 73:576-584.

- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van Der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretschmar HA, Haass C (2000) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci* 20:6365-6373.
- Kang UJ, Lee WY, Chang JW (2001) Gene therapy for Parkinson's disease: determining the genes necessary for optimal dopamine replacement in rat models. *Hum Cell* 14:39-48.
- Kang Y, Stein CS, Heth JA, Sinn PL, Penisten AK, Staber PD, Ratliff KL, Shen H, Barker CK, Martins I, Sharkey CM, Sanders DA, McCray PB, Jr., Davidson BL (2002) In vivo gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins. *J Virol* 76:9378-9388.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391.
- Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* 8:148-154.
- Kaul M, Yu H, Ron Y, Dougherty JP (1998) Regulated lentiviral packaging cell line devoid of most viral cis-acting sequences. *Virology* 249:167-174.
- Kawamoto Y, Nakamura S, Matsuo A, Akiguchi I, Shibasaki H (2000) Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human central nervous system. *Neuroscience* 100:701-712.
- Kearns CM, Gash DM (1995) GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Res* 672:104-111.
- Kearns CM, Cass WA, Smoot K, Kryscio R, Gash DM (1997) GDNF protection against 6-OHDA: time dependence and requirement for protein synthesis. *J Neurosci* 17:7111-7118.
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A (2000a) Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *Eur J Neurosci* 12:3871-3882.
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A, Mandel RJ (2000b) Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci* 20:4686-4700.
- Kirik D, Georgievska B, Rosenblad C, Bjorklund A (2001) Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 13:1589-1599.
- Kirik D, Annett LE, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A (2003) Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2884-2889.
- Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A (2002) Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci* 22:2780-2791.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Klein RL, King MA, Hamby ME, Meyer EM (2002) Dopaminergic cell loss induced by human A30P alpha-synuclein gene transfer to the rat substantia nigra. *Hum Gene Ther* 13:605-612.
- Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5731-5736.
- Kojima H, Abiru Y, Sakajiri K, Watabe K, Ohishi N, Takamori M, Hatanaka H, Yagi K (1997) Adenovirus-mediated transduction with human glial cell line-derived neurotrophic factor gene prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopamine depletion in striatum of mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 238:569-573.
- Kordower JH, Freeman TB, Chen EY, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Snow B, Olanow CW (1998) Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord* 13:383-393.
- Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290:767-773.
- Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM, Jr., Milbrandt J (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384:467-470.

- Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ (2000) MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 11:211-213.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106-108.
- Kurlan R, Kim MH, Gash DM (1991) The time course and magnitude of spontaneous recovery of parkinsonism produced by intracarotid administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to monkeys. *Ann Neurol* 29:677-679.
- Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M, Ihara Y (1988) Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 75:345-353.
- Lamas CC, Martinez AJ, Baraff R, Bajwa J (1980) Rabies encephaloradiculomyelitis. Case report. *Acta Neuropathol (Berl)* 51:245-247.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339:1130-1143.
- Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M (2006) Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 59:459-466.
- Langston JW, Langston EB, Irwin I (1984a) MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl* 100:49-54.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-980.
- Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I (1984b) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res* 292:390-394.
- Lapchak PA, Miller PJ, Jiao S (1997a) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces the dopaminergic and cholinergic phenotype and increases locomotor activity in aged Fischer 344 rats. *Neuroscience* 77:745-752.
- Lapchak PA, Jiao S, Collins F, Miller PJ (1997b) Glial cell line-derived neurotrophic factor: distribution and pharmacology in the rat following a bolus intraventricular injection. *Brain Res* 747:92-102.
- Laurikainen A, Hiltunen JO, Thomas-Crusells J, Vanhatalo S, Arumae U, Airaksinen MS, Klinge E, Saarma M (2000) Neurturin is a neurotrophic factor for penile parasympathetic neurons in adult rat. *J Neurobiol* 43:198-205.
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J (1993) An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259:988-990.
- Le Gall S, Prevost MC, Heard JM, Schwartz O (1997) Human immunodeficiency virus type I Nef independently affects virion incorporation of major histocompatibility complex class I molecules and virus infectivity. *Virology* 229:295-301.
