HAL
open science

Développement d'un vecteur lentiviral ciblant les astrocytes et mise en application dans l'étude des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1

Angélique Colin

To cite this version:

Angélique Colin. Développement d'un vecteur lentiviral ciblant les astrocytes et mise en application dans l'étude des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : . tel-00348988

HAL Id: tel-00348988

https://theses.hal.science/tel-00348988v1

Submitted on 22 Dec 2008

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.

UNIVERSITE PARIS VI- PIERRE ET MARIE CURIE
ECOLE DOCTORALE CERVEAU COGNITION ET COMPORTEMENT

THESE DE DOCTORAT

en Neurosciences

Soutenue le 17 décembre 2008 par

Angélique COLIN

Développement d'un vecteur lentiviral ciblant les astrocytes in vivo et mise en application dans l'étude des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1

Composition du jury :

Président	Pr. MARIANI Jean	CNRS/UPMC, Paris
Rapporteur	Pr. PELLERIN Luc	Institut de Physiologie, Lausanne
Rapporteur	Dr. PFRIEGER Frank	CNRS/ Max Planck, Strasbourg
Examinateur	Dr. GIAUME Christian	INSERM, Paris
Directeur de thèse	Dr. BONVENTO Gilles	CEA/CNRS, Orsay
Co-encadrante	Dr. DEGLON Nicole	CEA/CNRS, Orsay

Il n'y a personne qui soit né sous une mauvaise étoile,
il n'y a que des gens qui ne savent pas lire le ciel.

Dalaï Lama

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Gilles qui m'a donné la chance d'intégrer ce laboratoire et d'y faire ma thèse dans des conditions idéales. Je voudrais le remercier de m'avoir laissé une grande liberté dans le choix des directions à prendre pour cette thèse, qui finalement est assez éloignée de celle initialement prévue. Merci pour ses encouragements et son soutien dans les périodes difficiles et merci pour son aide et ses conseils qui m'ont fait avancer.

Un grand merci à Nicole qui m'a accueilli dans son équipe et qui m'a permis d'y « squatter » pendant *un peu plus* de temps que prévu. Merci de m'avoir appris et donner goût à la biologie moléculaire. Je voudrais également la remercier pour le temps qu'elle m'a consacré, son dynamisme et son entrain. Sans elle, je n'aurais pas pu faire ce travail.

Mes plus chaleureux remerciements à toute l'équipe de Saclay. Merci à Raymonde, Gwenn et Noëlle qui m'ont accueilli au tout début. Merci pour leur aide, leur sympathie et leur soutien. Merci également à Mathilde pour ces heures de cultures cellulaires, sa gentillesse et son entrain. Toutes ces heures de manips isolées ont été amusantes grâce à toi. Merci à Valérie, Kevin, Aurélie, Karine, Sandro. Merci à vous toutes d'avoir créé un laboratoire aussi sympathique et efficace, j'ai adoré y travailler.

Je voudrais également remercier l'équipe d'Orsay. Merci à Fanny, Carole, Latifa, Laurie, Audrey, Martine, Claire et les autres… Un grand merci à Emmanuel pour son temps, son aide et ses conseils avisés quand Explora Nova menaçait d'avoir raison de moi !!

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit et de participer à ma soutenance de thèse, et tout particulièrement mes rapporteurs Luc Pellerin et Frank Pfrieger.

Enfin, un grand merci à Julien pour m'avoir soutenue et pour avoir encaissé ma mauvaise humeur dans les périodes difficiles. Et merci pour ses corrections orthographiques dont j'avais vraiment besoin !!! Merci également à mes parents qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici et sans qui cette thèse n'existerait pas !

I. Introduction générale…….…… 2

II. L'importance des astrocytes dans le système nerveux central…… ……. 3

A. Organisation et morphologie…….3

B. Les astrocytes et le glutamate……..... 5

1. Le glutamate et l'excitotoxicité…….. 6

2. Les transporteurs au glutamate……..... 7

a. Structure et localisation…….. 7

b. Rôle des transporteurs…… 9

c. Régulation de la recapture…… 10

C. Implication des transporteurs au glutamate dans les interactions neurones-astrocytes……..…….…. 14

1. Homéostasie du glutamate……... 14

2. Le couplage neurométabolique…… 15

3. Couplage neurovasculaire…… 18

D. Implication des astrocytes et des transporteurs au glutamate dans les maladies neurodégénératives……... 19

1. La sclérose latérale amyotrophique (SLA)……... 22

2. La maladie de Huntington……... 23

3. Les transporteurs au glutamate comme cibles thérapeutiques……. 25

III. Utilisation du transfert de gène dans l'étude des astrocytes …….…….....27

A. Le transfert de gène……... 27

1. Principe du transfert de gène……... 27

2. Les outils de transfert de gènes dans le système nerveux central…… 28

a. Les vecteurs non viraux…….….. 28

b. Les vecteurs viraux…….……. 29

- Les vecteurs dérivés de l'Herpès virus……...30

- Les vecteurs dérivés des adénovirus……...30

- Les vecteurs dérivés des virus adéno-associés……..…..31

- Les vecteurs dérivés des lentivirus……..……32

B. Les vecteurs lentiviraux……...33

1. Les séquences nécessaires à l'obtention d'un vecteur lentiviral……...34

2. La production virale…….… 36

3. Transduction de la cellule cible par le vecteur lentiviral……..39

C. L'étude des astrocytes *in vivo* grâce aux vecteurs lentiviraux……....40
1. Pseudotypage ……....41
2. Changement de promoteur……43
3. Régulation post-transcriptionnelle : Les microARN (miR)……..46
a. Découverte et importance des microARN……47
b. Synthèse des microARN et mode d'action……...48
c. Mécanisme de dégradation de l'ARNm……....49
d. Mécanismes d'inhibition de la traduction……49
e. Expression des miR dans le système nerveux central……...…51
f. Utilisation des miR pour le ciblage cellulaire……..... 52
4. Utilisation des petits ARN interférents……52
IV. Matériels et méthodes……...54
A. Clonage des vecteurs de transfert……... 55
1. Clonage des promoteurs……...55
2. Clonage des plasmides contenant la cible du miR124……56
3. Clonage des plasmides GLAST et GLT-1……57
4. Clonage des siGLAST et siGLT-1……58
B. Production des lentivirus……58
C. Injections stéréotaxiques……60
1. Comparaison de l'infection des enveloppes VSV, Mokola et Rabbies……60
2. Choix de la dose de Mokola ……60
3. Comparaison des promoteurs ……...61
4. Efficacité de la cible du miR124 *in vivo* ……..61
5. Ciblage astrocytaire dans le striatum ……...61
6. Ciblage astrocytaire dans le cervelet et l'hippocampe……..61
7. Effet de la surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1……61
8. Effet de l'inhibition des transporteurs GLAST et GLT-1……..…62
D. Quantification des ARN par RT- PCR en temps réel……..…62
1. Extraction des ARNm……...62
2. Reverse transcription ……...62
3. PCR en temps réel……62
4. Quantification du miR124……63
E. Transfection transitoire au chlorure de calcium des cellules 293T……63

F. Mesure de l'uptake d'aspartate tritié…….…..64
G. Immunoblots …….….64
1. Préparation des homogénats de cerveaux…….…64
2. Electrophorèse, transfert et immunoblot…….…..65
H. Cultures primaires ……...65
1. Cocultures primaires de striatum……...65
2. Cultures de neurones purs…….….66
3. Cultures d'astrocytes purs……..…66
I. Analyse en cytométrie de flux……..66
J. Immunohistologie…….67
1. Obtention des coupes…….67
2. Protocole d'immunohistochimie ……...67
3. Protocole d'immunofluorescence……..68
4. Immunofluorescence sur cultures……..69
K. Analyse des immunomarquages……..69
L. Mesure autoradiographique de la consommation cérébrale de 2-deoxy-D-[14C]glucose (2DG)……..…70
M. Analyses statistiques……...…71

Résultats et discussion

V. Développement d'un vecteur lentiviral ciblant les astrocytes *in vivo*……73
A. Changement de pseudotype : VSV, Rabies et Mokola ……. 73
1. Résultats du pseudotypage……73
a. Effet du pseudotypage *in vitro*……..74
b. Effet du pseudotypage *in vivo*……...……75
- Effet du pseudotypage sur l'efficacité d'infection…….…….75
- Effet du pseudotypage sur le tropisme……. …… 78
Tropisme in vivo chez le rat……...78
Tropisme in vivo chez la souris ……79
Amélioration de l'efficacité d'infection des vecteurs pseudotypés avec Mokola……..... ..……...80
2. Discussion sur le pseudotypage…….....81

a. L'efficacité de transduction reflète la capacité d'entrée dans la cellule cible……81
b. Les facteurs influençant l'efficacité de transduction et le tropisme……..…81
- Avant toute comparaison……..…81
- La production virale influence la transduction……83
- Les récepteurs spécifiques aux glycoprotéines virales influencent le tropisme et la capacité de transduction d'un vecteur……84
- Les facteurs de restriction cellulaires influencent le tropisme des vecteurs……...85
B. Association avec différents promoteurs : PGK, CMV et EAAT1……..…87
1. Résultats : Changement de promoteur……..……87
a. Influence du promoteur *in vitro*……87
b. Influence du promoteur *in vivo*……..…89
-Effet du promoteur sur l'expression du transgène…….……..…89
-Effet du promoteur sur le tropisme…….……90
Tropisme in vivo chez le rat……..…90
Tropisme in vivo chez la souris.....91
2. Discussion sur les promoteurs…….….93
C. Incorporation d'une cible du miR124 pour restreindre l'expression du transgène dans les neurones……....96
1. Résultats concernant l'insertion de la cible du miR124……...97
a. Efficacité *in vitro* des différentes constructions……..….97
- Influence du nombre de copies et d'une adénosine dans l'efficacité de régulation du miR124T…….99
-Spécificité de régulation du miR124T…….99
b. Caractérisation du mécanisme d'action……...100
c. Efficacité du miR124T *in vivo*……103
2. Discussion sur le ciblage astrocytaire grâce au microARN……....103
a. Efficacité de répression et mécanismes de régulation……103
b. Les conséquences de l'insertion des cibles du miR124 dans la cellule…...…105
D. Nouvel outil de ciblage astrocytaire : combinaison Mokola et microARN……..107
1. Résultats concernant la combinaison Mokola et miR124T……..…107
a. Ciblage des astrocytes chez le rat……....107
b. Ciblage des astrocytes chez la souris…….….108

c. Absence de toxicité de notre vecteur ……..110
d. Ciblage astrocytaire dans l'hippocampe et le cervelet……..……..111
2. Discussion sur ce nouvel outil de ciblage astrocytaire *in vivo*……...…….112
a. Un outil particulièrement flexible et efficace …….113
b. Un outil à améliorer……..……..113
VI. Applications du vecteur à l'étude des astrocytes……...115
A. Visualisation de la morphologie des astrocytes *in vivo*……115
B. Surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1 et effets en condition excitotoxique……..115
1. Mise au point de vecteurs exprimant les transporteurs GLAST et GLT-1……..…116
2. Surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1 in vivo et effets en condition excitotoxique……...…117
C. Inhibition de l'expression des transporteurs GLAST et GLT-1 *in vivo* par ARN interférence……121
1. Validation de la fonctionnalité des siARN……..…121
2. Inhibition de l'expression des transporteurs *in vivo*……..…..122
3. Effet sur la consommation de glucose……....125
D. Discussion……....126
1. Morphologie des astrocytes……...…..126
2. Conséquences d'une inhibition des transporteurs au glutamate……..…127
3. Une surexpression des transporteurs modérée pour un effet neuroprotecteur important……..…129
4. La surexpression des transporteurs dans les maladies neurodégénératives……131
5. Perspectives d'études……..132
VII. Conclusion……..……134
Références bibliographiques……135
Annexes……..158
Article……159

Développement d'un vecteur lentiviral ciblant les astrocytes in vivo et mise en application dans l'étude des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1

Résumé

Les astrocytes sont des cellules gliales jouant un rôle primordial dans le fonctionnement cérébral. Ils remplissent de nombreuses fonctions allant de la régulation de l'homéostasie ionique, à la modulation de la transmission synaptique en passant par la régulation du métabolisme énergétique. Les transporteurs astrocytaires au glutamate GLAST et GLT-1 tiennent un rôle particulièrement important dans ces fonctions astrocytaires. La recapture du glutamate libéré dans la synapse module la neurotransmission et évite la stimulation excessive des récepteurs glutamatergiques qui peut induire des phénomènes d'excitotoxicité provoquant la mort des neurones. Le couplage neurométabolique entre astrocytes et neurones repose également sur l'activité de ces transporteurs. De nombreuses données indiquent que des déficits des transporteurs au glutamate sont impliqués dans la plupart des maladies neurodégénératives. Les astrocytes et les transporteurs au glutamate représentent ainsi de potentielles cibles thérapeutiques dans le cadre des maladies neurodégénératives. L'étude de ces interactions neurones-astrocytes, en particulier sur des modèles *in vivo*, nécessite des outils particuliers permettant de disséquer le rôle de chaque type cellulaire. Cependant, il existe peu d'outils spécifiques et efficaces pour cibler les astrocytes *in vivo*. Notre objectif a été de développer un nouveau vecteur viral permettant une transduction spécifique des astrocytes *in vivo*, avec une efficacité importante et pouvant être utilisé dans l'ensemble du cerveau avec de nombreux transgènes. Au cours de ce travail nous avons développé trois voies de recherche. Ainsi, nous avons modifié l'enveloppe du vecteur et tester trois glycoprotéines d'enveloppe, VSV, Mokola et Rabies. Nous avons également utilisé trois promoteurs différents, PGK, CMV et EAAT1 afin de moduler l'expression du transgène dans les astrocytes. Et enfin, nous avons développé une nouvelle méthode de régulation post-transcriptionnelle utilisant les microARN. Nos résultats permettent de conclure qu'un vecteur lentiviral avec l'enveloppe Mokola, contenant le promoteur PGK et des cibles de microARN spécifiques des neurones est un outil efficace pour cibler les astrocytes *in vivo*. Nous avons utilisé ce nouvel outil pour surexprimer les transporteurs astrocytaires au glutamate (GLAST et GLT-1) et pour inhiber leur expression grâce aux techniques de « RNA silencing ». La surexpression du transporteur GLAST permet une neuroprotection significative en condition excitotoxique tandis que l'inhibition de GLT-1 induit une diminution du métabolisme cérébral. Ces résultats préliminaires apportent la preuve de principe de l'efficacité de notre outil *in vivo* et confirment le rôle central des transporteurs astrocytaires. Il est ainsi possible d'anticiper que ce nouvel outil permettra à la fois une meilleure compréhension du fonctionnement des astrocytes *in vivo* et qu'il peut représenter un vecteur de choix dans la perspective d'une thérapie génique ciblant ces cellules.

Introduction

I. Introduction générale

Depuis la découverte des astrocytes et l'attribution de leur rôle de soutien, de « glue » pour les neurones, l'image de ces cellules dans le monde scientifique a beaucoup changé. A présent, elles sont reconnues comme des composants au rôle primordial dans le fonctionnement cérébral. Ainsi, les astrocytes remplissent de nombreuses fonctions allant de la régulation de l'homéostasie ionique, à la modulation de la transmission synaptique en passant par leur implication dans le couplage neurométabolique. Les transporteurs astrocytaires au glutamate GLAST et GLT-1 tiennent un rôle particulièrement important dans les fonctions astrocytaires. La recapture du glutamate libéré dans la synapse module la neurotransmission et évite la stimulation excessive de ses récepteurs qui peut induire des phénomènes d'excitotoxicité provoquant la mort des neurones. Des altérations des transporteurs au glutamate sont impliquées dans les maladies neurodégénératives. Le couplage neurométabolique entre astrocytes et neurones repose sur le fonctionnement de ces transporteurs. L'étude de ces interactions neurones-astrocytes, en particulier sur des modèles *in vivo*, nécessite des outils particuliers permettant de disséquer le rôle de chaque type cellulaire. Le développement de souris transgéniques conditionnelles exprimant des transgènes uniquement dans des cellules spécifiques grâce à des promoteurs sélectifs est un moyen performant pour étudier les astrocytes *in vivo*. Cependant, ces souris demandent un investissement important. Les vecteurs viraux représentent une alternative à ces approches de transfert de gène. Malheureusement, ces manipulations *in vivo* sont difficiles. En effet, il existe peu d'outils spécifiques et efficaces pour cibler les astrocytes *in vivo*. Notre objectif a été de développer un nouveau vecteur viral permettant une transduction spécifique des astrocytes *in vivo,* avec une efficacité importante et pouvant être utilisé dans l'ensemble du cerveau avec de nombreux transgènes. Au cours de ce travail nous avons développé trois voies de recherche qui sont les trois grandes méthodes pour modifier le tropisme d'un vecteur. Ainsi, nous avons modifié l'enveloppe du vecteur, les promoteurs utilisés pour l'expression du transgène et développé une nouvelle méthode de régulation post-transcriptionnelle utilisant les microARN. Une fois cet outil mis au point, notre objectif était d'étudier la fonction des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1. Nous avons ainsi étudié les conséquences métaboliques et excitotoxiques d'une inhibition spécifique de GLAST ou GLT-1 grâce à la technique de « RNA silencing ». Nous avons également cherché à réaliser des études préliminaires permettant d'aborder la question fonctionnelle d'une surexpression de ces transporteurs et de leur éventuel effet neuroprotecteur.

II. L'importance des astrocytes dans le système nerveux central

A. Organisation et morphologie

Pendant longtemps, les astrocytes ont été considérés comme des cellules comblant l'espace entre les neurones (Somjen 1988). Au cours des dernières années, de plus en plus d'études ont montré que les cellules gliales assurent un grand nombre de fonctions indispensables au sein du cerveau.

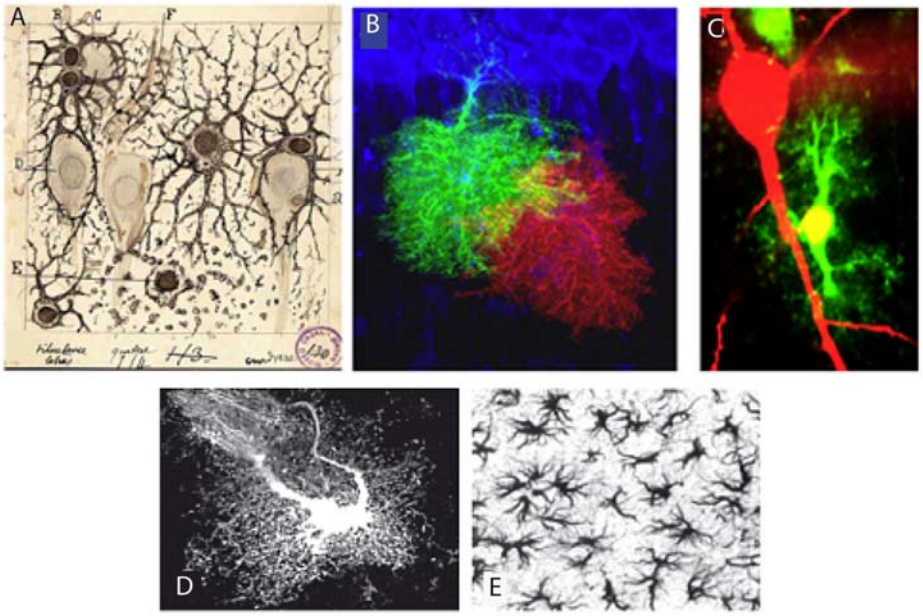
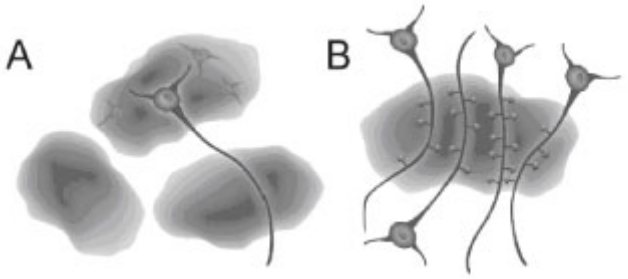


Figure 1: Morphologie et domaine astrocytaire. A: Marquage histologique des astrocytes fait par Cajal. B : Deux astrocytes marqués avec des fluorochromes différents. Leurs domaines ne se chevauchent que très peu. C : Les ramifications des astrocytes (vert) englobent les dendrites des neurones (rouge). D : Le marquage *in situ* avec la GFP révèle la complexité des prolongements. E: Le marquage GFAP révèle seulement une partie des prolongements.

Morphologiquement, les astrocytes ont des formes variées : spongiforme, stellaire, vélaire, fibreuse, étoilée (Emsley and Macklis 2006) qui changent selon leur localisation. Des formes distinctes qui suggèrent un panel de fonctions variées. Les astrocytes forment des prolongements très fins qui entrent en contact avec les vaisseaux sanguins (Kacem, Lacombe et al. 1998). Des prolongements GFAP(Glial fibrilliary acidic protein)-positifs qui contactent les artérioles et des prolongements plus fins, GFAP-négatifs, qui contactent les capillaires (Simard, Arcuino et al. 2003). Ces prolongements astrocytaires entourent également d'autres

structures élémentaires du système nerveux central : les synapses (Spacek 1985) (Figure 1), cette couverture astrocytaire semblant même s'adapter à l'activité neuronale (Genoud, Quairiaux et al. 2006). Faisant le lien entre le sang et les neurones, les astrocytes semblent alors être des cellules incontournables aux fonctions insoupçonnées.

La densité moyenne des astrocytes dans le cerveau varie selon les régions et selon les méthodes de marquage de 0 à 30000 astrocytes par mm^3 (Savchenko, McKanna et al. 2000 ; Emsley and Macklis 2006). Chaque astrocyte occupe un domaine distinct qui ne chevauche que très peu celui de son voisin en condition physiologique (Figure 1 ; Bushong, Martone et al. 2002; Ogata and Kosaka 2002; Halassa, Fellin et al. 2007; Oberheim, Tian et al. 2008). Cette parcellisation permet de concevoir ces domaines comme une unité fonctionnelle avec sa source de nutriments provenant des vaisseaux sanguins, et ses neurones et synapses consommateurs de ces nutriments. L'estimation du domaine imparti à chaque astrocyte, c'est-à dire du volume de la région dans laquelle s'étend l'astrocyte, varie selon les méthodes de marquage et de fixation entre 66000 et 85300 μm^3 (Bushong, Martone et al. 2002; Ogata and Kosaka 2002). Il semblerait que selon une étude plus récente, le domaine astrocytaire serait plus proche des 23000μm^3 (Halassa, Fellin et al. 2007) pour un volume cellulaire de 6500 μm^3 (Oberheim, Tian et al. 2008). Sachant qu'il y a en moyenne une synapse par μm^3 (Genoud, Knott et al. 2004), le nombre de synapses que peut contacter un astrocyte serait de 23000 synapses, ce chiffre est également confirmé par Halassa et al., en 2007. Selon d'autres études, ce chiffre pourrait atteindre les 140000 synapses (Bushong 2002). Un domaine astrocytaire peut être considéré alors comme une unité fonctionnelle pouvant englober et moduler plusieurs milliers de synapses issues de neurones différents. Et inversement, les synapses d'un même neurone peuvent être modulées par différents astrocytes (Figure 2).



Source : Halassa et al., J Neurosci., 2007

Figure 2: Représentation schématique du réseau neurones-astrocytes. A: Un astrocyte peut inclure plusieurs corps neuronaux dont les projections peuvent être inclues dans d'autres domaines astrocytaires. B : Un astrocyte peut englober des dendrites de plusieurs neurones et moduler les synapses situées sur son territoire. Un astrocyte peut donc coordonner un réseau neuronal.

Il semble alors important d'avoir une coopération entre astrocytes. Malgré le peu de chevauchement entre leurs domaines, les astrocytes sont en contact très étroit les uns avec les autres grâce aux jonctions gap, ils forment alors un réseau syncitial (Giaume and McCarthy 1996). Les jonctions gap des astrocytes sont formées par les connexines 26, 30 et 43 (Rash, Yasumura et al. 2001). Ces jonctions laissent passer des molécules de taille inférieure à 1 kDa comme les ions et le glucose ou encore le glutamate (Bennett, Barrio et al. 1991). Cette connexion entre les astrocytes représente une base morphologique importante des fonctions astrocytaires comme l'homéostasie ionique, métabolique et glutamatergique. L'expression des jonctions gap est régulée par l'activité neuronale (Rouach and Giaume 2001). Il existe donc des relations bidirectionnelles entre le réseau astrocytaire et les neurones qu'il englobe. De plus, ce syncytium régulerait la forme tridimensionnelle des neurones (Denis-Donini, Glowinski et al. 1984). Ce ne serait plus les astrocytes qui combleraient l'espace entre les neurones mais les neurones qui adapteraient leurs formes à l'espace inter-astrocytaire….

B. Les astrocytes et le glutamate

Les astrocytes remplissent des rôles très variés dans le SNC, leur fonctionnement étant souvent en relation avec celui des neurones. Brièvement, nous pouvons citer : recapture du glutamate et du GABA, synthèse de neurotransmetteur (glutamate, D-sérine, ATP), guidage des neurones au cours du développement, apport de substrats énergétiques aux neurones, régulation du pH extracellulaire, homéostasie ionique, intégrité de la barrière hématoencepalique, contrôle du débit sanguin cérébral, transmission synaptique,

synaptogénèse, neurogénèse (pour revue Ransom, Behar et al. 2003; Volterra and Meldolesi 2005; Agulhon, Petravicz et al. 2008; Theodosis, Poulain et al. 2008). Mon travail de thèse s'est concentré sur la manipulation des transporteurs astrocytaires au glutamate. Nous parlerons dans cette introduction plus précisément du rôle neuroprotecteur des astrocytes et de la régulation de la concentration de glutamate extracellulaire par ces transporteurs.

1. Le glutamate et l'excitotoxicité

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majoritaire du SNC (Fagg and Foster 1983). Le glutamate active différents types de récepteurs. Les récepteurs ionotropiques, canaux transmembranaires cationiques, nommés en fonction de leur agonistes spécifiques : les récepteurs AMPA (Amino-3-hydroxy-5 -methyisoxazol-4-propionic acid), kaïnate, et NMDA (N-methyl-D-aspartate). Les récepteurs métabotropiques sont des protéines formées de sept segments transmembranaires couplés aux protéines G (Heath and Shaw 2002). Ces récepteurs sont localisés au niveau neuronal présynaptique, post-synaptique mais aussi au niveau des membranes astrocytaires qui englobent la synapse. Cette localisation est compatible avec le fait que ces récepteurs peuvent fonctionner comme des capteurs de la concentration extracellulaire en glutamate.

Les concentrations intracellulaires de glutamate sont variables selon les compartiments. Dans les neurones, la concentration de glutamate est de 5 mM et atteint 1 mM en présynaptique, tandis que les astrocytes présentent une concentration de 2-3 mM (Nedergaard, Takano et al. 2002). Ces variations importantes inter-compartimentales et le maintien d'un taux extracellulaire faible, de l'ordre de quelques nM (Herman and Jahr 2007), nécessitent des régulations importantes. Comme il n'existe pas de système enzymatique permettant l'inactivation du glutamate synaptique, des mécanismes complexes de régulation sont présents afin de limiter la concentration extracellulaire.

En effet, le glutamate est connu pour avoir des effets toxiques dans le SNC (pour revue voir Doble 1999). Un surplus de glutamate provoque la mort des neurones par une activation excessive de ses récepteurs, notamment les récepteurs NMDA. L'activation de ces récepteurs entraîne un influx important de Na^+ et de Ca^{2+}, ce qui induit une dépolarisation et un gonflement des cellules et active des voies intracellulaires délétères (pour revue Arundine 2003 ; Sattler2001). Les protéases (calpaïnes, métalloprotéinases, caspases, cathepsines), activées par le Ca^{2+}, digèrent sélectivement de nombreuses protéines fondamentales comme les éléments du cytosquelette, des enzymes, des récepteurs. Ceci conduit à une perte de

l'homéostasie calcique, un stress oxydatif important et un clivage de l'ADN. Dans les phénomènes excitotoxiques aigus, l'entrée massive de Ca^{2+} est l'événement déclencheur de la cascade excitotoxique, mais la mort neuronale ne se produit qu'à la suite d'une dérégulation calcique irréversible d'origine mitochondriale (Stout, Raphael et al. 1998). L'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte propose que la baisse d'ATP engendrée par une altération mitochondriale induirait une perturbation du potentiel de membrane. Les récepteurs NMDA seraient alors hypersensibles et induiraient un influx accru d'ions calcium (Greene et Greenamyre1996). Cependant cette hypothèse est débattue. L'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale pourrait potentialiser la toxicité engendrée par l'activation des récepteurs NMDA via une altération de la gestion du calcium et non par un influx accru par les récepteurs hypersensiblisés (Jacquard, Trioulier et al. 2006).

Lors de l'activité synaptique, le glutamate est libéré dans la fente synaptique. Les transporteurs de haute affinité au glutamate permettent la recapture du glutamate extracellulaire afin de limiter à la fois son temps et son volume d'action sur les récepteurs pré- et post-synaptiques.

2. Les transporteurs au glutamate

Les transporteurs au glutamate (EAAT, excitatory amino acid transporter) sont composés de cinq types : EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 et EAAT5. EAAC1 est exprimé par les neurones glutamatergiques et GABAergiques. EAAT4 est exprimé par les cellules de Purkinje du cervelet et EAAT5 par les cellules de Muller de la rétine (Danbolt 2001).

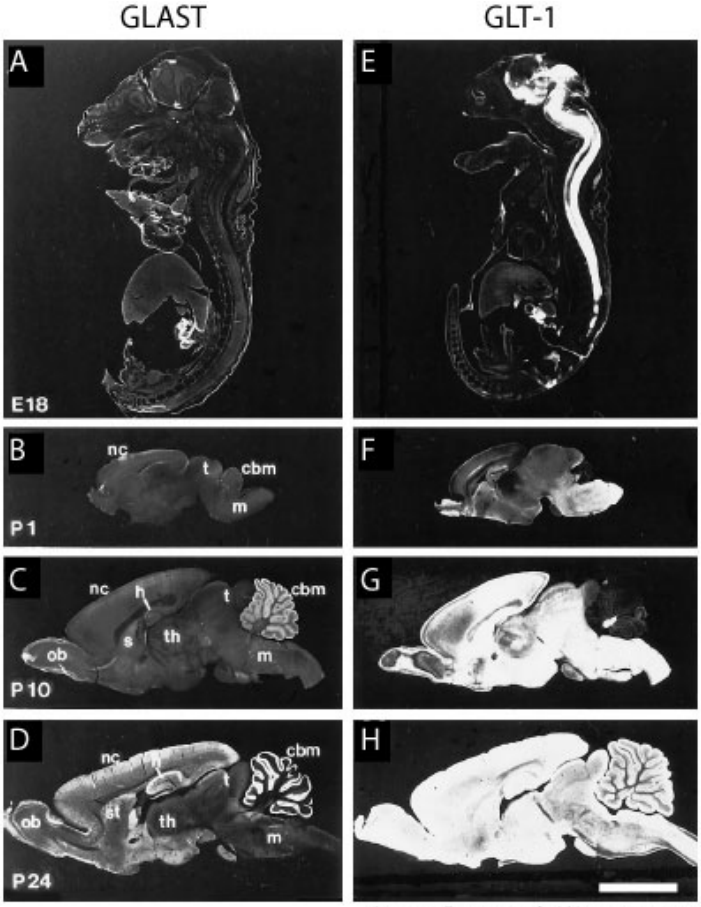
Nous parlerons plus précisément des transporteurs GLAST et GLT-1 qui sont responsables de plus de 80% de la recapture du glutamate (Rothstein, Dykes-Hoberg et al. 1996).

a. Structure et localisation

Les transporteurs au glutamate sont des protéines de 500 à 600 acides aminés, composées de six domaines transmembranaires avec leurs parties N et C terminales intracellulaires. La forme active de ces transporteurs est homotrimèrique (Haugeto, Ullensvang et al. 1996). Ils forment des oligomères liés de façon non covalente (Shigeri, Seal et al. 2004) et présentent 50 à 60% d'homologie. GLAST et GLT-1 sont localisés à 90% au

niveau de la membrane plasmique et sont enrichis au niveau des membranes accolées aux synapses (Chaudhry, Lehre et al. 1995).

GLAST est présent dans toutes les régions du cerveau avec d'importantes variations. Il est majoritaire dans la glie de Bergmann dans le cervelet (Lehre and Danbolt 1998). Il présente des taux élevés d'expression dans l'hippocampe, le bulbe olfactif, le cortex cérébral. Il apparaît dès les stades embryonnaires et son expression augmente jusqu'à l'âge adulte (Figure 3). Il est exprimé à la membrane des astrocytes, par les cellules de Müller de la rétine (Lehre, Davanger et al. 1997), sur des progéniteurs gliaux (Maragakis, Dietrich et al. 2004) et dans la glie radiaire pendant le développement (Shibata, Yamada et al. 1997).



Source : Furuta et al., J Neurosci, 1997

Figure 3: L'expression des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1 au cours du développement. Marquage imunohistochimique sur coupes parasagittales de cerveaux de rat à E18 (A, E), P1 (B, F), P10 (C, G), P24. (D, H) Le niveau d'expression de GLAST et GLT-1 augmente au cours du développement. GLAST est majoritaire dans le cervelet et GLT-1 est exprimé très fortement de façon ubiquitaire à l'âge adulte. Echelle 5mm.

GLT-1 est indétectable avant la naissance et atteint une expression stable après cinq semaines (Furuta, Rothstein et al. 1997). C'est le transporteur majoritaire du cerveau, il représenterait 1% des protéines totales du cerveau (Sheldon and Robinson 2007) (Figure 3). Il est fortement exprimé dans l'hippocampe, le cortex et le striatum (Lehre, Levy et al. 1995). GLT-1 est exprimé dans les astrocytes et les neurones bipolaires de la rétine (Rauen 2000). De nombreuses études montrent la spécificité astrocytaire de GLT-1 (Danbolt, Storm-Mathisen et al. 1992 ; Levy, Lehre et al. 1993; Rothstein, Martin et al. 1994; Lehre, Levy et al. 1995). Mais l'ARNm de GLT-1 est présent dans les neurones du cortex et de l'hippocampe (Torp, Danbolt et al. 1994; Schmitt, Asan et al. 1996; Berger and Hediger 1998; Chen, Mahadomrongkul et al. 2004; Berger, DeSilva et al. 2005), et le transporteur serait faiblement exprimé dans les terminaisons synaptiques des neurones de l'hippocampe (Chen, Mahadomrongkul et al. 2004; Furness, Dehnes et al. 2008). GLT-1 possède un variant d'épissage alternatif appelé GLT-1v ou b. Ce variant est exprimé dans neurones du SNC et de la rétine (Reye, Sullivan et al. 2002; Schmitt, Asan et al. 2002). Ces transporteurs sont également exprimés dans les neurones en condition hypoxique (Pow, Naidoo et al. 2004), pathologique (Scott, Pow et al. 2002) ou pendant le développement (pour revue (Danbolt 2001). Cependant son expression neuronale en condition physiologique reste faible et son rôle reste encore à éclaircir. D'autre part, GLT-1 est exprimé par les cellules microgliales (Nakajima, Yamamoto et al. 2008).

b. Rôle des transporteurs

Nous allons parler dans cette partie du rôle des transporteurs dans la capture du glutamate. Leur rôle dans le métabolisme cérébral sera évoqué dans la partie « Implications des transporteurs dans les interactions neurones-astrocytes ».

La recapture se fait par transport facilité secondaire. Un glutamate est transporté avec trois ions Na^+et un ion H^+ dans la cellule tandis qu'un ion K^+ est transporté en sens inverse (Tzingounis and Wadiche 2007). Les transporteurs au glutamate permettent également le passage d'ions Cl^- de façon non couplée dont le rôle reste inconnu. Le cycle de transport est lent (environ 70 ms) mais la liaison du glutamate est rapide (1-2 ms) ce qui lui procure un grand pouvoir tampon (Wadiche, Arriza et al. 1995) et donc une protection rapide contre la toxicité du glutamate. En effet, lorsqu'une seule vésicule synaptique de glutamate est exocytée, la synapse reçoit environ 4000 molécules de glutamate. Ces molécules rencontreraient alors dans la milliseconde qui suit, jusqu'à 10000 transporteurs au glutamate,

beaucoup plus que le nombre de récepteurs AMPA qu'elles activeraient (environ 25) (Marcaggi and Attwell 2004). Grâce à leur pouvoir tampon, ces transporteurs permettent de limiter l'activation de récepteurs au glutamate et sont donc impliqués dans la transmission synaptique en permettant un raccourcissement de la durée des courants NMDA et AMPA (Tzingounis and Wadiche 2007). Ils évitent également la diffusion du glutamate hors de la synapse donc la stimulation des synapses voisines (Tsvetkov, Shin et al. 2004) et des récepteurs extrasynaptiques (Huang and Bergles 2004; Huang, Sinha et al. 2004; Volterra and Meldolesi 2005; Zheng, Scimemi et al. 2008). Leur inhibition peut induire, selon les synapses, une augmentation de la durée des PPSE et une diminution du seuil de déclenchement d'une activité épileptique (Barbour, Keller et al. 1994; Takahashi, Kovalchuk et al. 1995; Campbell and Hablitz 2004; Campbell and Hablitz 2008) de façon NMDA dépendante. Ils jouent également un rôle important dans la LTP (long term potentiation) (Katagiri, Tanaka et al. 2001) en atténuant l'activité des récepteurs NMDA. Les souris invalidées pour GLT-1 présentent un taux extracellulaire de glutamate augmenté, des crises d'épilepsie spontanées et une létalité progressive (Tanaka, Watase et al. 1997). Dans des préparations de synaptosomes de cortex de ces souris, la capacité de recapture du glutamate est diminuée de 95%. Les souris invalidées pour GLAST présentent une sensibilité excitotoxique accrue aux lésions cérébelleuses et une mauvaise coordination motrice (Watase, Hashimoto et al. 1998). Ces données montrent donc que ces transporteurs ont un rôle important dans la transmission synaptique et la plasticité.