- Lee CS, Sauer H, Bjorklund A (1996) Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience* 72:641-653.
- Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB (2001) Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* 15:916-926.
- Leitner ML, Molliver DC, Osborne PA, Vejsada R, Golden JP, Lampe PA, Kato AC, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (1999) Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRalpha coreceptor-specific. *J Neurosci* 19:9322-9331.
- Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Tignor GH (1983) The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus. *Yale J Biol Med* 56:315-322.
- Leroy E, Anastasopoulos D, Konitsiotis S, Lavedan C, Polymeropoulos MH (1998) Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum Genet* 103:424-427.
- Li W, Lesuisse C, Xu Y, Troncoso JC, Price DL, Lee MK (2004) Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation. *J Neurosci* 24:7400-7409.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130-1132.
- Lindner MD, Winn SR, Baetge EE, Hammang JP, Gentile FT, Doherty E, McDermott PE, Frydel B, Ullman MD, Schallert T, et al. (1995) Implantation of encapsulated catecholamine and GDNF-

- producing cells in rats with unilateral dopamine depletions and parkinsonian symptoms. *Exp Neurol* 132:62-76.
- Lindvall O, Bjorklund A (2004) Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1:382-393.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247:574-577.
- Lindvall O, Widner H, Rehnström S, Brundin P, Odin P, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, et al. (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol* 31:155-165.
- Lindvall O, Sawle G, Widner H, Rothwell JC, Bjorklund A, Brooks D, Brundin P, Frackowiak R, Marsden CD, Odin P, et al. (1994) Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35:172-180.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48:1583-1588.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT, Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111:209-218.
- Lo Bianco C, Deglon N, Pralong W, Aebischer P (2004) Lentiviral nigral delivery of GDNF does not prevent neurodegeneration in a genetic rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 17:283-289.
- Lotery AJ, Derksen TA, Russell SR, Mullins RF, Sauter S, Affatigato LM, Stone EM, Davidson BL (2002) Gene transfer to the nonhuman primate retina with recombinant feline immunodeficiency virus vectors. *Hum Gene Ther* 13:689-696.
- Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3:932-942.
- Love S, Plaha P, Patel NK, Hotton GR, Brooks DJ, Gill SS (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat Med* 11:703-704.
- Lowenstein PR, Castro MG (2002) Progress and challenges in viral vector-mediated gene transfer to the brain. *Curr Opin Mol Ther* 4:359-371.
- Lu X, Hagg T (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor prevents death, but not reductions in tyrosine hydroxylase, of injured nigrostriatal neurons in adult rats. *J Comp Neurol* 388:484-494.
- Lucking CB, Abbas N, Durr A, Bonifati V, Bonnet AM, de Broucker T, De Michele G, Wood NW, Agid Y, Brice A (1998) Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *Lancet* 352:1355-1356.
- Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 342:1560-1567.
- Luo J, Kaplitt MG, Fitzsimons HL, Zuzga DS, Liu Y, Oshinsky ML, During MJ (2002) Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* 298:425-429.
- Lyles DS, McKenzie M, Parce JW (1992) Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *J Virol* 66:349-358.
- MacInnis BL, Campenot RB (2002) Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor. *Science* 295:1536-1539.
- Mandel RJ, Snyder RO, Leff SE (1999) Recombinant adeno-associated viral vector-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer protects nigral dopamine neurons after onset of progressive degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 160:205-214.
- Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE (1997) Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14083-14088.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277:1641-1644.
- Martin D, Miller G, Rosendahl M, Russell DA (1995) Potent inhibitory effects of glial derived neurotrophic factor against kainic acid mediated seizures in the rat. *Brain Res* 683:172-178.

- Martin D, Miller G, Fischer N, Diz D, Cullen T, Russell D (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor: the lateral cerebral ventricle as a site of administration for stimulation of the substantia nigra dopamine system in rats. *Eur J Neurosci* 8:1249-1255.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Mallory M, Hashimoto M, Mucke L (2001) beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12245-12250.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287:1265-1269.