Pour résumer, ces transporteurs maintiennent un taux extracellulaire de glutamate permettant une stimulation efficace mais non excitotoxique des neurones. C'est pourquoi la régulation de ces protéines est assurée par des mécanismes divers et complexes.

c. Régulation de la recapture

L'activité de transport du glutamate n'est pas constante. Elle est contrôlée par différents mécanismes de régulation agissant à de nombreux niveaux : de la synthèse des ARNm à la synthèse et l'adressage des protéines en passant par des mécanismes de modulation directe de l'activité (pour revue, Danbolt 2001). Ces régulations peuvent se faire à court terme comme les modifications post-traductionnelles et par des changements de localisation (Robinson 2002) ou à long terme comme les mécanismes transcriptionnels modulant l'expression des protéines (Figure 4). GLAST et GLT-1 ne sont ni régulés de la même façon ni par les mêmes composés. Par exemple, les glucocorticoïdes induisent

l'expression de GLT-1 (Zschocke, Bayatti et al. 2005), tandis que le PACAP stimule l'expression de GLAST à des concentrations différentes de celles de GLT-1 (Figiel and Engele 2000).

La régulation de l'expression des transporteurs au glutamate est un exemple des interactions neurones-glie. En effet, les neurones produisent des facteurs diffusibles, comme le PACAP, qui augmentent l'expression de GLAST et surtout de GLT-1 (Gegelashvili, Danbolt et al. 1997; Swanson, Liu et al. 1997; Figiel and Engele 2000), tandis que les astrocytes induisent l'expression de EAAC1 par les neurones (Canolle, Masmejean et al. 2004).

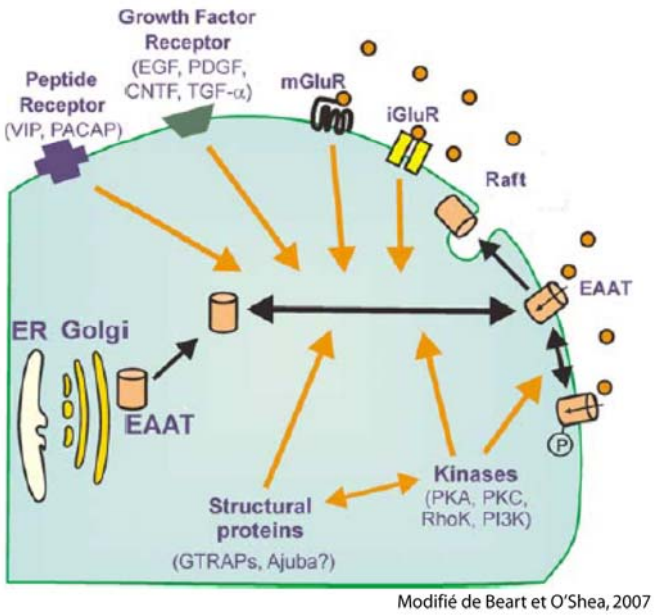


Figure 4: Mécanismes contribuant aux régulations à court terme et à long terme des transporteurs au glutamate. L'expression des transporteurs et l'activité des transporteurs sont régulées par diverses voies dont l'activation de récepteurs aux facteurs de croissance, au glutamate, à des peptides sécrétés par les neurones. Le changement de localisation entre pool intracellulaire et pool membranaire et la localisation dans les rafts et des protéines de structure ont une influence importante sur l'activité des transporteurs. Les voies de phosphorylation sont également très importantes dans ces influences.

L'expression de ces transporteurs est également régulée par l'activité neuronale, le degré d'innervation et par les neurotransmetteurs comme la dopamine (Nieoullon, Kerkerian et al. 1983; Kerkerian, Dusticier et al. 1987; Genoud, Quairiaux et al. 2006).

Le glutamate peut agir via les récepteurs ionotropiques et métabotropiques astrocytaires afin d'augmenter à long terme l'expression de GLAST et GLT-1 (Gegelashvili, Civenni et al. 1996; Thorlin, Roginski et al. 1998). Un surplus d'activation pouvant être

excitotoxique l'activation de ces récepteurs va entrainer, à long terme, une augmentation de l'expression des transporteurs au glutamate qui pourront ainsi protéger les neurones. Cette relation est un autre exemple des interactions neurones-astrocytes. Le glutamate peut également agir indépendamment des récepteurs via l'influx sodique lié au fonctionnement des transporteurs, et ainsi permettre une redistribution de GLT-1 (Nakagawa, Otsubo et al. 2008).

D'autres facteurs peuvent réguler l'expression des transporteurs astrocytaires comme les facteurs de croissance EGF, TGF-α, PDGF et FGF2 (Zelenaia, Schlag et al. 2000) (Figiel, Maucher et al. 2003). Leur influence est variable selon les types de transporteurs, leur effet passerait par l'implication de voies signalisation impliquant certaines kinases. *In vivo*, l'expression de GLT-1 est augmentée par les antibiotiques du type β-lactames (Rothstein, Patel et al. 2005), le ligand des neuroimmunophilines (Ganel, Ho et al. 2006) ou encore les liposacharides (O'Shea, Lau et al. 2006). La cytokine TNF-α inhibe l'expression de GLT-1 via le facteur de transcription NKκB (Sitcheran, Gupta et al. 2005).

Les agents oxydo-réducteurs peuvent également réguler les transporteurs. Une oxydation des groupements thiols entraine une diminution de leur activité (Trotti, Danbolt et al. 1998), ce qui en fait des cibles importantes en cas de stress oxydatif.

De nombreuses protéines kinases peuvent agir sur les transporteurs par phosphorylation. Cette phosphorylation peut avoir pour conséquence : un effet direct rapide sur l'efficacité de transport (Gonzalez, Kazanietz et al. 2002; Robinson 2002) et/ou un changement de localisation à la membrane (Guillet, Velly et al. 2005). La stabilisation des transporteurs à la membrane a pour conséquence l'augmentation de la vitesse de transport (Gonzalez, Bannerman et al. 2003).

Une des voies importantes de régulation est la localisation subcellulaire des transporteurs. GLT-1 et GLAST sont situés à près de 80% au niveau de la membrane plasmique, EAAC1 est présent en proportion à 70% dans le cytosol (Danbolt 2001) (Sheldon, Gonzalez et al. 2006). Le recrutement ou l'internalisation des transporteurs peut être alors un bon moyen d'augmenter rapidement la recapture du glutamate. Comme pour la régulation de l'expression et de l'activité des transporteurs, les voies de signalisation impliquant des kinases/phosphatases (protéines kinases C et B, phosphoinositol-3-kinase, phospholipase C, kinases inductibles par le sérum et les glucocorticoïdes et de la calcineurine ; pour revue Beart and O'Shea 2007) sont impliquées dans ce phénomène de régulation de la localisation subcellulaire. Le rôle des différents acteurs dans ces mécanismes est très variable et dépend du type de transporteur. Par exemple, l'activation de la PKC diminue l'expression de GLT-1 à la membrane (Kalandadze, Wu et al. 2002) via l'internalisation et la dégradation par

ubiquitination (Sheldon, Gonzalez et al. 2008) et a l'effet inverse sur EAAC1 (Davis, Straff et al. 1998; Guillet, Velly et al. 2005).

Cette régulation entre pool intracellulaire et pool membranaire se ferait grâce à des protéines qui feraient le lien entre les transporteurs et les protéines du cytosquelette (Zagami, O'Shea et al. 2005; O'Shea, Lau et al. 2006). Ces protéines sont des protéines de structure : Ajuba et GTRAP (glutamate transporter associated protein). GLT-1 interagit avec la protéine Ajuba (Marie, Billups et al. 2002). Les GTRAP auraient des liens avec le réseau d'actine associé à EAAC1 (Jackson, Song et al. 2001 ; pour revue Beart and O'Shea 2007). L'importance de l'interaction des transporteurs avec le cytosquelette est confirmée par le fait que des souris invalidées pour le gène de la GFAP présentent une baisse de 25% de la capacité de transport du glutamate dans le cortex et l'hippocampe (Hughes, Maguire et al. 2004). De plus, l'interaction de GFAP avec GLAST serait essentielle à son maintien à la membrane et à sa fonctionnalité (Sullivan, Lee et al. 2007). Les protéines du cytosquelette sont également importantes pour la formation de 'clusters' dynamiques de GLT-1 à la membrane des astrocytes en culture (Zhou and Sutherland 2004). L'activité des transporteurs est également influencée par leur position à la membrane. En effet, les transporteurs sont rassemblés dans des domaines spécifiques de la membrane : les rafts. GLT-1 et, dans une moindre mesure, GLAST sont enrichis dans les rafts *in vitro* et *in vivo* (Butchbach, Tian et al. 2004). Ces rafts forment des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides. Si l'intégrité des rafts est détruite par une déplétion en cholestérol, la recapture de glutamate est rapidement et drastiquement diminuée (Butchbach, Tian et al. 2004).

D'autre part, les astrocytes sont reliés les uns aux autres par des connexines. Le découplage des astrocytes *in vitro* provoque une diminution importante de l'expression de GLT-1 et une légère augmentation de GLAST (Figiel, Allritz et al. 2007) suggérant l'importance de l'intégrité du syncytium astrocytaire dans l'expression des protéines.

D'une manière plus générale, les astrocytes peuvent, grâce à la motilité de leur cytosquelette, changer de conformation et devenir activés, notamment grâce à certains facteurs de croissance. Cette capacité à moduler leur cytosquelette leur procure la possibilité de modifier la localisation des transporteurs au glutamate. Ainsi, le CNTF qui active les astrocytes permet aussi une réorganisation des transporteurs dans les rafts (Escartin, Brouillet et al. 2006).

C. Implication des transporteurs au glutamate dans les interactions neurones-astrocytes

La position stratégique des astrocytes, faisant le lien entre les vaisseaux sanguins et les neurones fait de ces cellules des acteurs importants du métabolisme cérébral. Les interactions neurones-astrocytes sont très variées et importantes dans le cerveau. Nous allons développer ici quelques unes des interactions impliquant les astrocytes, l'activité glutamatergique et le métabolisme.

1. Homéostasie du glutamate

Les interactions neurones-astrocytes sont critiques pour assurer le maintien du rôle du glutamate. La synthèse de glutamate à partir du glucose n'est pas possible par les neurones. En effet, les neurones n'expriment pas la pyruvate carboxylase qui est une enzyme cruciale pour la fabrication du glutamate (Waagepetersen, Sonnewald et al. 2001). Cette incapacité à renouveler le glutamate est compensée par les astrocytes (Figure 5). Les transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1 transfèrent le glutamate de la fente synaptique au cytoplasme. Le glutamate est converti en glutamine par la glutamine synthase, enzyme spécifiquement astrocytaire (Derouiche and Rauen 1995). La glutamine est ensuite transportée hors des astrocytes et recaptée par les neurones. Ce cycle est appelé la navette glutamate-glutamine et permet de la reconstitution du stock de neurotransmetteurs dans les neurones (Daikhin and Yudkoff 2000). La conversion de glutamate en glutamine par la glutamine synthase est couplée une activation de la glycolyse (Magistretti1999).

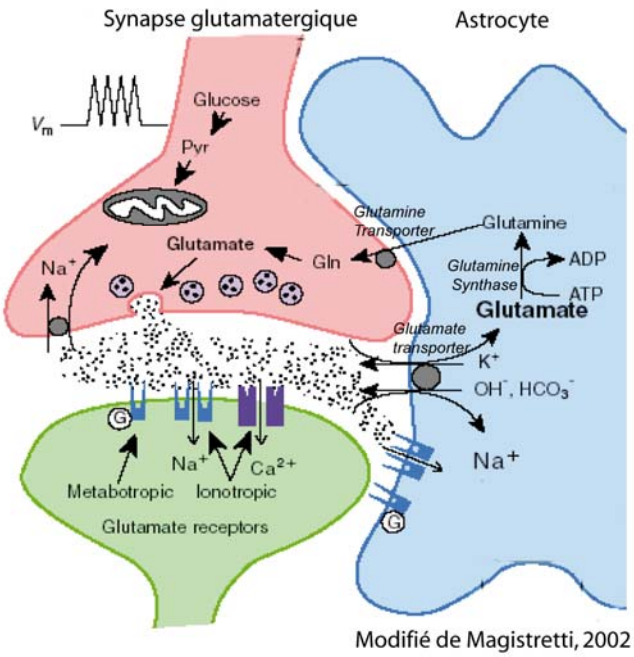


Figure 5: La navette glutamate-glutamine. Le glutamate libéré dans la fente synaptique est recapté par les transporteurs du glutamate (GLAST ou GLT-1). La glutamine synthase astrocytaire permet sa conversion en glutamine. Cette glutamine est ensuite transportée vers les neurones qui l'utilisent pour renouveller leur pool de glutamate.

2. Le couplage neurométabolique

Le cerveau humain constitue 2% de notre poids mais reçoit 15% du volume sanguin total et consomme 25% du glucose total utilisé par l'organisme (Magistretti, Pellerin et al. 1999). Cette énergie est utilisée principalement pour la restauration et le maintien du potentiel de membrane (Attwell and Laughlin 2001). Environ 90% de l'énergie serait consommée par les neurones, dont les synapses glutamatergiques qui sont les plus consommatrices en énergie. Ces processus sont dépendants de l'apport de substances énergétiques (Attwell and Gibb 2005). L'utilisation importante du glucose sanguin par le cerveau a longtemps permis de penser que c'était le substrat préférentiel des neurones. En réponse à l'activité synaptique, il s'opérait alors un couplage neurométabolique et donc une activation du métabolisme pour augmenter la production d'énergie. Le déficit énergétique dans les neurones activait la glycolyse et favorisait l'entrée accrue de glucose dans les neurones, à travers GLUT3, le transporteur neuronal au glucose. Ainsi, les neurones contrôleraient directement leur apport énergétique. Cependant cette idée est clairement remise en question avec l'implication des astrocytes dans ce couplage. Des expériences mettant en compétition deux substrats énergétiques, le glucose et le lactate, montrent que le substrat préférentiel des neurones serait

le lactate et non le glucose (Bouzier-Sore, Voisin et al. 2003; Itoh, Esaki et al. 2003; Bouzier-Sore, Voisin et al. 2006) et que l'inverse est observé pour les astrocytes. Selon l'hypothèse dite ANLSH (Astrocyte-Neurone Lactate Shuttle Hypothesis), le lactate serait produit par les astrocytes pour subvenir aux besoins énergétiques des neurones en activité (Magistretti, Pellerin et al. 1999). En effet, il semblerait que, *in vitro*, l'activation glutamatergique entrainerait non pas une augmentation de l'utilisation de glucose et de son transport dans les neurones mais bien une diminution (Porras, Loaiza et al. 2004). Dans les astrocytes, le transport du glucose et la glycolyse seraient augmentés.

Une revue récente (Pellerin, Bouzier-Sore et al. 2007) explique de façon convaincante l'hypothèse du couplage métabolique astrocytes-neurones via le lactate (Figure 6). La libération de glutamate dans la fente synaptique entrainerait l'activation de récepteurs AMPA et la propagation d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). La restauration du potentiel de membrane par la pompe Na+/K+ ATPase consommerait des quantités importantes d'énergie. Pour combler ce manque d'ATP, la phosphorylation oxydative serait activée et, en conséquence, le niveau de NADH baisserait. Ceci a été montré par l'analyse de la forme réduite du NAD sur des tranches d'hippocampe de rat qui montre que suite à une stimulation, une dégradation rapide du NADH,H+ se produit dans les neurones (Kasischke, Vishwasrao et al. 2004). Ensuite pour combler les besoins en ATP et en NADH, le cycle de Krebs serait activé et donc l'utilisation de pyruvate augmentée. Pour compenser l'utilisation du pyruvate, le glucose et le lactate seraient transportés dans les neurones. Or, comme cité précédemment, le transport de glucose ainsi que la glycolyse dans les neurones diminueraient, le lactate serait alors utilisé comme substrat préférentiel (Bouzier-Sore, Voisin et al. 2003; Porras, Loaiza et al. 2004). Le lactate est importé du milieu extracellulaire par le transporteur des monocarboxylates MCT2. Cette dernière étape est confirmée par l'observation d'une diminution du taux extracellulaire de lactate *in vivo* (Hu and Wilson 1997; Mangia, Garreffa et al. 2003). Cette phase est la phase précoce de l'activation dont l'acteur principal est le neurone. Dans un deuxième temps, les astrocytes interviendraient. En effet, lors de la libération du glutamate dans la synapse, les transporteurs astrocytaires du glutamate (GLAST et GLT-1) recapturent le neurotransmetteur. Cette recapture est liée à une entrée d'ion Na^+ ce qui déséquilibrerait le gradient ionique de sodium et activerait donc la pompe Na^+/K^+ ATPase pour rétablir ce gradient (Pellerin and Magistretti 1997). La diminution d'ATP résultant du fonctionnement de cette pompe activerait la glycolyse. La consommation de glucose par l'astrocyte est augmentée, l'apport de glucose par le transporteur astrocytaire GLUT1 également (Loaiza, Porras et al. 2003 ; Pellerin and Magistretti 1994). La glycolyse étant

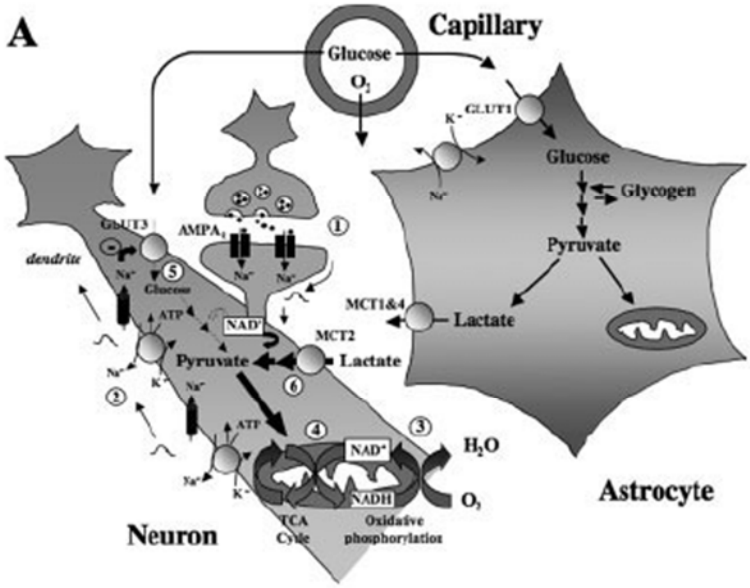
stimulée, une augmentation de la concentration de NADH est observée (Kasischke, Vishwasrao et al. 2004). La production de lactate à partir du pyruvate permettrait de rétablir une concentration normale de NADH. Le lactate produit est transféré aux neurones par les transporteurs des monocarboxylates (MCT1 et 4) dans l'espace extracellulaire pour reconstituer le stock de lactate. Ceci est confirmé par l'observation de l'augmentation du taux de lactate extracellulaire après une activation *in vivo* (Hu and Wilson 1997). Le lactate ainsi fourni par les astrocytes permet de subvenir aux besoins énergétiques des neurones en activité (Pellerin and Magistretti 1994; Magistretti, Pellerin et al. 1999).
Cette hypothèse semble confirmée par le fait que, chez les souris KO pour ces transporteurs, l'augmentation de glucose observé après une stimulation est diminuée (Voutsinos-Porche, Bonvento et al. 2003; Herard, Dubois et al. 2005). De plus, les cultures dérivées de souris KO GLAST montrent une diminution de 60% de libération de lactate en réponse à une application de glutamate (Voutsinos-Porche, Bonvento et al. 2003). Cette même étude montre que l'entrée de Na^+ (qui accompagne le transport glutamate) est suffisante pour initier la glycolyse dans les astrocytes.