- 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 alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* 46:857-868.
- Mastakov MY, Baer K, Symes CW, Leichtlein CB, Kotin RM, During MJ (2002) Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain. *J Virol* 76:8446-8454.
- Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ (2004) Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R127-133.
- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, Sanpei K, Koike R, Mori H, Kondo T, Mizutani Y, Schaffer AA, Yamamura Y, Nakamura S, Kuzuhara S, Tsuji S, Mizuno Y (1997) Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 60:588-596.
- Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S, Di Monte DA (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis* 8:535-539.
- Mazarakis ND, Azzouz M, Rohll JB, Ellard FM, Wilkes FJ, Olsen AL, Carter EE, Barber RD, Baban DF, Kingsman SM, Kingsman AJ, O'Malley K, Mitrophanous KA (2001) Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum Mol Genet* 10:2109-2121.
- McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 10:119-127.
- McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56:149-162.
- Meissner W, Hill MP, Tison F, Gross CE, Bezdard E (2004) Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. *Trends Pharmacol Sci* 25:249-253.
- Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287:1489-1493.
- Menza M (2000) The personality associated with Parkinson's disease. *Curr Psychiatry Rep* 2:421-426.
- Miao CH, Snyder RO, Schowalter DB, Patijn GA, Donahue B, Winther B, Kay MA (1998) The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet* 19:13-15.
- Michell AW, Lewis SJ, Foltynie T, Barker RA (2004) Biomarkers and Parkinson's disease. *Brain* 127:1693-1705.
- Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A, Johnson EM, Jr., et al. (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20:245-253.
- Miller AD (1992) Human gene therapy comes of age. *Nature* 357:455-460.
- Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV (1991) Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65:2220-2224.
- Mitani K, Graham FL, Caskey CT, Kochanek S (1995) Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3854-3858.
- Mitrophanous K, Yoon S, Rohll J, Patil D, Wilkes F, Kim V, Kingsman S, Kingsman A, Mazarakis N (1999) Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther* 6:1808-1818.

- Mitsumoto A, Nakagawa Y (2001) DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res* 35:885-893.
- Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72:8150-8157.
- Miyoshi Y, Zhang Z, Ovadia A, Lapchak PA, Collins F, Hilt D, Lebel C, Kryscio R, Gash DM (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor-levodopa interactions and reduction of side effects in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol* 42:208-214.
- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J (1998) High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol* 72:8873-8883.
- Monville C, Torres E, Thomas E, Scarpini CG, Muhith J, Lewis J, Finn J, Smith C, Cai S, Efstathiou S, Howard K, Dunnett SB (2004) HSV vector-delivery of GDNF in a rat model of PD: partial efficacy obscured by vector toxicity. *Brain Res* 1024:1-15.
- Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL (2005) Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 14:71-84.
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382:76-79.
- Morelli AE, Larregina AT, Smith-Arica J, Dewey RA, Southgate TD, Ambar B, Fontana A, Castro MG, Lowenstein PR (1999) Neuronal and glial cell type-specific promoters within adenovirus recombinants restrict the expression of the apoptosis-inducing molecule Fas ligand to predetermined brain cell types, and abolish peripheral liver toxicity. *J Gen Virol* 80 (Pt 3):571-583.
- Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ (1996) An [¹⁸F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* 119 (Pt 2):585-591.
- Mount HT, Dean DO, Alberch J, Dreyfus CF, Black IB (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9092-9096.
- Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* 260:926-932.
- Munnes M, Fanaei S, Schmitz B, Muiznieks I, Holschneider AM, Doerfler W (2000) Familial form of hirschsprung disease: nucleotide sequence studies reveal point mutations in the RET proto-oncogene in two of six families but not in other candidate genes. *Am J Med Genet* 94:19-27.
- Muzyczka N (1992) Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158:97-129.
- Nakajima T, Nakamaru K, Ido E, Terao K, Hayami M, Hasegawa M (2000) Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther* 11:1863-1874.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996a) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11382-11388.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996b) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Neet KE, Campenot RB (2001) Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors. *Cell Mol Life Sci* 58:1021-1035.