Les astrocytes et les transporteurs GLAST et GLT-1 ont un rôle primordial dans le métabolisme cérébral. La recapture du glutamate semble signaler les besoins énergétiques des neurones environnants. Une altération du transport du glutamate pourrait engendrer une vulnérabilité métabolique importante.

Physiologiquement ce processus de couplage requiert une communication des astrocytes avec les vaisseaux sanguins.

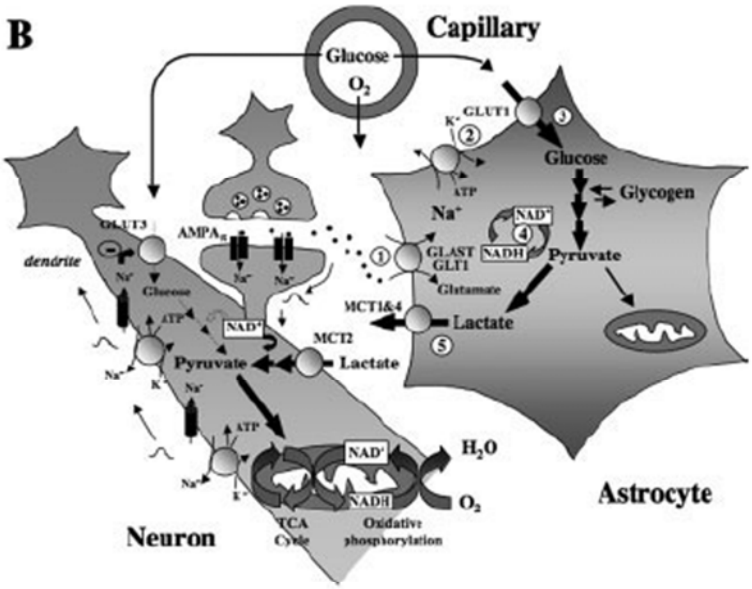
A : Première étape

L'activation des récepteurs AMPA par le glutamate libéré dans la fente synaptique provoque la genèse d'un PPSE par l'entré d'ion Na+(1). Le rétablissement du gradiant sodique par la Na=/K+ ATPase consomme beaucoup d'ATP (2) ce qui entraine une activation de la phosphorylation oxydative (3) et du cycle de Krebs (4). Pour combler rapidement les besoins energétiques, l'apport de glucose baisse (5) et l'apport de lactate est augmenté (6).



B : Deuxième étape

Le glutamate libéré dans la fente synaptique est recapté par GLAST et GLT-1 (1). L'apport couplé de Na+ provoque l'activation de la Na+/K+ ATPase (2) ce qui entraine un transport de glucose dans l'astrocyte (3) et son utilisation (4). L'augmentation de NADH résultante va être normalisée par la conversion du pyruvate en lactate et son transport dans le milieu extracellulaire par les MCT1 et 4 (5). Ce lactate rétablit le pool extracellulaire diminué par les neurones et subvient aux besoins energétiques du neurone activé.



Source : Pellerin et al., Glia, 2007

Figure 6 : Le couplage neurométabolique.
Les neurones en activité ont besoin de ressources énergétiques importantes et rapidement disponibles. Ils utilisent alors le lactate extracellulaire relargué par les astrocytes.

3. Couplage neurovasculaire

Les cellules cérébrales consomment le glucose et l'oxygène provenant du sang. L'activité de ces cellules doit être couplée à une augmentation du débit sanguin afin de subvenir aux besoins du cerveau en activité. La présence des pieds astrocytaires autour des vaisseaux sanguins laisse penser que ces cellules sont impliquées dans cette hyperhémie fonctionnelle. Des études sur des tranches corticales ont montré que la stimulation des

neurones conduit à une vasodilatation qui est précédée par l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire des astrocytes qui contactent ces vaisseaux sanguins (Zonta, Angulo et al. 2003; Zonta, Sebelin et al. 2003). Les récepteurs métabotropiques astrocytaires sont activés par la libération synaptique de glutamate et induisent un influx calcique. Au niveau des pieds astrocytaires, ce signal induit la production par la cyclooxygénase de molécules vasodilatatrices. Par la suite ces résultats ont été confirmés *in vivo* (Takano, Tian et al. 2006). Outre ce mécanisme, il semblerait que les transporteurs au glutamate et particulièrement GLT-1 soit impliqués dans l'hyperhémie fonctionnelle suite à une activation neuronale (Petzold, Albeanu et al. 2008). Ces données montrent l'importance des astrocytes dans le contrôle du débit sanguin.

D. Implication des astrocytes et des transporteurs au glutamate dans les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par la vulnérabilité d'une population neuronale spécifique. Pourtant, le processus de toxicité est généralement causé par la mutation d'une protéine exprimée de façon ubiquitaire, dans les neurones comme dans les astrocytes. Nous allons évoquer ici l'implication des interactions neurones-astrocytes, et plus particulièrement des transporteurs astrocytaires au glutamate, dans les maladies neurodégénératives. Le fait que le cerveau ait des besoins énergétiques importants, qui correspondent à 90% à des besoins neuronaux, (Attwell and Laughlin 2001) et peu de réserves le rend très vulnérable à des dysfonctions métaboliques.

Les phénomènes d'excitotoxicité sont communs à de nombreuses maladies neurodégénératives dont la maladie de Huntington. De nombreux travaux montrent que les transporteurs au glutamate jouent un rôle dans ces mécanismes. Ainsi, les inhibiteurs des transporteurs au glutamate potentialisent la toxicité du glutamate et accroissent la sensibilité des neurones à la privation d'oxygène et de glucose (Robinson, Djali et al. 1993; Dugan, Bruno et al. 1995). Ceci se fait en partie par des mécanismes de neurotoxicité NMDA dépendants (Guiramand, Martin et al. 2005). Sur des tranches d'hippocampe (Bonde, Noraberg et al. 2005), le blocage des transporteurs au glutamate par le TBOA induit une neurodégénérescence nécrotique. *In vivo*, l'inhibition de l'expression de transporteurs au glutamate par des oligonucléotides antisens induit une neurodégénérescence (Rothstein, Dykes-Hoberg et al. 1996). Les souris KO pour GLT-1 montrent une diminution du transport, des lésions et une sensibilité à la neurotoxicité accrue (Tanaka, Watase et al. 1997) en plus du

déficit métabolique déjà évoqué (Voutsinos-Porche, Bonvento et al. 2003; Herard, Dubois et al. 2005). Ces données montrent de façon convaincante qu'une altération du transport glutamatergique peut contribuer aux phénomènes neurodégénératifs. D'autre part, des perturbations métaboliques sont souvent associées aux phénomènes excitotoxiques dans les maladies neurodégénératives (Greene and Greenamyre 1996; Walton and Dodd 2007; Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008; Knott, Perkins et al. 2008; Pope, Land et al. 2008; Turner and Talbot 2008). La toxicité du glutamate peut être exacerbée par l'inhibition du métabolisme énergétique (Greene and Greenamyre 1995; Schinder, Olson et al. 1996) et l'inhibition des transporteurs peut induire une mort neuronale lors de l'altération du métabolisme mitochondrial (Massieu, Gomez-Roman et al. 2000; Massieu, Del Rio et al. 2001). D'autre part, l'hypothèse qu'une altération du métabolisme glutamatergique résultant d'une altération du transport du glutamate conduirait à des dommages neuronaux a été avancée afin d'expliquer la neurodégénérescence lente observée dans les maladies neurodégénératives (Rae, Lawrance et al. 2000; Had-Aissouni, Re et al. 2002; Aoyama, Suh et al. 2006). De plus, une composante oxydative pourrait avoir un rôle important dans les mécanismes de neurodégénérescence (Browne and Beal 2006; Potashkin and Meredith 2006; Sas, Robotka et al. 2007; Tian, Lai et al. 2007; Knott, Perkins et al. 2008; Pope, Land et al. 2008). En effet, les transporteurs du glutamate sont également impliqués dans les mécanismes de production de molécules antioxydantes et leur perturbation pourrait engendrer un stress oxydatif (Had-Aissouni, Re et al. 2002; Re, Boucraut et al. 2003; Aoyama, Suh et al. 2006; Tian, Lai et al. 2007).

Les maladies neurodégénératives impliquent des phénomènes toxiques divers, complexes et multifactoriels. L'implication des astrocytes dans ces pathologies est de plus en plus admis (pour revue (Beart and O'Shea 2007; Lobsiger and Cleveland 2007; Sheldon and Robinson 2007). Des altérations des transporteurs du glutamate ont été montrées dans de nombreuses maladies comme la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer (Tableau 1). L'implication de ces altérations dans la pathogénèse ou en tant qu'épiphénomènes consécutifs à la maladie reste à déterminer. Nous allons plus particulièrement nous intéresser à deux maladies pour lesquelles ces altérations sont bien étudiées : la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique.

	Tissus humains	Modèles expérimentaux
Sclérose latérale amyotrophique	[Glu]↑ dans le FCS ↓ du transport dans le cerveau ↓ de GLT-1 dans le cerveau	Mutant SOD1 inactive GLT-1 [Glu]↑ dans cortex des souris transgéniques SOD1 et perte locale de GLT-1
Epilepsie	[Glu]↑ dans le sang [Glu]↑ dans l'hippocampe pendant l'attaque Perturbation de l'expression des transporteurs au glutamate	Epilepsie fatale chez les souris KO GLT-1 Diminution des transporteurs chez les rats génétiquement épileptiques
Maladie de Huntington	↓ de GLT-1 dans le neostriatum ↓ du transport dans le putamen et le noyau caudé	↓ de GLT-1 et du transport chez les souris R6 Perturbation du métabolisme glutamatergique chez les souris R6/2
Maladie d'Alzheimer	↓ de GLT-1 ↓ du transport Expression neuronale aberrante des transporteurs	↓ de GLT-1, GLAST et du transport chez les souris transgéniques APP ↓ de GLT-1 et du transport chez les souris GFAP-tau B-amyloïde diminue le transport
Accident vasculaire cérébral	Perturbation de l'expression des transporteurs au glutamate	Transport inverse en conditions d'ischémie sévère *in vitro* ↓ de GLT-1 et expression neuronale en condition hypoxique/ischémique ↓ de GLT-1 dans le striatum et ↑ dans le cortex chez le rat hypoxique/ischémique
Scléroses multiples	[Glu]↑ dans le sang [Glu]↑ dans la substance blanche et dans les lésions Perturbations de l'expression des transporteurs du glutamate	TNFα ↓ GLT-1 et le transport dans les oligodendrocytes *in vitro* Dépolarisation induit un transport inverse dans la substance blanche de la moelle épinière
Infections	[Glu]↑ dans le sang chez les patients VIH ↓ du transport chez les patients VIH déments	TNFα ↓ le transport dans les astrocytes *in vitro* VIH ↓ GLT-1 et le transport dans les astrocytes LPS ↑ GLT-1 dans les astrocytes et la microglie *in vitro*
Rétinopathies	[Glu]↑ dans le corps vitreux chez les patients atteints de glaucome et de rétinopathie due au diabète [Glu]↑ dans les yeux chez les patients atteints de glaucome	[Glu]↑ intraoculaire après lésion du nerf optique ↓ de GLT-1 après ischémie rétinienne

Tableau 1 : Perturbations des transporteurs au glutamate dans les maladies neurologiques.
[Glu] : concentration de glutamate ; FCS : fluide cérébrospinal ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine ; SOD1 : superoxyde dismutase 1 ; APP : Amyloïde précurseur protéine ; LPS : liposaccharides ; TNFα : facteur de nécrose tumorale α. (Modifié de Beart et O'Shea, 2007)

1. La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La SLA est une affection neurologique caractérisée par une dégénérescence progressive de certains neurones moteurs inférieurs et supérieurs. C'est la maladie la plus courante touchant les motoneurones chez l'adulte. Cette maladie est généralement fatale dans les 1 à 5 ans qui suivent le début de la maladie.

La majorité des cas est sporadique, seulement 5 à 10% des cas sont familiaux. Une importante avancée dans la compréhension des mécanismes de la pathogénie de la SLA vient de l'identification de mutations du gène SOD1 qui intervient dans 20% des formes familiales (Maragakis and Rothstein 2004). Ce gène code pour une superoxyde dismutase produisant un gain de fonction conduisant à la toxicité de la protéine.

Les acteurs cellulaires de cette maladie sont multiples. En effet, l'expression de la protéine mutée soit dans les motoneurones, les astrocytes ou la microglie est insuffisante pour engendrer la neurodégénérescence (Lobsiger and Cleveland 2007; Turner and Talbot 2008). Il semblerait que ces trois types cellulaires aient un rôle à jouer dans la pathogénèse de la maladie. D'après des études d'inhibition spécifique de la protéine mutante dans différents types cellulaires, l'expression de la protéine mutée dans les motoneurones est un facteur déterminant le début de la maladie mais a peu d'impact sur son évolution. Tandis que l'expression dans la microglie et les astrocytes a un impact important sur l'évolution (Lobsiger and Cleveland 2007). De plus, l'expression de la SOD1 mutée dans les astrocytes induit la mort des motoneurones par un facteur soluble (Nagai, Re et al. 2007).

Dans certains modèles transgéniques de cette maladie, il a été observé une diminution de GLT-1 (Bruijn, Becher et al. 1997). Récemment, le lien entre SOD1 et GLT-1 a été mis en évidence. L'activation de la SOD1 entrainerait l'activation de la caspase 3 qui induirait le clivage de la partie C-Terminale de GLT-1 (Boston-Howes, Gibb et al. 2006). La diminution de l'expression de GLT-1 est un des seuls liens qui existe entre les cas héréditaires et les cas sporadiques de la SLA.

De nombreuses études montrent l'implication du transporteur GLT-1 dans les cas sporadiques de cette maladie. En effet, la diminution de transport dans les régions touchées dans la SLA (moelle épinière et cortex moteur) est associée à une baisse d'expression de GLT-1 dans ces mêmes zones (baisse d'activité et d'expression de 33% environ) (Rothstein, Van Kammen et al. 1995). Ces déficits de transport du glutamate sont aussi observés dans des modèles rongeurs (Alexander, Deitch et al. 2000; Howland, Liu et al. 2002; Dunlop, Beal McIlvain et al. 2003). Les niveaux d'ARNm de GLT-1 ne sont pas différents entre patients et

individus contrôles mais le niveau de certains ARN variants issus d'un processus d'épissage altéré serait plus élevé. Ces variants pourraient altérer le bon fonctionnement de GLT-1 (Kalandadze, Wu et al. 2004; Lauriat, Richler et al. 2007). D'autre part, la perte de fonction de GLT-1 pourrait se faire sans modification du niveau d'ARNm par des mécanismes qui restent encore à confirmer (Trotti, Danbolt et al. 1998; Tortarolo, Crossthwaite et al. 2004; Boston-Howes, Gibb et al. 2006; Tian, Lai et al. 2007). La baisse du transport est-elle une conséquence de l'atteinte neuronale ? Une étude a montré que chez des modèles de rats transgéniques exprimant la SOD1 mutée, une baisse de l'expression de GLT-1 est observée avant toute dégénérescence (Howland, Liu et al. 2002). Les raisons de cette baisse de GLT-1 restent encore à éclaircir. Cependant, d'autres études montrent une baisse de GLT-1 après l'apparition de neurodégénérescence (Bruijn, Becher et al. 1997; Bendotti, Tortarolo et al. 2001).

L'implication des altérations du transporteur au glutamate GLT-1 dans la pathogénèse de la maladie reste encore à déterminer mais cette baisse de transport astrocytaire peut certainement rendre les motoneurones plus vulnérable à l'excitotoxicité.

2. La maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative autosomale dominante à l'issue fatale généralement après une évolution de la maladie après 15-20 ans. Les symptômes sont des altérations du mouvement (chorée, bradykinésie), des désordres psychiatriques et des déficits cognitifs de type frontaux. La mutation responsable de la maladie consiste en une expansion de triplet CAG codant pour la glutamine dans la partie N-terminale du gène de la huntingtine (htt). Elle est caractérisée par une dégénérescence préférentielle du striatum avec une perte massive des neurones de projection GABAergiques et une préservation relative des interneurones. La fonction de la htt est mal connue, elle pourrait avoir un rôle dans la transcription, le transport vésiculaire et la signalisation intracellulaire (Humbert and Saudou 2001; Borrell-Pages, Zala et al. 2006; Roze, Saudou et al. 2008). Cette pathologie est complexe et l'implication de perturbations métaboliques, oxydatives et glutamatergiques a été montrée (Browne and Beal 2006; Ross and Thompson 2006; Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008; Roze, Saudou et al. 2008).

Les mécanismes pathologiques reposent sur des interactions cellulaires altérées. En effet, chez des modèles de souris transgéniques, une dégénérescence est observée seulement

lorsque l'expression de la protéine mutante se fait dans plusieurs types neuronaux (neurones épineux du striatum et neurones pyramidaux du cortex) et gliaux (astrocytes, microglie) (Gu, Li et al. 2005; Gu, Andre et al. 2007; pour revue Lobsiger and Cleveland 2007).

Les patients présentent un hypométabolisme précoce (baisse de la consommation de glucose et d'oxygène) dans le striatum, la structure qui présente la perte neuronale la plus massive (Kuwert, Lange et al. 1990). Une altération du métabolisme du glucose causerait une diminution de la synthèse d'ATP et une génération de radicaux libres et donc des dommages oxydatifs (Browne and Beal 2006). De nombreux agents antioxydants ont des effets bénéfiques sur le phénotype des souris transgéniques.

De nombreuses altérations mitochondriales ont été étudiées (Browne and Beal 2006; Ross and Thompson 2006; Estrada Sanchez, Mejia-Toiber et al. 2008; Knott, Perkins et al. 2008; Pope, Land et al. 2008). Les patients présentent une baisse de l'activité striatale d'enzyme du cycle de Krebs et de la chaîne oxydative mitochondriale (complexe II-III/succinate déshydrogénase, SDH et complexe IV-cytochrome oxydase) (Browne and Beal 2004). La htt mutante, au contraire de la htt sauvage, s'associe avec la mitochondrie (Panov, Gutekunst et al. 2002). Cependant, cette perturbation du métabolisme oxydatif se ferait seulement après la perturbation du métabolisme glycolytique et les phénomènes de dégénérescence. En effet, les patients présentent une diminution de ce métabolisme à un stade précoce de la maladie sans diminution du métabolisme oxydatif (Powers, Videen et al. 2007). La glycolyse se faisant préférentiellement dans les astrocytes, ces données suggèrent l'implication de ces cellules gliales dans cette maladie.

D'autre part, la htt mutée peut augmenter l'activation des récepteurs NMDA via son interaction avec la protéine PSD-95 (Sun, Savanenin et al. 2001). Chez les patients, une diminution de l'ARNm de GLT-1 a été observée dans le striatum (Arzberger, Krampfl et al. 1997) ainsi que des déficits de recapture du glutamate (Hassel, Tessler et al. 2008). Ces altérations se retrouvent dans certains modèles de souris transgéniques. Cette diminution est observée avant toute neurodégénérescence et donc peut avoir un rôle dans la mort neuronale (Lievens, Woodman et al. 2001 ; Behrens, Franz et al. 2002). De plus, des agrégats de la protéine htt mutée existent dans les astrocytes et leur présence serait corrélée à une diminution de l'expression des transporteurs au glutamate. En outre, chez les souris R6/2, les astrocytes exprimant la htt mutée, présentant une diminution de GLT-1, augmentent la vulnérabilité neuronale alors que ceux n'exprimant pas cette protéine ont un pouvoir neuroprotecteur (Shin, Fang et al. 2005). D'autre part, les neurones de projection GABAergiques qui dégénèrent préférentiellement dans cette maladie reçoivent beaucoup d'afférences glutamatergiques. Ces

données sur la perturbation du système glutamatergiques pourrait expliquer la vulnérabilité de ces neurones vis-à-vis de l'excitotoxicité.

En conclusion, l'implication des astrocytes dans la pathogénèse de cette maladie reste encore à prouver. Cependant, il est clair que des interactions glutamatergiques et métaboliques entre neurones et astrocytes interviennent.

3. Les transporteurs au glutamate comme cibles thérapeutiques

Ces nombreuses données impliquant la diminution du transport glutamatergique dans les phénomènes d'excitotoxicité associés aux maladies neurodégénératives permettent de concevoir la possibilité d'utiliser l'augmentation du transport du glutamate comme une thérapeutique neuroprotectrice. Les quelques exemples ci-dessous donnent déjà une base solide à l'utilisation des transporteurs comme cible thérapeutique.

Les souris double transgéniques surexprimant GLT-1 et modèle de la SLA ont une durée de vie plus longue, des pertes neuronales moins importantes que les souris sans surexpression de GLT-1 (Guo, Lai et al. 2003, voir Sheldon and Robinson 2007). De même, les souris transgéniques surexprimant le transporteur GLT-1 présentent moins de lésions après administration d'acide kaïnique (voir Sheldon and Robinson 2007)

Un autre moyen d'augmenter l'expression des transporteurs est l'utilisation d'antibiotiques du type β-lactame. Ce type d'antibiotique augmente la transcription de GLT-1 via le facteur de transcription NFκB (Lee, Su et al. 2008) et également la traduction de l'ARNm de GLT-1 (Tian, Lai et al. 2007). L'injection du ceftriaxone augmente la survie et diminue la mort neuronale chez les souris modèles de la SLA (Rothstein, Patel et al. 2005). Il a été récemment montré que l'augmentation de l'expression de GLT-1 par la même molécule atténuait le phénotype des souris modèles de la maladie de Huntington (Miller, Dorner et al. 2008).

De plus, un ligand des récepteurs neuroimmunophilines, le GPI-1046, qui augmente sélectivement l'expression et l'activité de GLT-1, a un effet neuroprotecteur et augmente le taux de survie des souris modèles de la SLA (Ganel, Ho et al. 2006).

Le CNTF est une cytokine qui a démontré des effets neuroprotecteurs dans de nombreux modèles rongeurs et primates de la MH (Mittoux, Ouary et al. 2002; Bloch, Bachoud-Levi et al. 2004; Zala, Bensadoun et al. 2004; Emerich and Thanos 2006). Il a été récemment montré que la production de CNTF permet l'activation des astrocytes ainsi qu'une

redistribution des transporteurs au glutamate, hyperglycosylés, dans les rafts. Ceci accroît l'activité de ces transporteurs et permet une meilleure gestion du glutamate extracellulaire suite à une injection d'acide quinolinique. Le CNTF serait ainsi neuroprotecteur en partie grâce à l'augmentation du transport de glutamate (Escartin, Brouillet et al. 2006).

Cependant, augmenter l'expression des transporteurs pourrait avoir des effets délétères. En effet, le fonctionnement des transporteurs au glutamate s'inverse lorsque le gradient de Na^+/K^+ s'effondre à cause d'un manque d'énergie. Ceux-ci libèrent alors le glutamate dans la fente synaptique (Longuemare and Swanson 1995; Phillis, Ren et al. 2000; Campiani, Fattorusso et al. 2003) exacerbant les phénomènes d'excitotoxicité. Ce fonctionnement inverse serait principalement du à EAAC1 (Katsumori, Baldwin et al. 1999) et non à GLT-1 (Rossi, Oshima et al. 2000; Hamann, Rossi et al. 2002) qui y participerait de façon minime. Cependant, en condition de privation d'oxygène et de glucose, le TBOA, inhibiteur des transporteurs, a un effet protecteur en bloquant le fonctionnement inverse des transporteurs (Anderson, Bridges et al. 2001; Bonde, Sarup et al. 2003). Une étude a comparé les taux de glutamate extracellulaire ainsi que la mort neuronale chez les souris sauvages et les souris KO pour GLT-1 durant des conditions d'ischémie plus ou moins longue. Il en ressort que la recapture de glutamate dans les astrocytes par GLT-1 est neuroprotectrice au début de la privation ischémique (5 min). Au contraire, lorsque la privation se poursuit, les taux de glutamate extracellulaire augmentent à cause du fonctionnement inverse de GLT-1 ce qui exacerbe la neurotoxicité (Mitani and Tanaka 2003). De la même façon, la surexpression de GLT-1 dans des tranches d'hippocampe est neuroprotectrice seulement lors d'une ischémie modérée (Weller, Stone et al. 2008). Cependant, ces désavantages sont également à mettre en relation avec l'expression aberrante de GLT-1 dans les neurones lors de conditions ischémiques (Danbolt 2001) (Fukamachi, Furuta et al. 2001). Il semble donc qu'il existe un effet neuroprotecteur observé en condition normale mais en condition ischémique, le bénéfice des transporteurs reste à éclaircir.

Dans le contexte des maladies neurodégénératives, en condition non ischémique, les transporteurs astrocytaires GLAST et GLT-1 pourraient alors représenter des cibles thérapeutiques potentielles. Mieux connaître le fonctionnement et les conséquences de la surexpression des transporteurs en un point crucial dans cette optique.

III. Utilisation du transfert de gène dans l'étude des astrocytes

A. Le transfert de gène

1. Principe du transfert de gène

Le transfert de gène consiste à introduire un matériel génétique (sous forme d'ADN ou d'ARN) dans une cellule cible pour conduire à un effet physiologique souhaité (corriger un gène défectueux, inhiber ou stimuler la synthèse d'une protéine). La thérapie génique utilise ce transfert de gène pour compenser le gène dont l'altération est responsable de maladies ou apporter de nouvelles fonctions compensatrices. Deux stratégies sont envisagées pour introduire un gène thérapeutique (transgène) dans les cellules de l'individu : la thérapie génique *ex vivo* et la thérapie génique *in vivo*. La première méthode consiste en la greffe (préférentiellement l'autogreffe) de cellules génétiquement modifiées en culture. Le principe est de récupérer des cellules du malade à traiter, de les cultiver, et d'y transférer le gène thérapeutique. Ces cellules sont ensuite réintroduites chez le malade. La seconde approche est fondée sur l'introduction *in vivo* du gène thérapeutique dans la circulation sanguine, ou directement au sein du tissu cible, conférant ainsi directement aux cellules du malade la propriété de synthétiser le facteur thérapeutique. Le transfert de gène apparaît aujourd'hui comme une stratégie séduisante, non seulement pour le traitement de maladies génétiques mais aussi pour le traitement de maladies plus complexes ayant des composantes génétiques telles que le cancer, le diabète ou les maladies neurodégénératives ou encore pour l'étude des fonctions des gènes.

L'introduction d'un gène dans une cellule nécessite un vecteur. En effet, l'ADN est une molécule très fragile et facilement biodégradable. Le gène doit être associé à un système capable de le protéger des agressions du milieu biologique et de le véhiculer au travers des différentes barrières physiologiques vers son site d'action, le noyau de la cellule. Il existe différents types d'outils pour permettre le transfert de gène.

2. Les outils de transfert de gènes dans le système nerveux central

La présence de la barrière hématoencéphalique empêche les vecteurs d'accéder au système nerveux central (SNC). L'injection directe de vecteurs viraux dans le cerveau a été proposée pour atteindre les cellules cibles du SNC (Janson, McPhee et al. 2001; Kay, Glorioso et al. 2001; Davidson and Breakefield 2003).

Dans ce chapitre, nous présenterons les différents outils de transfert de gènes dans l'optique d'une utilisation pour le ciblage astrocytaire. Nous voulons pouvoir manipuler l'expression des gènes astrocytaires avec un outil permettant l'inhibition ou la surexpression à long terme d'un gène de façon localisée afin de pouvoir cibler une région spécifique. Cet outil devra être utilisable pour tout type de gène et permettre un ciblage astrocytaire efficace. Nous présenterons brièvement les différents outils disponibles et nous expliquerons notre choix d'un vecteur lentiviral.

Les vecteurs sont regroupés en deux catégories, les vecteurs non viraux et les vecteurs viraux.

a. Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux offrent une grande sécurité, (absence de protéine exogène susceptible d'induire une réponse immunitaire), peuvent être synthétisés plus aisément à grande échelle et permettent de transférer des séquences d'ADN de grande taille. De nombreux systèmes non-viraux ont été développés et font l'objet d'essais cliniques. Le transfert d'ADN nu est cependant peu efficace à cause de la dégradation rapide de l'ADN hors et à l'intérieur de la cellule (Kofler, Wiesenhofer et al. 1998). L'association de l'ADN avec des polymères lipidiques, forme des complexes chargés positivement, qui permettent de condenser l'ADN et de favoriser son passage à travers la membrane cellulaire (Hirko, Tang et al. 2003). De nouvelles techniques utilisent des liposomes couplés à des anticorps qui reconnaissent les récepteurs à la transferrine ou à l'insuline afin de passer la barrière hématoencéphalique (Pardridge 2002; Zhang and Pardridge 2005). Plusieurs études ont démontré l'intérêt et l'efficacité de ce système, notamment dans des modèles animaux des maladies de Parkinson (Zhang, Schlachetzki et al. 2004; Pardridge 2005), d'Alzheimer (Boado, Zhang et al. 2007) ou pour cibler la rétine (Zhang, Schlachetzki et al. 2003). Ces différentes études ont illustré la possibilité d'obtenir une expression uniquement au niveau cérébral sans expression ectopique du transgène, malgré l'injection systémique des particules. Ceci a été fait grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques d'une population particulière ou

l'utilisation de promoteurs spécifiques. Cependant, le fait qu'il n'y ait pas d'intégration de l'ADN ne permet pas une expression à long terme du transgène et nécessite des injections répétées ou continues augmentant les risques d'infections.

b. Les vecteurs viraux

La plus grande partie des approches de thérapie génique expérimentale et clinique est basée sur l'utilisation des vecteurs dérivés de virus. Un vecteur viral utilise les propriétés des virus d'introduire leur matériel génétique dans la cellule et de franchir les barrières de la cellule (la membrane plasmique, nucléaire) avec une grande efficacité. Les vecteurs viraux sont obtenus en remplaçant les séquences responsables de la réplication et les gènes codant pour les protéines virales par le gène thérapeutique (Figure 7). Quatre principaux types de vecteurs viraux sont utilisés à l'heure actuelle : les vecteurs dérivés des Adénovirus, des virus associés aux adénovirus (AAV), des virus de l'Herpès, et des rétrovirus, parmi lesquels les lentivirus (Figure 8 et Tableau 2).

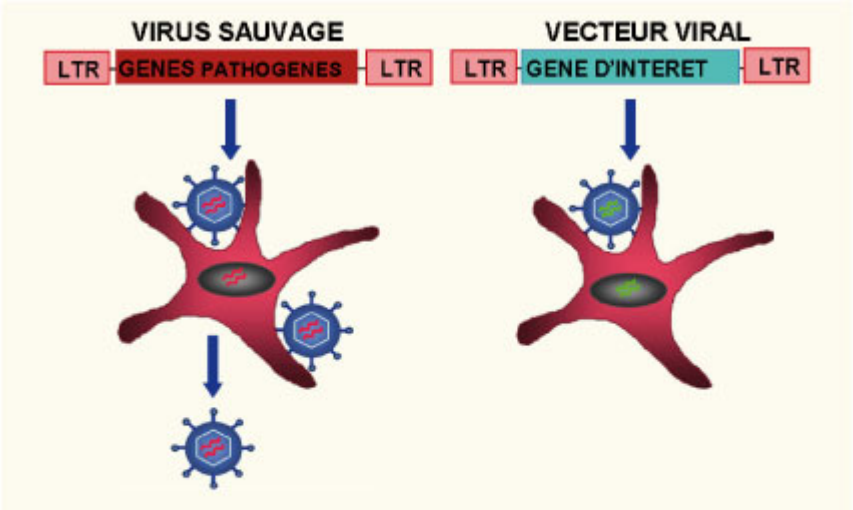


Figure 7: Utilisation d'un vecteur viral pour le transfert de gène. Un vecteur viral utilise la propriété des virus d'introduire leur matériel génétique efficacement dans la cellule. Les séquences responsables de la réplication et les gènes codant pour les protéines virales sont remplacés par le transgène.

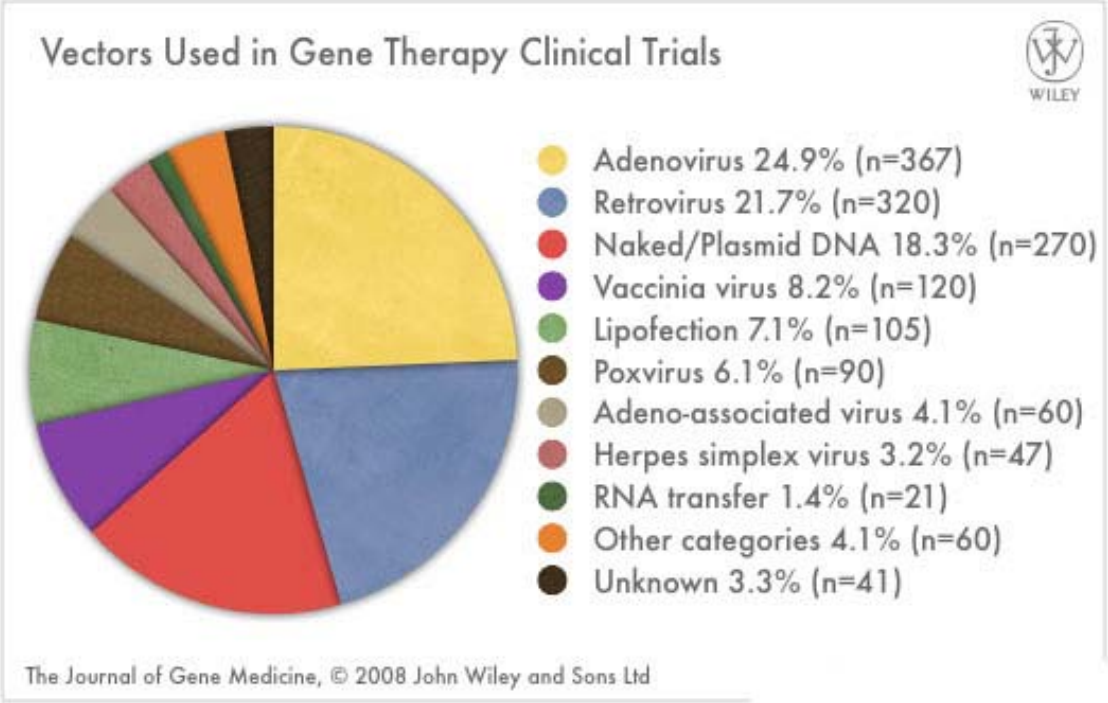


Figure 8 : Utilisation des différents types de vecteurs en essais cliniques de thérapie génique.

- Les vecteurs dérivés de l'Herpès virus (HSV)

Les vecteurs dérivés du virus de l'Herpès possèdent une capacité de clonage d'ADN double brin de 40 à 152 kb. Ceci permet de cloner la plupart des transgènes, y compris ceux de grande taille. Ils sont naturellement neurotropes, ont un potentiel inflammatoire et immunogène important et n'intègrent pas leur ADN dans le génome de l'hôte (Bowers, Olschowka et al. 2003). La réactivation du virus de l'Herpès latent chez 70 à 95 % de la population humaine représente néanmoins une limitation (Mammette 2002). A ce jour, aucune étude n'a démontré la possibilité de modifier le tropisme et donc de cibler les astrocytes

- Les vecteurs dérivés des adénovirus

Les vecteurs dérivés des adénovirus sont des vecteurs à ADN double brin ayant une capacité maximale de clonage d'environ 36 kb. Ce sont des virus dépourvus d'enveloppe donc le changement de tropisme est possible par l'utilisation de différents sérotypes ou la modification génétique de la capside (pour revue Noureddini and Curiel 2005). Mais ces changements restent complexes et aucune étude n'a été faite au niveau du cerveau. Il n'y pas intégration du vecteur, le génome viral reste épisomal, ce qui entraîne une expression

transitoire dans les cellules en division, mais une expression prolongée du transgène est tout de même observée dans les cellules quiescentes. Ces vecteurs ont un tropisme très large. Ils infectent les neurones et la glie (Le Gal La Salle, Robert et al. 1993; Do Thi, Saillour et al. 2004). Les vecteurs adénoviraux, notamment avec le promoteur CMV (cytomégalovirus) ont un tropisme préférentiellement glial (Kugler, Meyn et al. 2001; Sato, Shiraishi et al. 2004). Un ciblage astrocytaire efficace a été obtenu grâce à l'utilisation de promoteur spécifiquement astrocytaire (Miura, Tamura et al. 1990; Chen, Bezdek et al. 1998; Smith-Arica, Morelli et al. 2000; pour revue Castro, Hurtado-Lorenzo et al. 2001). Cependant, ces vecteurs sont immunogènes (Mitani, Graham et al. 1995; Wood, Charlton et al. 1996; Kajiwara, Byrnes et al. 1997; Kajiwara, Byrnes et al. 2000; Thomas, Schiedner et al. 2000) et ils ont un potentiel inflammatoire important (Alba, Bosch et al. 2005). Ils pourraient provoquer une activation astrocytaire qui serait elle-même à l'origine du tropisme glial de ces vecteurs, comme c'est le cas avec certains vecteurs AAV (Klein, Dayton et al. 2008).