- Nightingale SJ, Hollis RP, Pepper KA, Petersen D, Yu XJ, Yang C, Bahner I, Kohn DB (2006) Transient gene expression by nonintegrating lentiviral vectors. *Mol Ther* 13:1121-1132.
- Nissenbaum H, Quinn NP, Brown RG, Toone B, Gotham AM, Marsden CD (1987) Mood swings associated with the 'on-off' phenomenon in Parkinson's disease. *Psychol Med* 17:899-904.
- Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, Jr., Lozano AM, Penn RD, Simpson RK, Jr., Stacy M, Wooten GF (2003) Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60:69-73.
- O'Malley EK, Sieber BA, Black IB, Dreyfus CF (1992) Mesencephalic type I astrocytes mediate the survival of substantia nigra dopaminergic neurons in culture. *Brain Res* 582:65-70.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Lanciego JL, Rodriguez Diaz M (2004) How does Parkinson's disease begin? The role of compensatory mechanisms. *Trends Neurosci* 27:125-127; author reply 127-128.

- Oiwa Y, Eberling JL, Nagy D, Pivrotto P, Emborg ME, Bankiewicz KS (2003) Overlesioned hemiparkinsonian non human primate model: correlation between clinical, neurochemical and histochemical changes. *Front Biosci* 8:a155-166.
- Olanow CW, Obeso JA (2000) Pulsatile stimulation of dopamine receptors and levodopa-induced motor complications in Parkinson's disease: implications for the early use of COMT inhibitors. *Neurology* 55:S72-77; discussion S78-81.
- Olanow CW, Kordower JH, Freeman TB (1996) Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 19:102-109.
- Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevette DM, Wang S (1995) Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373:344-346.
- Orr WB, Gardiner TW, Stricker EM, Zigmond MJ, Berger TW (1986) Short-term effects of dopamine-depleting brain lesions on spontaneous activity of striatal neurons: relation to local dopamine concentration and behavior. *Brain Res* 376:20-28.
- Page KA, Landau NR, Littman DR (1990) Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J Virol* 64:5270-5276.
- Palfi S, Leventhal L, Chu Y, Ma SY, Emborg M, Bakay R, Deglon N, Hantraye P, Aebischer P, Kordower JH (2002) Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci* 22:4942-4954.
- Pals P, Lincoln S, Manning J, Heckman M, Skipper L, Hulihan M, Van den Broeck M, De Pooter T, Cras P, Crook J, Van Broeckhoven C, Farrer MJ (2004) alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56:591-595.
- Papa SM, Chase TN (1996) Levodopa-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in Parkinsonian monkeys. *Ann Neurol* 39:574-578.
- Papadimitriou A, Veletza V, Hadjigeorgiou GM, Patrikiou A, Hirano M, Anastasopoulos I (1999) Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology* 52:651-654.
- Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF (2003) The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113:867-879.
- Paratcha G, Ledda F, Baars L, Couplier M, Besset V, Anders J, Scott R, Ibanez CF (2001) Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* 29:171-184.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128-154.
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20:91-127.
- Parker WD, Jr., Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26:719-723.
- Parveen Z, Mukhtar M, Rafi M, Wenger DA, Siddiqui KM, Siler CA, Dietzschold B, Pomerantz RJ, Schnell MJ, Dornburg R (2003) Cell-type-specific gene delivery into neuronal cells in vitro and in vivo. *Virology* 314:74-83.
- Patel N, Gill, SS. (2004) Intraparenchymal delivery of GDNF towards a treatment for Parkinson's disease. *gene ther and mol biol* 8:259-290.
- Patel NK, Bunnage M, Plaha P, Svendsen CN, Heywood P, Gill SS (2005) Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol* 57:298-302.
- Paul G (2006) Cell transplantation for patients with Parkinson's disease. *Handb Exp Pharmacol*:361-388.
- Pearce RK, Costa S, Jenner P, Marsden CD (1999) Chronic supranigral infusion of BDNF in normal and MPTP-treated common marmosets. *J Neural Transm* 106:663-683.