- Les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAV)

Les virus AAV sont dérivés d'une famille non pathogène de parvovirus de petite taille (20 à 25 nm) non enveloppé et à ADN simple brin de 4.7 kb. Ces virus tirent leur nom du fait qu'ils ont besoin de l'aide d'un autre virus (adénovirus ou HSV) pour accomplir leur cycle complet de réplication (Hoggan, Blacklow et al. 1966; Lai and Brady 2002). Ces vecteurs ont un grand intérêt dans le cadre de la thérapie génique. En effet, ils présentent de nombreux avantages : une expression du transgène à long terme (plusieurs années), ils sont non pathogènes, peu immunogènes et peu toxiques (McCown, Xiao et al. 1996; Xiao, Li et al. 1997), ils transduisent très efficacement les cellules quiescentes ou en division dans de nombreuses régions du cerveau. La faible capacité de clonage, de 4.5 kb, constitue cependant une limitation. Elle restreint le type de promoteur et de transgène qui peuvent être utilisés. De plus, leur tropisme naturel est très défavorable aux astrocytes. Les AAV transduisent une majorité de neurones, proche de 95% pour les sérotypes 1, 2, 5, 7, 8, 9 et Rh 10 (Burger, Nash et al. 2005; Cearley and Wolfe 2006; Taymans, Vandenberghe et al. 2007; Cearley, Vandenberghe et al. 2008) (Paterna, Feldon et al. 2004). Cependant, certaines études ont utilisé des promoteurs spécifiques des astrocytes pour restreindre l'expression du transgène mais la faible proportion d'astrocytes transduits ne permet pas une efficacité d'infection importante (Peel and Klein 2000; Xu, Janson et al. 2001; Burger, Gorbatyuk et al. 2004;

Broekman, Comer et al. 2006). Il est donc primordial de choisir un vecteur qui permet d'entrer dans les cellules astrocytaires préférentiellement pour avoir une efficacité importante.

	HSV	**Adénovirus**	**AAV**	**Lentivirus**
Type de virus	ADN db	ADN db	ADN sb	ARN
Transduction des cellules quiescentes	OUI	OUI	OUI	OUI
Intégration	NON	NON	OUI/NON	OUI
Capacité de clonage maximale	152 kb	37 kb	4,5 kb	9 kb
Potentiel inflammatoire, immunogène	Fort	Fort	Faible	Faible
Modification du tropisme	Limitée	Limitée	Limitée	Aisée

Tableau 2 : Caractéristiques des différents vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gène dans le système nerveux central

- Les vecteurs dérivés des lentivirus

Les lentivirus font partie de la famille des rétrovirus. Ce sont des virus enveloppés à ARN possédant une capacité de clonage allant jusqu'à 9kb qui permet l'insertion de transgène et de promoteur de grande taille. Ils sont capables de transduire à la fois les cellules en division et post-mitotiques et permettent une expression à long terme du transgène (Naldini, Blomer et al. 1996; Blomer, Naldini et al. 1997; Deglon and Aebischer 2002; Regulier, Zala et al. 2004). Le fait que ces vecteurs viraux possèdent une enveloppe rend possible leur pseudotypage c'est-à-dire le changement d'enveloppe afin de moduler leur tropisme. L'utilisation de certaines enveloppes permet de transduire préférentiellement les astrocytes ou les neurones (Duisit, Conrath et al. 2002; Watson, Kobinger et al. 2002; Wong, Azzouz et al. 2004; Bemelmans, Bonnel et al. 2005; Balaggan, Binley et al. 2006; Wong, Goodhead et al. 2006; Pertusa, Garcia-Matas et al. 2008). D'autre part, contrairement aux HSV (Wood, Byrnes et al. 1994) et aux adénovirus (Wood, Charlton et al. 1996; Kajiwara, Byrnes et al.

1997; Kajiwara, Byrnes et al. 2000), leur injection dans le cerveau n'entraîne pas ou peu de réaction immunitaire ou inflammatoire (Blomer, Naldini et al. 1997; Abordo-Adesida, Follenzi et al. 2005). Ces vecteurs sont parmi les vecteurs viraux les plus efficaces et les plus flexibles (voir Tableau 2). Ces caractéristiques en font des outils très intéressants pour le ciblage astrocytaire, nous avons donc utilisé ces vecteurs dans mon travail de thèse.

Nous présenterons plus précisément dans le chapitre suivant leurs caractéristiques puis les stratégies permettant de modifier le tropisme des vecteurs lentiviraux afin d'infecter les astrocytes.

B. Les vecteurs lentiviraux

Les lentivirus appartiennent à la famille des rétrovirus qui se caractérise par un génome composé de deux molécules d'ARN. Les vecteurs lentiviraux utilisés dans notre laboratoire sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Le cycle d'infection par le VIH-1 sauvage est divisé en deux phases (Figure 9), contrairement à celui du vecteur qui n'a qu'une seule phase. Une phase pré-intégrative, qui débute par la reconnaissance de la cellule hôte, l'entrée du virus qui peut se faire par fusion des membranes plasmiques et virales, ou par endocytose de la particule puis fusion des membranes selon le type de l'enveloppe. Puis le virion subit une étape de décapsidation, l'ARN viral est rétrotranscrit, il y a import nucléaire du génome viral et enfin intégration de l'ADN proviral. La deuxième étape est la phase post-intégrative, qui débute par l'étape de transcription du provirus intégré, puis la traduction des protéines virales, l'assemblage et la maturation du virion et enfin par le bourgeonnement des particules virales. Au cours de cette phase, le virus détourne la machinerie de transcription, d'épissage, de transport et de traduction de la cellule pour effectuer sa propre réplication. La fin de cette étape est le bourgeonnement des nouveaux virions hors de la cellule (Figure 9). La production d'un vecteur lentiviral dérivé du VIH-1 consiste à supprimer la phase réplicative du virus (post-intégrative) et éliminer les gènes pathogènes afin de garantir la sécurité du système (pour revue Quinonez and Sutton 2002). La transduction de la cellule cible par le vecteur lentiviral consiste à reproduire la première phase pré-intégrative avec un vecteur de transfert contenant exclusivement le gène thérapeutique. Ces différentes étapes sont indépendantes de la synthèse de protéines virales, de sorte que la majeure partie du génome viral peut être délétée et remplacée par les séquences d'intérêt.

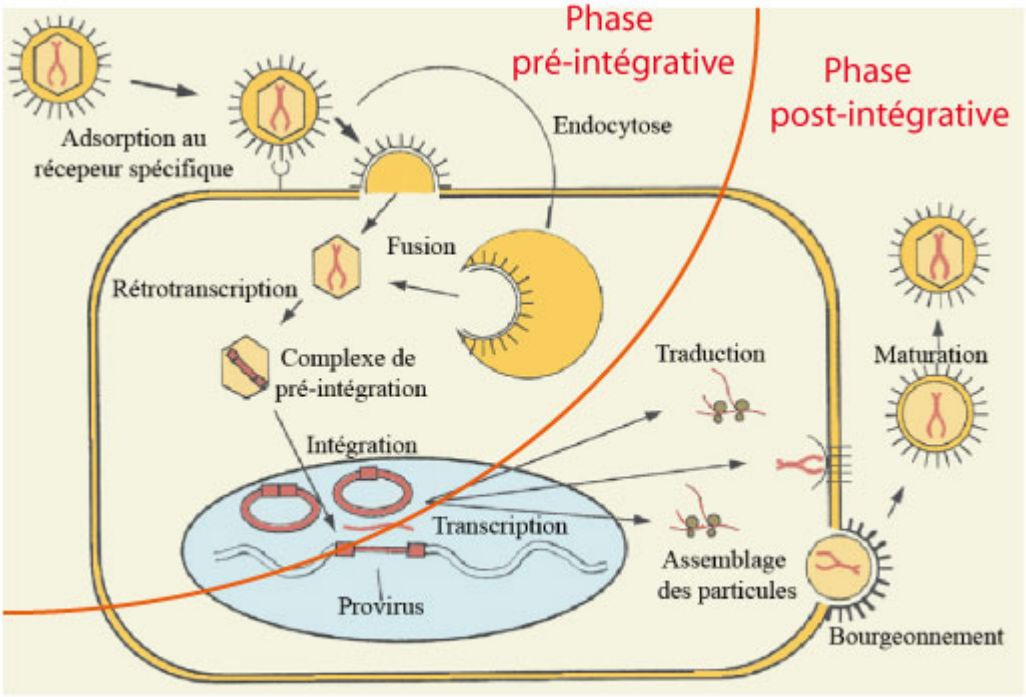


Figure 9 : Cycle réplicatif d'un lentivirus. Schéma du cycle réplicatif d'un lentivirus divisé en deux phases : la phase pré-intégrative et la phase post-intégrative.

Dans un premier temps nous allons décrire les différentes séquences nécessaires à l'obtention d'un vecteur lentiviral. Dans un deuxième temps nous allons décrire plus précisément les phases de production du vecteur lentiviral et de transduction de la cellule cible.

1. Les séquences nécessaires à l'obtention d'un vecteur lentiviral

Le VIH-1 possède quatre catégories de gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env*. Le groupe *gag* code les protéines de la matrice, la capside et la nucléocapside formant le core qui protège le génome viral (Figure 10). Le groupe *pro* code pour une protéase responsable du clivage des produits des gènes *gag* et *pol*. Le groupe *pol* code les deux enzymes nécessaires au cycle de réplication du virus : la rétrotranscriptase qui permet de convertir le génome ARN en ADN, et l'intégrase nécessaire à l'intégration du génome proviral dans le génome de la cellule hôte. Enfin, le groupe *env* code les protéines de l'enveloppe essentielles à la liaison du virus à la cellule et son entrée dans la cellule hôte. Il code deux sous-unités protéiques de l'enveloppe : une sous-unité formant la glycoprotéine de surface externe et une sous-unité transmembranaire, composant interne de la glycoprotéine de l'enveloppe. La glycoprotéine de surface est nécessaire pour la liaison aux récepteurs cellulaires, alors que la glycoprotéine

transmembranaire est responsable de la fusion avec la membrane cellulaire (Coffin 1996). Ces gènes sont nécessaires à la production du vecteur lentiviral pour former les particules virales.

En plus des gènes de structure, les lentivirus contiennent également des gènes accessoires et de régulation nécessaires à l'expression des gènes viraux, à l'assemblage des particules virales et aux pouvoirs pathogènes des virus. Le VIH se caractérise par la présence de plusieurs gènes accessoires : *vif, vpr, vpu, nef, tat* et *rev*. Les protéines Tat et Rev sont importantes pour une production efficace des particules virales. La protéine Tat fonctionne comme un activateur transcriptionnel en augmentant la transcription des gènes viraux. La protéine Rev est un activateur post-transcriptionnel qui permet l'export nucléaire de l'ARN viral non épissé en se fixant à une région indispensable : le RRE (Rev responsive element) situé au niveau des ARNm. Cet export permet de passer de la production des transcrits précoces (Tat, Rev) à la production de transcrits permettant l'expression des protéines de structure.

Les extrémités du génome viral sont composées de séquences non codantes qui sont très importantes au cycle de réplication du virus. La séquence R est une séquence répétée à chaque extrémité du génome, indispensable à la rétrotranscription qui contient le signal de polyadénylation. La séquence U3 contient une séquence *att*, nécessaire à l'intégration du provirus dans l'ADN de la cellule. La séquence U3 contient également le promoteur viral. Ces trois séquences se répètent et forment le LTR (Long Terminal Repeat) (Figure 10).
D'autres séquences sont également importantes : le site de fixation de la première amorce de la transcription inverse (PBS), les signaux spécifiques pour l'encapsidation du génome viral dans le virion, la séquence Ψ. La séquence cPPT (central Polypurine Tract) est une séquence riche en A/G, nécessaire à la synthèse du brin positif d'ADN durant la rétrotranscription et à l'import nucléaire de l'ADN viral (Arhel, Souquere-Besse et al. 2007). L'incorporation de cette séquence cPPT, dans des conditions de transduction limitées, améliorerait l'efficacité de transduction (Zennou, Serguera et al. 2001).

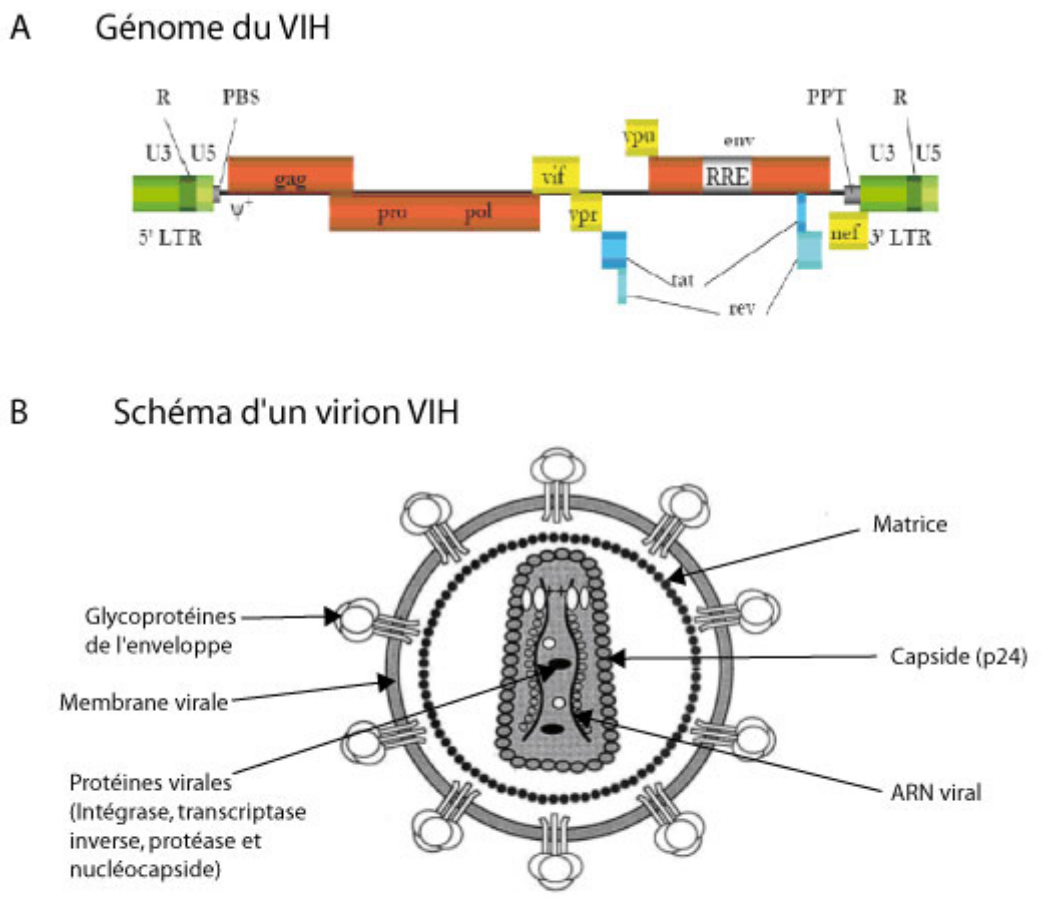


Figure 10: Schéma du génome et d'un virion du VIH.
A: Schéma du génome du VIH avec les gènes gag, pro, et pol codant pour les protéines de strucrures et les enzymes virales; le long Terminal Repeat (LTR); le gène de l'enveloppe env et les gènes accessoires vif, vpr, vpu, nef, tat et rev.
B: Schéma d'un virion du VIH.

2. La production virale

Le développement d'outils de transfert de gène à partir du VIH-1 consiste à ne conserver que la phase d'intégration du provirus dans le génome et à supprimer la phase post-intégrative. Il est important de faire la différence entre les séquences en cis, c'est-à dire les séquences qu'il faut retrouver dans les particules virales et qui vont permettre la phase pré-intégrative conduisant à l'expression du transgène dans la cellule hôte, et les séquences en trans, c'est-à-dire les éléments indispensables à la production des particules virales. Ces éléments sont les gènes viraux permettant l'expression des protéines de structures, des enzymes et la formation de nouveaux virions.

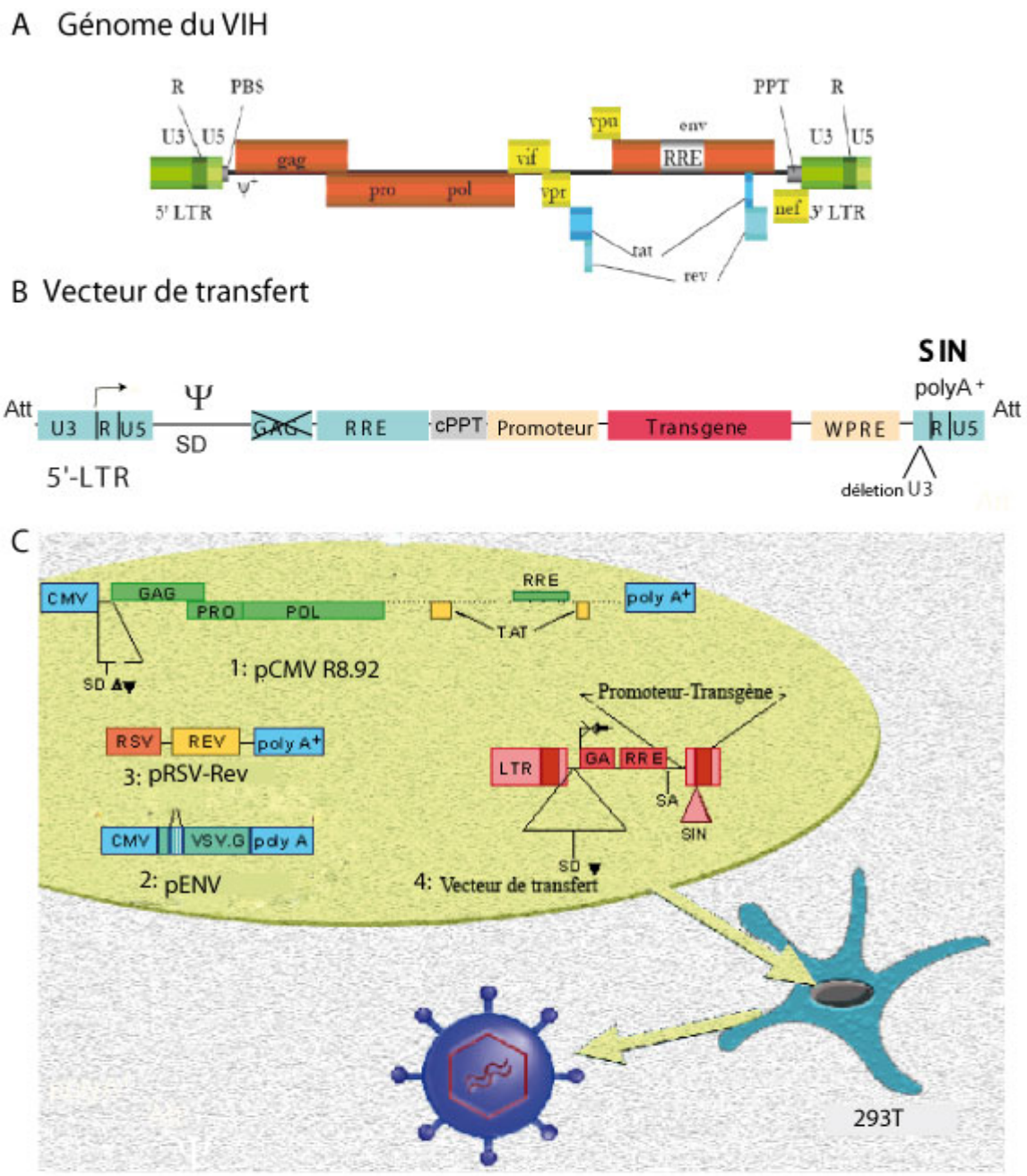


Figure 11: Production virale. A : Schéma du génome du VIH avec les gènes gag, pro, et pol codant pour les protéines de structrure et les enzymes virales; le long Terminal Repeat (LTR); le gène de l'enveloppe env et les gènes accessoires vif, vpr, vpu, nef, tat et rev. B: Schéma d'un vecteur de transfert où tout les gènes pathogènes ont été délétés, seulement ce qui est nécessaire à la transduction de la cellule cible de façon non réplicative est gardé; il contient le promoteur et le transgène d'intérêt. C: Schéma de la production virale: transfection transitoire de quatres plasmides: pCMV R8.92 ; pENV; pRSV-Rev ; plasmide de transfert.

Il existe deux façons de produire des vecteurs lentiviraux, une transfection transitoire dans des cellules productrices ou l'établissement de lignées cellulaires permettant une production stable des particules virales. La protéine VSV-G de l'enveloppe étant toxique pour les cellules, la plupart des laboratoires utilisent, une transfection transitoire dans des cellules 293T. Ces cellules se transfectent avec une haute efficacité et permettent d'obtenir des vecteurs ayant un titre élevé, c'est-à-dire une concentration de particules infectieuses élevée (Figure 11). Dans notre laboratoire, les gènes apportés en trans et en cis sont séparés en quatre plasmides. Cette séparation des gènes nécessaires en plusieurs plasmides permet de produire de vecteurs non réplicatifs et de diminuer les probabilités de recombinaison ayant pour produit un virus réplicatif.

- Le premier plasmide nommé pCMV R8.92 est le plasmide qui code tous les gènes viraux nécessaires à la production d'une particule virale fonctionnelle, c'est-à-dire : les gènes de structure et d'enzymes gag, pro, pol ainsi que le gène Tat. Ce plasmide, une fois transfecté, va permettre l'expression des protéines de la matrice, la capside, la nucléocapside, la rétrotranscriptase, l'intégrase et des protéases responsables du clivage de ces protéines. Ce plasmide ne contient que ces gènes provenant du virus sauvage, les parties flanquantes ont été délétées et remplacées par un promoteur CMV permettant l'expression de ces gènes et un site de polyadénylation en 3' pour favoriser la transcription. Ces délétions permettent d'éviter leur rétrotranscription ce qui permet une plus grande sécurité. La séquence Ψ a été délétée pour éviter l'encapsidation de ces ARN viraux.

- Le deuxième plasmide est le plasmide d'enveloppe dans lequel les gènes codant les protéines d'enveloppe du VIH-1 sont remplacés par des gènes hétérologues, c'est le pseudotypage. Nous parlerons plus précisément des enveloppes utilisées dans le chapitre pseudotypage.

- Le troisième plasmide pRSV-Rev code pour la protéine Rev qui permet le transfert des transcrits partiellement ou non-épissés dans le cytosol. Ce gène est sous contrôle du promoteur RSV (rous sarcoma virus).

- Enfin le quatrième plasmide est le plasmide de transfert. C'est le plasmide permettant la production de l'ARN viral et donc du transgène d'intérêt. Il contient le gène d'intérêt sous contrôle du promoteur choisi. Il contient également la séquence Ψ permettant l'encapsidation dans les particules virales, les séquences RRE pour l'export des génomes ARN sur lesquelles se fixe la protéine Rev, la séquence PBS pour l'amorce de la rétrotranscription, cPPT pour

l'amélioration de la rétrotranscription. Les séquences LTR flanquent le plasmide pour la rétrotranscription et les séquences *att* nécessaires à l'intégration du provirus.
Afin d'augmenter la biosécurité de ces vecteurs, la région U3 du 3'LTR contenant le promoteur viral a été délétée. Lors de la rétrotranscription dans les cellules cibles, cette délétion est reportée en 5' inactivant les deux promoteurs. Ces vecteurs sont appelés SIN (self-inactivating).

Une fois ces plasmides transfectés. Les différents ARN sont synthétisés, les protéines virales sont produites. Les particules nucléoprotéiques comprenant la matrice, la capside et les autres enzymes comme la rétrotranscriptase et l'intégrase sont exprimées. Le génome ARN est encapsidé, puis il y a bourgeonnement des particules hors de la cellule.

3. Transduction de la cellule cible par le vecteur lentiviral

La reconnaissance, l'intégration dans la cellule hôte et la décapsidation des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec une enveloppe hétérologue suivent probablement le schéma pré-intégratif du virus dont l'enveloppe a été utilisée (Aiken 1997). En revanche, la rétrotranscription, l'import nucléaire et l'intégration de l'ADN proviral suivent probablement le schéma pré-intégratif du VIH-1. L'entrée du vecteur dans la cellule débute par l'interaction entre les protéines de l'enveloppe et des protéines situées sur la membrane de la cellule cible. Cette interaction est spécifique et peut donc permettre un changement de tropisme selon le pseudotype. Selon le type d'enveloppe utilisé, l'entrée dans la cellule se fait par des voies différentes : l'endocytose de la particule virale ou la fusion des membranes virales et cellulaires. La famille des Rhabdovirus est particulièrement utilisée pour le pseudotypage des vecteurs lentiviraux. Ces virus entrent dans la cellule par la voie de l'endocytose. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) fait partie de cette famille, ainsi que les virus de la rage Rabies et Mokola. La protéine G du virus VSV est une des enveloppes les plus utilisées. Nous l'avons choisie comme enveloppe de référence. Nous allons prendre l'exemple du VSV pour expliquer le processus. Le vecteur adhère à la membrane de la cellule cible par la reconnaissance de la glycoprotéine G et d'un récepteur cellulaire, ce qui induit l'endocytose de la particule virale. Le récepteur du VSV n'est pas connu actuellement avec certitude. Pendant longtemps, le seul récepteur proposé était la phosphatidylsérine (Schlegel, Tralka et al. 1983). Toutefois, une étude récente vient de montrer que la phosphatidylsérine n'est pas le récepteur de surface cellulaire du VSV, mais que ce lipide pourrait être impliqué dans les phases précoces d'entrée du virus dans la cellule (Coil and Miller 2004). La clathrine serait

également impliquée dans le processus d'endocytose des particules virales (Sun, Yau et al. 2005). L'abaissement du pH dans le compartiment endosomal induit un changement conformationnel de la glycoprotéine G, ce qui déclenche le processus de fusion membranaire entre les membranes virales et endosomales, libérant ainsi le génome viral encapsidé dans le cytoplasme (Rolls, Webster et al. 1994). Le déroulement des étapes qui suivent reste encore débattu. Certains auteurs pensent que le vecteur subit, une fois libéré dans le cytosol, une étape de décapsidation où les protéines de la capside se dissocient et le complexe nucléoprotéique est libéré dans le cytosol puis l'ARN simple brin serait rétrotranscrit en ADN double brin grâce à la rétrotranscriptase (Goldschmidt and Marquet 2004). Le produit final de la rétrotranscription est une molécule d'ADN double brin linéaire qui serait ensuite transportée dans le noyau (pour revue Bukrinsky, Sharova et al. 1993; Fassati and Goff 2001; Sherman and Greene 2002). Cependant, le déroulement de ces étapes a été récemment revisité. Il semblerait que le génome viral encore encapsidé puisse être transporté jusqu'aux pores nucléaires, subir la rétrotranscription et ensuite seulement la décapsidation puis l'import dans le noyau (Arhel, Souquere-Besse et al. 2007). Une fois dans le noyau, le provirus existe sous 3 formes : sous forme circulaire à un ou deux LTR, qui ne s'intègre pas et dont le rôle n'est pas encore élucidé, ou sous forme linéaire qui s'intègre dans le génome de la cellule. L'intégrase virale reconnaît spécifiquement des séquences de 5 à 10 nucléotides appelées att, situées aux extrémités des deux LTR du génome viral. A chaque extrémité 3', l'intégrase clive l'ADN proviral afin de faire apparaître deux nucléotides CA porteur d'un groupement hydroxyle. Puis, cette enzyme clive l'ADN génomique de la cellule, et ligue chacune des extrémités 3' hydroxyle de l'ADN viral aux extrémités 5'-phosphate de l'ADN cellulaire. Le nombre et les sites d'intégration du provirus sont multiples. Pendant longtemps, l'intégration du provirus dans l'ADN de la cellule a été qualifiée d'aléatoire mais il a été rapporté des sites préférentiels d'intégration ou « hotspot » dans des loci actifs du génome cellulaire (Schroder 2002) et une préférence d'intégration dans des régions transcriptionnellement actives (Berry, Hannenhalli et al. 2006).

C. L'étude des astrocytes *in vivo* grâce aux vecteurs lentiviraux

Dans le cadre de l'étude approfondie des fonctions astrocytaires *in vivo* ou d'une thérapie génique astrocytaire, il est très important de pouvoir cibler spécifiquement les astrocytes afin de pouvoir moduler l'expression d'un gène uniquement dans ces cellules. En effet, l'expression par les neurones de protéines astrocytaires peut avoir des effets délétères.

Ainsi, la surexpression de GLT-1 par un vecteur AAV dans les neurones entraine une augmentation des dommages neuronaux liés à l'exposition de glutamate (Selkirk, Stiefel et al. 2005).

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour modifier le tropisme d'un vecteur : 1) l'utilisation d'enveloppes facilitant l'entrée du vecteur dans les astrocytes ; 2) une fois le vecteur dans la cellule cible, il est possible de restreindre la transcription du transgène en utilisant des promoteurs spécifiques des astrocytes ; 3) l'insertion dans le vecteur d'éléments de régulation post-transcriptionnelle, permet de restreindre l'expression du transgène dans les cellules cibles.

1. Pseudotypage

Les lentivirus sont des virus enveloppés, il est donc aisé, de modifier leur tropisme en les pseudotypant, c'est-à-dire en les produisant avec une enveloppe différente de leur enveloppe originale (voir Bartosch and Cosset 2004 pour revue). L'interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe du vecteur et les récepteurs situés à la membrane de la cellule cible est un des facteurs essentiels influençant le tropisme d'un vecteur. Ces récepteurs peuvent être exprimés par des populations cellulaires spécifiques. C'est ainsi qu'en changeant l'enveloppe, le tropisme peut être modifié.

Une des enveloppes les plus utilisées aujourd'hui est la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) de la famille des Rhabdovirus. Cette enveloppe est très utilisée car elle a un large tropisme et permet de conférer une stabilité aux particules virales permettant ainsi leur concentration par ultracentrifugation (Burns, Friedmann et al. 1993 ; Yee, Friedmann et al. 1994 ; Bartz and Vodicka 1997). Cette enveloppe permet une efficacité d'infection importante sans réaction inflammatoire significative (Naldini, Blomer et al. 1996; Wong, Azzouz et al. 2004). Dans le cerveau, elle possède un tropisme neuronal (Naldini, Blomer et al. 1996; Blomer, Naldini et al. 1997; Mazarakis, Azzouz et al. 2001) (Kordower, Bloch et al. 1999; Deglon, Tseng et al. 2000; de Almeida, Zala et al. 2001; Kang, Stein et al. 2002) et ne transduit qu'une faible proportion d'astrocytes. Le pseudotypage avec la protéine VSV-G est une référence pour les vecteurs lentiviraux, car il est associé à une haute efficacité de transduction et facilite la concentration des particules virales. C'est pourquoi nous l'avons utilisé comme vecteur de référence pour mon travail de thèse.

Une multitude d'autres enveloppes ont été utilisées pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux (Duisit, Conrath et al. 2002; Watson, Kobinger et al. 2002; Wong, Azzouz et al.

2004; Bemelmans, Bonnel et al. 2005; Balaggan, Binley et al. 2006; Wong, Goodhead et al. 2006; Pertusa, Garcia-Matas et al. 2008). La famille des Rhabdovirus contient un genre appelé les Lyssavirus qui est particulièrement utilisé pour le pseudotypage des vecteurs lentiviraux. Les Lyssavirus comprennent le virus de la rage, Rabies, et ceux apparentés à la rage comme le virus Mokola. Nous allons évoquer quelques uns des pseudotypes les plus intéressants pour le ciblage astrocytaire.

Alors que le vecteur VIH-1 pseudotypé avec l'enveloppe VSV a un très fort tropisme neuronal dans le cerveau, l'enveloppe du virus de la rage (Rabies) permet la transduction préférentielle de la glie chez la souris (Kato, Inoue et al. 2007; Liehl, Hlavaty et al. 2007) lorsqu'il est employé avec un vecteur dérivé du VIH ou du VIS (virus de l'immunodéficience simienne) et serait préférentiellement neuronal chez le rat avec le VAIE (virus de l'anémie infectieuse équine) (Mazarakis, Azzouz et al. 2001; Wong, Azzouz et al. 2004). Ces résultats, parfois contradictoires, suggèrent que le tropisme varie en fonction des espèces, des vecteurs utilisés, et des régions du SNC ciblées. Il serait intéressant d'étudier cela dans des conditions comparables.

Une autre enveloppe est intéressante, l'enveloppe du virus rabique Mokola. Quelques études montrent que son tropisme est préférentiellement glial chez la souris et le rat (Watson, Kobinger et al. 2002; Pertusa, Garcia-Matas et al. 2008). Cependant, aucune étude quantitative n'a été réalisée et aucune donnée n'est disponible concernant une spécificité d'espèce ou en fonction des régions ciblées dans le cerveau. Une autre étude montre un tropisme préférentiellement neuronal chez le rat (Desmaris, Bosch et al. 2001). Une étude plus précise du tropisme de cette enveloppe pourrait éclaircir ces résultats contradictoires. Cette enveloppe pourrait être un outil intéressant pour le transfert de gène dans les astrocytes.

Une alternative aux enveloppes des Rhabdovirus est celles des Alphavirus. Ce sont des virus à enveloppe à ARN lytique qui peuvent être utilisés pour le pseudotypage des vecteurs lentiviraux. Une enveloppe de ce type est particulièrement intéressante, l'enveloppe du virus de la rivière Ross (RRV). Des études montrent que cette enveloppe permet un tropisme préférentiellement glial (Kang, Stein et al. 2002; Liehl, Hlavaty et al. 2007) lorsqu'elle est utilisée avec un vecteur dérivé du VIF (virus de l'immunodéficience féline) chez la souris, alors que d'autres montrent un tropisme neuronal avec un vecteur dérivé du VIH chez le rat (Jakobsson, Nielsen et al. 2006). Comme pour l'enveloppe Rabies ou Mokola, ces résultats reflètent probablement des conditions expérimentales différentes. D'une part, ces expériences utilisent plusieurs types de vecteurs lentiviraux. Or le tropisme d'une enveloppe peut-être modifié par le type de lentivirus utilisés : VIH, VIAE, VIS ou VIF. Il a été montré

que les vecteurs dérivés du VIH avaient un tropisme plus neuronal que les vecteurs dérivés du VIS (Kitagawa, Miyachi et al. 2007). D'autre part, ces expériences se sont faites chez des espèces différentes.

Au-delà de la substitution d'enveloppe, il est également possible de générer des glycoprotéines chimériques en combinant des éléments (domaines transmembranaires et cytoplasmiques) de différentes natures, naturelles ou chimériques, afin d'augmenter la stabilité de la glycoprotéine et l'efficacité de transduction des particules ou d'en modifier le tropisme original (voir Bartosch and Cosset 2004 ; Waehler, Russell et al. 2007 pour revue). Par exemple, la fusion avec des fragments d'anticorps reconnaissant certains antigènes particuliers, permet d'orienter les particules vers des récepteurs membranaires et ainsi de cibler très spécifiquement, par exemple, des cellules tumorales (Chowdhury, Chester et al. 2004) ou certaines cellules hématopoïétiques (Maurice, Verhoeyen et al. 2002). Une des particularités intéressantes des enveloppes des Alphavirus est que leur protéine de fusion est indépendante de leur protéine de fixation au récepteur. Ainsi, il est possible de pseudotyper des vecteurs avec une enveloppe hétérologue en changeant la protéine réceptrice sans changer la protéine de fusion. Il devient alors possible de manipuler le tropisme sans avoir d'impact sur l'efficacité de transduction. Plusieurs études ont développé un système de ciblage de population cellulaire en exposant sur l'enveloppe du vecteur un anticorps spécifique à un récepteur d'une population cellulaire. Cet anticorps va se fixer spécifiquement à une population puis l'entrée dans la cellule s'opère de façon indépendante et efficace (Morizono, Bristol et al. 2001 ; Aires da Silva, Costa et al. 2005; Yang, Bailey et al. 2006; Joo and Wang 2008). Ce système semble très prometteur et efficace.

En conclusion, le pseudotypage des lentivirus peut permettre un changement de tropisme intéressant. Cependant, les récepteurs des glycoprotéines virales sont pour la plupart non identifiés ou plusieurs récepteurs peuvent interagir. Il est donc difficile de prédire le tropisme d'une enveloppe.

2. Changement de promoteur

La plupart des vecteurs lentiviraux développés au cours de ces dernières années possèdent des promoteurs ubiquitaires forts afin de maximiser le taux d'expression du transgène dans tous les types cellulaires, alors que de nombreux promoteurs tissus-spécifiques sont associés à une faible expression du transgène. Parmi les promoteurs ubiquitaires se trouvent le promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK), fortement exprimé dans toutes

les cellules et le promoteur du cytomégalovirus (CMV). Si ce promoteur CMV est considéré comme ubiquitaire, de plus en plus de publications montrent que son activité est variable selon le type cellulaire. En effet, un vecteur lentiviral pseudotypé avec VSV et ayant pour promoteur CMV transduit majoritairement des astrocytes lorsqu'il est injecté dans la moelle épinière (Pezet, Krzyzanowska et al. 2006; Meunier, Mauborgne et al. 2008) alors qu'il a un tropisme neuronal dans le cerveau notamment le striatum (Naldini, Blomer et al. 1996; Blomer, Naldini et al. 1997; Watson, Kobinger et al. 2002; Wong, Azzouz et al. 2004; Jakobsson and Lundberg 2006). Cette spécificité gliale est potentiellement due à l'activité du CMV qui peut être réprimée fortement dans certaines populations de neurones (Smith, Traul et al. 2000; Jakobsson and Lundberg 2006) et notamment ceux de la moelle épinière (Allen, Dosanjh et al. 2006). L'origine de cette variabilité n'est pas claire mais il semblerait que l'activité du promoteur CMV des neurones soit inhibée par les astrocytes environnants (Sarkis, Serguera et al. 2000; Kugler, Meyn et al. 2001), peut-être par la sécrétion de cytokines (Brooks, Harkins et al. 2004).