- Peck P (2005) Angem decision to halt GDNF clinical trials and withdraw the drug triggers protest from researchers and patients. *neuro today: Am acad Neurol* 5.
- Perez-Navarro E, Arenas E, Marco S, Alberch J (1999) Intrastratial grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* 11:241-249.
- Perez-Otano I, Oset C, Luquin MR, Herrero MT, Obeso JA, Del Rio J (1994) MPTP-induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. *Neurosci Lett* 175:121-125.

- Peschanski M, Defer G, N'Guyen JP, Ricolfi F, Monfort JC, Remy P, Geny C, Samson Y, Hantraye P, Jeny R, et al. (1994) Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain* 117 (Pt 3):487-499.
- Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau YS (2001) Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience* 106:589-601.
- Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2:1137-1140.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H (1996a) GDNF is required for kidney development and enteric innervation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:445-457.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H (1996b) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382:73-76.
- Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401-404.
- Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ (1998) Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* 4:354-357.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Popsueva A, Poteryaev D, Arighi E, Meng X, Angers-Loustau A, Kaplan D, Saarma M, Sariola H (2003) GDNF promotes tubulogenesis of GFR α 1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. *J Cell Biol* 161:119-129.
- Poteryaev D, Titievsky A, Sun YF, Thomas-Crusells J, Lindahl M, Billaud M, Arumae U, Saarma M (1999) GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor α 1. *FEBS Lett* 463:63-66.
- Pothos EN, Davila V, Sulzer D (1998) Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size. *J Neurosci* 18:4106-4118.
- Poznansky M, Lever A, Bergeron L, Haseltine W, Sodroski J (1991) Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* 65:532-536.
- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67:631-647.
- Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG (2000) Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2:458-469.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80:148-158.
- Ravina BM, Fagan SC, Hart RG, Hovinga CA, Murphy DD, Dawson TM, Marler JR (2003) Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. *Neurology* 60:1234-1240.
- Ray NB, Power C, Lynch WP, Ewalt LC, Lodmell DL (1997) Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. *Arch Virol* 142:1011-1019.
- Reiser J (2000) Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther* 7:910-913.
- Richardson PJ, Kase H, Jenner PG (1997) Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 18:338-344.
- Rideout HJ, Dietrich P, Wang Q, Dauer WT, Stefanis L (2004) alpha-synuclein is required for the fibrillar nature of ubiquitinated inclusions induced by proteasomal inhibition in primary neurons. *J Biol Chem* 279:46915-46920.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.
- Ridet JL, Bensadoun JC, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD (2006) Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21:29-34.

- Riederer P, Wuketich S (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38:277-301.
- Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Bjorklund A (1998) Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 82:129-137.
- Rosenblad C, Georgievska B, Kirik D (2003) Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *Eur J Neurosci* 17:260-270.
- Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Bjorklund A (1999) Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci* 11:1554-1566.
- Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl:S10-17.
- Sabol KE, Neill DB, Wages SA, Church WH, Justice JB (1985) Dopamine depletion in a striatal subregion disrupts performance of a skilled motor task in the rat. *Brain Res* 335:33-43.
- Sajadi A, Bauer M, Thony B, Aebischer P (2005) Long-term glial cell line-derived neurotrophic factor overexpression in the intact nigrostriatal system in rats leads to a decrease of dopamine and increase of tetrahydrobiopterin production. *J Neurochem* 93:1482-1486.
- Sajadi A, Bensadoun JC, Schneider BL, Lo Bianco C, Aebischer P (2006) Transient striatal delivery of GDNF via encapsulated cells leads to sustained behavioral improvement in a bilateral model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 22:119-129.
- Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D (2000) Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2:404-414.
- Salvatore MF, Zhang JL, Large DM, Wilson PE, Gash CR, Thomas TC, Haycock JW, Bing G, Stanford JA, Gash DM, Gerhardt GA (2004) Striatal GDNF administration increases tyrosine hydroxylase phosphorylation in the rat striatum and substantia nigra. *J Neurochem* 90:245-254.
- Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382:70-73.
- Sariola H, Saarma M (2003) Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116:3855-3862.
- Sarkis C, Serguera C, Petres S, Buchet D, Ridet JL, Edelman L, Mallet J (2000) Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14638-14643.
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401-415.
- Sauer H, Rosenblad C, Bjorklund A (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8935-8939.
- Sawle GV, Bloomfield PM, Bjorklund A, Brooks DJ, Brundin P, Leenders KL, Lindvall O, Marsden CD, Rehncrona S, Widner H, et al. (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET [18F]6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol* 31:166-173.
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y (1983) Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res* 275:321-328.
- Schaar DG, Sieber BA, Dreyfus CF, Black IB (1993) Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Exp Neurol* 124:368-371.
- Schaar DG, Sieber BA, Sherwood AC, Dean D, Mendoza G, Ramakrishnan L, Dreyfus CF, Black IB (1994) Multiple astrocyte transcripts encode nigral trophic factors in rat and human. *Exp Neurol* 130:387-393.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823-827.
- Schindelhauer D, Schuffenhauer S, Gasser T, Steinkasserer A, Meitinger T (1995) The gene coding for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5p12-p13.1. *Genomics* 28:605-607.
- Schlegel R, Willingham MC, Pastan IH (1982) Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *J Virol* 43:871-875.

- Schneider LG (1969) [The rabies pathogenesis in mice. II. Spread of virus in the CNS]. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* 212:1-13.
- Seniuk NA, Tatton WG, Greenwood CE (1990) Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res* 527:7-20.
- Serguera C, Sarkis C, Ridet JL, Colin P, Moullier P, Mallet J (2001) Primary adult human astrocytes as an ex vivo vehicle for beta-glucuronidase delivery in the brain. *Mol Ther* 3:875-881.
- Sherer TB, Fiske BK, Svendsen CN, Lang AE, Langston JW (2006) Crossroads in GDNF therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord* 21:136-141.
- Sherman TG, Moody CA (1995) Alterations in tyrosine hydroxylase expression following partial lesions of the nigrostriatal bundle. *Brain Res Mol Brain Res* 29:285-296.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y (1999) Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol* 45:668-672.
- Shults CW (2006) Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1661-1668.
- Shults CW, Kimber T, Altar CA (1995) BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport* 6:1109-1112.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36:348-355.
- Sidhu A, Wersinger C, Vernier P (2004a) alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett* 565:1-5.
- Sidhu A, Wersinger C, Vernier P (2004b) Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *Faseb J* 18:637-647.
- Sidhu A, Wersinger C, Moussa CE, Vernier P (2004c) The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1035:250-270.
- Singer TP, Castagnoli N, Jr., Ramsay RR, Trevor AJ (1987) Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem* 49:1-8.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841.
- Sivam SP, Strunk C, Smith DR, Hong JS (1986) Proenkephalin-A gene regulation in the rat striatum: influence of lithium and haloperidol. *Mol Pharmacol* 30:186-191.
- Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, Gash DM, Kryscio R, Young B (2005) Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* 102:216-222.
- Smith RD, Zhang Z, Kurlan R, McDermott M, Gash DM (1993) Developing a stable bilateral model of parkinsonism in rhesus monkeys. *Neuroscience* 52:7-16.
- Snyder GL, Zigmond MJ (1990) The effects of L-dopa on in vitro dopamine release from striatum. *Brain Res* 508:181-187.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840.
- Steffens S, Tebbets J, Kramm CM, Lindemann D, Flake A, Sena-Esteves M (2004) Transduction of human glial and neuronal tumor cells with different lentivirus vector pseudotypes. *J Neurooncol* 70:281-288.
- Stocchi F, Olanow CW (2003) Neuroprotection in Parkinson's disease: clinical trials. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S87-97; discussion S97-89.
- Su M, Hu H, Lee Y, d'Azzo A, Messing A, Brenner M (2004) Expression specificity of GFAP transgenes. *Neurochem Res* 29:2075-2093.
- Sugamata M, Miyazawa M, Mori S, Spangrude GJ, Ewalt LC, Lodmell DL (1992) Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. *J Virol* 66:1252-1260.
- Sullivan AM, Opacka-Juffry J, Blunt SB (1998) Long-term protection of the rat nigrostriatal dopaminergic system by glial cell line-derived neurotrophic factor against 6-hydroxydopamine in vivo. *Eur J Neurosci* 10:57-63.
- Suter-Crazzolara C, Unsicker K (1994) GDNF is expressed in two forms in many tissues outside the CNS. *Neuroreport* 5:2486-2488.
- Suvanto P, Hiltunen JO, Arumae U, Moshnyakov M, Sariola H, Sainio K, Saarma M (1996) Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in embryonic rat by in situ hybridization. *Eur J Neurosci* 8:816-822.

- Suzuki H, Hase A, Miyata Y, Arahata K, Akazawa C (1998) Prominent expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in human skeletal muscle. *J Comp Neurol* 402:303-312.
- Svendsen CN, Clarke DJ, Rosser AE, Dunnett SB (1996) Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* 137:376-388.
- Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D, Aebischer P (2006) A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* 3:109-116.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K, Ariga H (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5:213-218.
- Takahashi M (1988) Structure and expression of the ret transforming gene. *IARC Sci Publ*:189-197.
- Takahashi M, Cooper GM (1987) ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 7:1378-1385.
- Takahashi M, Ritz J, Cooper GM (1985) Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 42:581-588.
- Takahashi M, Kanuka H, Fujiwara H, Koyama A, Hasegawa M, Miura M, Iwatsubo T (2003) Phosphorylation of alpha-synuclein characteristic of synucleinopathy lesions is recapitulated in alpha-synuclein transgenic *Drosophila*. *Neurosci Lett* 336:155-158.
- Tal J (2000) Adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *J Biomed Sci* 7:279-291.
- Tanner CM, Langston JW (1990) Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 40:suppl 17-30; discussion 30-11.
- Thomas CE, Birkett D, Anozie I, Castro MG, Lowenstein PR (2001) Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther* 3:36-46.
- Thoulouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M (1998) The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* 72:7181-7190.
- Tissingh G, Berendse HW, Bergmans P, DeWaard R, Drukarch B, Stoof JC, Wolters EC (2001) Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Mov Disord* 16:41-46.
- Tomac A, Widenfalk J, Lin LF, Kohno T, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L (1995) Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8274-8278.
- Tranzer JP, Thoenen H (1967) [Electron microscopy studies on the peripheral sympathetic nervous system of the cat; physiological and pharmacological aspects]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 257:73-75.
- Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382:80-83.
- Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibanez CF (1999) Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem* 274:20885-20894.
- Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF (1995) Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* 130:137-148.
- Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkeny C, Salazar-Gruoso E, Pachnis V, Arumae U (1996) Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381:785-789.
- Tseng JL, Baetge EE, Zurn AD, Aebischer P (1997) GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. *J Neurosci* 17:325-333.
- Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A (1998) Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo J* 17:7250-7259.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493.
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001) Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 500:105-108.
- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR (2004a) PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:336-341.

- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004b) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160.
- Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P (1994) Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63:47-56.
- Varnavski AN, Zhang Y, Schnell M, Tazelaar J, Louboutin JP, Yu QC, Bagg A, Gao GP, Wilson JM (2002) Preexisting immunity to adenovirus in rhesus monkeys fails to prevent vector-induced toxicity. *J Virol* 76:5711-5719.
- Vogel R, Amar L, Thi AD, Saillour P, Mallet J (2004) A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum Gene Ther* 15:157-165.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Voorn P, Roest G, Groenewegen HJ (1987) Increase of enkephalin and decrease of substance P immunoreactivity in the dorsal and ventral striatum of the rat after midbrain 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 412:391-396.
- Wang CY, Wang S (2006) Astrocytic expression of transgene in the rat brain mediated by baculovirus vectors containing an astrocyte-specific promoter. *Gene Ther*.
- Wang J, Chen G, Lu B, Wu CP (2003) GDNF acutely potentiates Ca²⁺ channels and excitatory synaptic transmission in midbrain dopaminergic neurons. *Neurosignals* 12:78-88.
- Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, Ozawa K (2002) Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 9:381-389.
- Wang Z, Kai L, Day M, Ronesi J, Yin HH, Ding J, Tkatch T, Lovinger DM, Surmeier DJ (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50:443-452.
- Watson DJ, Kobinger GP, Passini MA, Wilson JM, Wolfe JH (2002) Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. *Mol Ther* 5:528-537.
- Watson HD, Tignor GH, Smith AL (1981) Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. *J Gen Virol* 56:372-382.
- Wenning GK, Odin P, Morrish P, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Brown R, Gustavii B, Hagell P, Jahanshahi M, Sawle G, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O (1997) Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 42:95-107.
- Wilkinson KD, Laleli-Sahin E, Urbauer J, Larsen CN, Shih GH, Haas AL, Walsh ST, Wand AJ (1999) The binding site for UCH-L3 on ubiquitin: mutagenesis and NMR studies on the complex between ubiquitin and UCH-L3. *J Mol Biol* 291:1067-1077.
- Winkler C, Sauer H, Lee CS, Bjorklund A (1996) Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 16:7206-7215.
- Wood MJ, Charlton HM, Wood KJ, Kajiwara K, Byrnes AP (1996) Immune responses to adenovirus vectors in the nervous system. *Trends Neurosci* 19:497-501.
- Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA (2002) Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* 8:600-606.
- Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM, Kafri T (2001) Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:97-104.
- Yanez-Munoz RJ, Balagga KS, MacNeil A, Howe SJ, Schmidt M, Smith AJ, Buch P, MacLaren RE, Anderson PN, Barker SE, Duran Y, Bartholomae C, von Kalle C, Heckenlively JR, Kinnon C, Ali RR, Thrasher AJ (2006) Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* 12:348-353.
- Yang F, Feng L, Zheng F, Johnson SW, Du J, Shen L, Wu CP, Lu B (2001) GDNF acutely modulates excitability and A-type K(+) channels in midbrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci* 4:1071-1078.
- Yang Y, Nishimura I, Imai Y, Takahashi R, Lu B (2003) Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37:911-924.

- Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H (2003) Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1342-1348.
- Yu T, Scully S, Yu Y, Fox GM, Jing S, Zhou R (1998) Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci* 18:4684-4696.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164-173.
- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173-185.
- Zennou V, Serguera C, Sarkis C, Colin P, Perret E, Mallet J, Charneau P (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19:446-450.
- Zetterstrom T, Sharp T, Marsden CA, Ungerstedt U (1983) In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. *J Neurochem* 41:1769-1773.
- Zhang Z, Miyoshi Y, Lapchak PA, Collins F, Hilt D, Lebel C, Kryscio R, Gash DM (1997) Dose response to intraventricular glial cell line-derived neurotrophic factor administration in parkinsonian monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1396-1401.
- Zigmond MJ (1997) Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. *Neurobiol Dis* 4:247-253.
- Zigmond MJ, Stricker EM (1980) Supersensitivity after intraventricular 6-hydroxydopamine: relation to dopamine depletion. *Experientia* 36:436-438.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Stricker EM (1990a) Partial damage to nigrostriatal bundle: compensatory changes and the action of L-dopa. *J Neural Transm Suppl* 29:217-232.
- Zigmond MJ, Acheson AL, Stachowiak MK, Stricker EM (1984) Neurochemical compensation after nigrostriatal bundle injury in an animal model of preclinical parkinsonism. *Arch Neurol* 41:856-861.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM (1990b) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci* 13:290-296.
- Zou L, Zhou H, Pastore L, Yang K (2000) Prolonged transgene expression mediated by a helper-dependent adenoviral vector (hdAd) in the central nervous system. *Mol Ther* 2:105-113.
- Zou L, Yuan X, Zhou H, Lu H, Yang K (2001) Helper-dependent adenoviral vector-mediated gene transfer in aged rat brain. *Hum Gene Ther* 12:181-191.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871-875.
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880.