L'utilisation de promoteurs spécifiques permet de restreindre l'expression du transgène aux cellules cibles. Plusieurs protéines sont exprimées spécifiquement dans les astrocytes dans le SNC, notamment GFAP (Brenner, Kisseberth et al. 1994), GLAST (Chaudhry, Lehre et al. 1995), GLT-1 (Furuta, Rothstein et al. 1997), la glutamine synthétase (Sonnewald, Westergaard et al. 1993), les connexines 30 et 43 (Rash, Yasumura et al. 2001; Rash, Yasumura et al. 2001), l'aquaporine 4 (Rash, Yasumura et al. 1998) ou encore S100β (Ogata and Kosaka 2002). L'utilisation des promoteurs de protéines spécifiques des astrocytes est un moyen très utilisé pour obtenir une expression spécifique d'un transgène. Un des promoteurs astrocytaires le plus utilisé est le promoteur GFAP. Il a été identifié en 1994. Depuis de nombreuses études utilisent ce promoteur pour exprimer des protéines spécifiquement dans les astrocytes. L'utilisation de ce promoteur s'est fait en combinaison avec différents types de vecteurs : des AAV (Feng, Eide et al. 2004; Weller, Stone et al. 2008) ; des baculovirus (Wang and Wang 2006) ; des adénovirus (Miura, Tamura et al. 1990; Chen, Bezdek et al. 1998; Morelli, Larregina et al. 1999; Smith-Arica, Morelli et al. 2000) et bien sûr les lentivirus (Jakobsson, Ericson et al. 2003; Jakobsson, Georgievska et al. 2004; Jakobsson and Lundberg 2006; Greenberg, Geller et al. 2007; Liu, Paton et al. 2008). Récemment, une région permettant la spécificité de ce promoteur a été identifiée. Cette séquence permettrait d'inhiber l'expression dans les neurones via le facteur NF-κB. Cette séquence serait commune à plusieurs promoteurs astrocytaires comme le promoteur de la protéine S100β, la vimentine ou encore l'aquaporine 4 (Lee, Messing et al. 2008).

Avec l'enveloppe VSV ou RRV, le promoteur permet une expression du transgène relativement spécifique des astrocytes (Jakobsson, Ericson et al. 2003; Jakobsson, Georgievska et al. 2004; Greenberg, Geller et al. 2007). Cependant, ces études montrent un nombre très faible d'astrocytes exprimant le transgène. En effet ces enveloppes transduisent préférentiellement les neurones dans ces expériences et bien que le promoteur GFAP puisse permettre l'expression du transgène seulement dans les astrocytes, il n'y a pas assez d'astrocytes infectés par le vecteur pour avoir une efficacité de transduction importante. De plus, la transduction importante des neurones peut provoquer une perte de spécificité du promoteur qui n'arrive plus à restreindre l'expression du transgène dans ces cellules (Xu, Janson et al. 2001).

L'expression du transgène peut être influencée par différents facteurs. L'intégration du transgène dans des sites transcriptionnellement actifs peut être un biais à l'expression spécifique et les promoteurs ou enhancers (séquence qui stimule la transcription) environnants peuvent diminuer la spécificité du promoteur (Lai, Han et al. 2002; Cucchiarini, Ren et al. 2003; Harrop, Poulsen et al. 2004). Chez les souris transgéniques, l'utilisation du promoteur GFAP peut conduire à une expression dans un grand nombre de neurones (Su, Hu et al. 2004). Lorsque le promoteur GFAP est utilisé avec le transgène GDNF, le transgène est exprimé par de nombreux neurones (Jakobsson, Georgievska et al. 2004). D'autres promoteurs perdent leur spécificité après intégration dans des vecteurs viraux, comme le promoteur NSE (Neuron Spécific Enolase) (Roemer, Johnson et al. 1995).

Pour éviter les effets liés au site d'intégration, il est possible d'utiliser des séquences insulatrices. Elles agissent par modification de la structure chromatinienne et peuvent former une barrière à la propagation des effets transcriptionnels (Emery, Yannaki et al. 2000). Cette action protège le provirus des effets de l'environnement chromosomique mais elle protège également l'environnement chromosomique du provirus d'éventuels effets activateurs (Labrador and Corces 2002). D'autre part, la perte de spécificité pourrait également être expliquée par le fait que la protéine GFAP pourrait être régulée non seulement par son promoteur mais aussi par des séquences régulatrices au niveau du gène lui-même, dans les introns (Sarkar and Cowan 1991; Kaneko and Sueoka 1993).

Un autre point à considérer est le fait que les astrocytes sont hétérogènes. En effet, l'expression de GFAP, des canaux ioniques, des jonctions gap et d'autres protéines ayant un impact sur la fonction de la cellule est différent selon les types d'astrocytes (D'Ambrosio, Wenzel et al. 1998; Gensert and Goldman 2001; Zhang 2001; Amateau and McCarthy 2002; Bushong, Martone et al. 2002; Ogata and Kosaka 2002; Zerlin, Milosevic et al. 2004;

Colodner, Montana et al. 2005 ; Kimelberg 2004 ; Regan, Huang et al. 2007). Le choix d'un des promoteurs spécifique des astrocytes restreindra l'expression du transgène seulement à une sous-population d'astrocytes.

L'expression du transgène via des promoteurs spécifiques entraîne souvent une expression faible du transgène (Morelli, Larregina et al. 1999; Biglari, Bataille et al. 2004). Pour améliorer cette expression, le promoteur spécifique peut-être fusionné avec un enhancer d'un promoteur fort comme le promoteur CMV, ce qui permet d'augmenter l'efficacité d'expression (Liu, Wang et al. 2004; de Leeuw, Su et al. 2006; Wang and Wang 2006). Il est également possible d'induire l'expression d'un facteur de transcription qui augmente l'expression de façon cellule-spécifique (Nettelbeck, Jerome et al. 1998; Iyer, Wu et al. 2001; Liu, Yang et al. 2006). D'autres proposent d'intégrer deux copies du promoteur au vecteur pour améliorer son expression (Liu, Paton et al. 2008). Ces différentes techniques permettent d'obtenir une expression astrocytaire plus importante du transgène.

Ces résultats suggèrent qu'un ciblage astrocytaire efficace est dépendant de nombreux facteurs. Afin d'optimiser ce ciblage, il serait utile de combiner le pseudotypage à un promoteur spécifique des astrocytes.

3. Régulation post-transcriptionnelle : Les microARN (miR)

A côté du fait de pouvoir faciliter l'entrée dans un type cellulaire grâce au pseudotypage ou permettre la transcription du transgène via un promoteur spécifique du type cellulaire, il est possible de réguler au niveau posttranscriptionnel l'expression du transgène. Les microARN (miR) ont été utilisés récemment pour obtenir une expression tissu-spécifique d'un transgène (Brown, Gentner et al. 2007). Les miR ont une expression spécifique selon les tissus. Ils se fixent à leur séquence cible située dans la partie 3' non traduite de l'ARNm et permettent l'inhibition de l'expression du gène ciblé de façon tissu-spécifique (Figure 12). Il est alors possible d'insérer une séquence cible d'un miR endogène spécifique d'un type cellulaire dans le génome du vecteur lentiviral. Ainsi, l'expression du transgène sera inhibée spécifiquement dans les cellules exprimant le miR choisi.

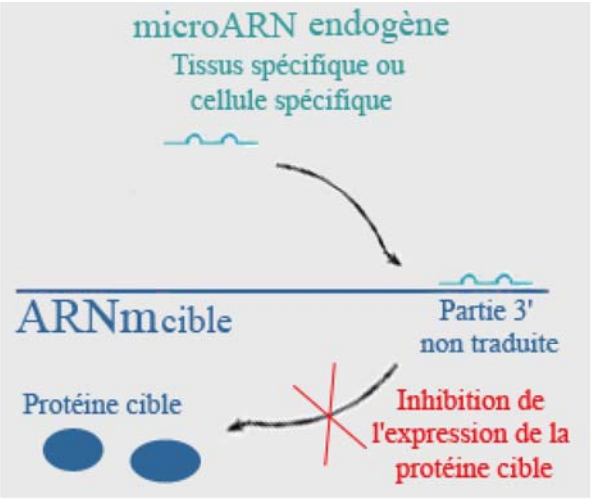


Figure 12: Fonctionnement schématique des microARN. Le microARN, souvent exprimé de façon tissu-spécique ou cellule-spécifique, s'apparie à son ARNm cible et inhibe l'expression de la protéine cible.

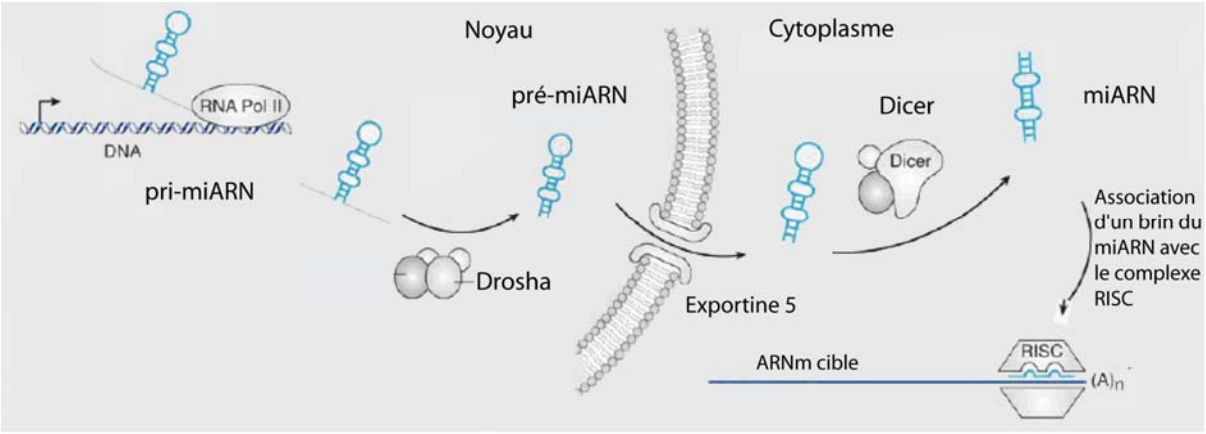
a. Découverte et importance des microARN

La découverte des premiers miR s'est faite en 1993 chez C. Elegans (Lee, Feinbaum et al. 1993). Le miR lin-4 est un petit ARN non codant de 21 à 23 nucléotides qui régule la traduction de la protéine LIN-14 et la transition entre deux stades larvaires. Puis le microARN let-7 a été découvert (Wightman, Ha et al. 1993), il est impliqué également dans le développement du ver. En 2000, une étude montre que ce miR est phylogénétiquement conservé (Pasquinelli, Reinhart et al. 2000). Cette découverte a conduit à la recherche d'autres miR chez les mammifères. En 2001, trois équipes découvrent l'existence d'une centaine de nouveaux miR (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001; Lau, Lim et al. 2001; Lee and Ambros 2001). Puis les découvertes se poursuivent, et aujourd'hui, on dénombre, selon les auteurs, entre 250 et 700 miR différents (Berezikov, Thuemmler et al. 2006; Griffiths-Jones, Grocock et al. 2006; Landgraf, Rusu et al. 2007). Des estimations par des algorithmes déterminant les cibles des miR estimeraient qu'un tiers des protéines humaines serait régulé en partie par les miR (Krek, Grun et al. 2005; Lewis, Burge et al. 2005; Rajewsky 2006). Un miR peut réguler des centaines de gènes et un gène peut être régulé par plusieurs miR (Doench and Sharp 2004). Environ 40% des miR sont tissus-spécifiques et âges-spécifiques. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques du développement à la plasticité synaptique (Carthew 2006 ; Kloosterman and Plasterk 2006) en passant par le destin cellulaire

notamment celui des neurones. Il semblerait donc que cette nouvelle classe d'agents régulateurs ait un rôle primordial dans les organismes vivants, du ver à l'humain.

b. Synthèse des microARN et mode d'action

Les microARN sont des petits ARN non codants de 21 à 25 nucléotides qui contrôlent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (pour revue Wu et Belasco 2008). Ils sont majoritairement transcrits par une ARN polymérase II (Lee, Kim et al. 2004) en un pri-miR d'environ 125 nucléotides. Ce transcrit primaire est ensuite clivé dans le noyau par la protéine Drosha. Il y a alors production d'un pré-miR en forme d'épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides. Ce précurseur est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme par la protéine Exportine-5 où il est clivé par l'enzyme Dicer en un miARN mature d'environ 22 nucléotides (Grishok, Pasquinelli et al. 2001; Hutvagner, McLachlan et al. 2001; Ketting, Fischer et al. 2001; pour revue Boyd 2008) (Figure 13). Les miR matures intègrent le complexe « RNA Induced Silencing Complex » (RISC) puis ils s'apparient par homologie de base à l'ARNm cible complémentaire. Les miR s'apparient de façon partielle à la partie 3' non traduite de son ARNm cible. Cet appariement conduit à la répression de la traduction ou à la dégradation de l'ARNm (Grishok, Pasquinelli et al. 2001; Bartel 2004; Carthew 2006; Valencia-Sanchez, Liu et al. 2006) (Figure 13).



Modifié de Boyd, 2008

Figure 13: Synthèse des microARN. Un pri-miARN est transcrit majoritairement par l'ARN polymérase II puis clivé par l'enzyme Drosha en un pré-miARN qui est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5. Le pré-miARN est clivé par l'enzyme Dicer en un miARN mature. Un des brins du miARN va s'associer au complexe RISC puis à la partie 3' non traduite de son ARNm cible pour inhiber son expression.

c. Mécanisme de dégradation de l'ARNm

Le complexe RISC, principalement formé de protéines Argonautes, stabilise et guide le miR à sa cible, il active le clivage de l'ARNm lorsqu'il y a complémentarité parfaite ou très forte des brins (Tang 2005). Lorsqu'il n'y a que complémentarité partielle, comme pour la majorité des miR, le complexe miR/RISC augmente le turn-over des ARNm en activant leur déadénylation (Figure14)(Bagga, Bracht et al. 2005; Giraldez, Mishima et al. 2006; Wu, Fan et al. 2006), les rendant plus instables et plus vulnérables aux exonucléases. En outre, les Processing Bodies (P-bodies) sont des compartiments cellulaires spécialisés dans la séquestration et la dégradation d'ARNm riche en protéines Argonautes. Ils se forment de manière miR et ARNm dépendantes et seraient le lieu privilégié de la dégradation ou de séquestration des ARNm cible des miR. La régulation de ces corps reste encore à étudier et notamment le choix entre dégradation ou séquestration (Pour revue (Liu 2008 ;Eulalio, Behm-Ansmant et al. 2007; Jakymiw, Pauley et al. 2007; Eulalio, Huntzinger et al. 2008). Cependant, il semblerait que le degré de complémentarité soit impliqué dans ce choix (Franco-Zorrilla, Valli et al. 2007).

d. Mécanismes d'inhibition de la traduction

Les mécanismes conduisant à l'inhibition de la traduction par les miR restent encore débattus (Figure 14). Certains pensent que les miR inhibent la traduction après le moment de l'initiation de la traduction et avant la fin de la traduction de la chaine polypeptidique. Cette régulation serait exercée soit par inhibition de l'assemblage des ribosomes ou par inhibition de l'élongation ou la terminaison prématurée de la chaîne polypeptidique ou encore la dégradation des polypeptides pendant la traduction (pour revue Maroney, Yu et al. 2006; Liu 2008; Wu and Belasco 2008 ; Nottrott, Simard et al. 2006; Petersen, Bordeleau et al. 2006). Cependant d'autres études montrent une inhibition de l'initiation elle-même. Les protéines Argonautes interféreraient dans la reconnaissance de la guanine située en 5' de l'ARNm par la protéine eIF4E qui permet l'initiation de la traduction (pour revue Pillai 2005; Meister 2007; Standart and Jackson 2007).

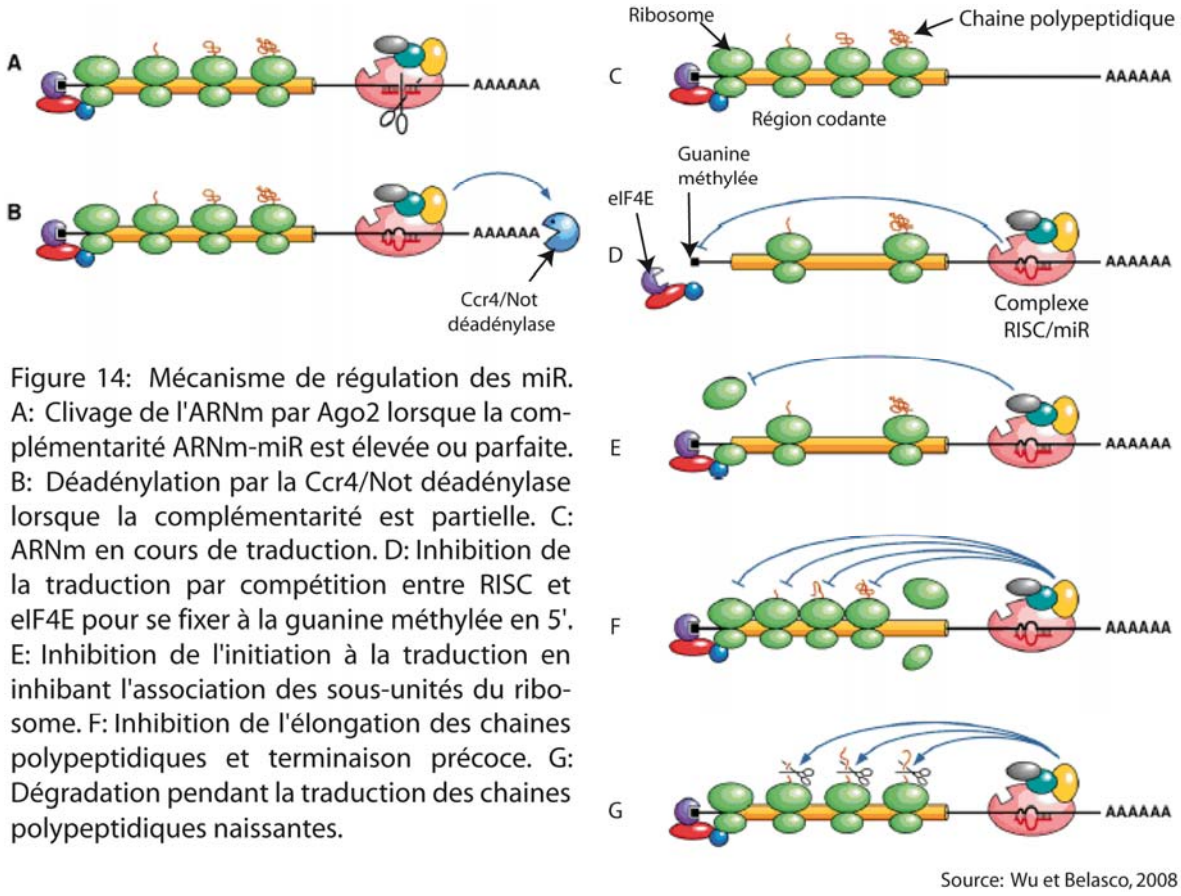


Figure 14: Mécanisme de régulation des miR. A: Clivage de l'ARNm par Ago2 lorsque la complémentarité ARNm-miR est élevée ou parfaite. B: Déadénylation par la Ccr4/Not déadénylase lorsque la complémentarité est partielle. C: ARNm en cours de traduction. D: Inhibition de la traduction par compétition entre RISC et eIF4E pour se fixer à la guanine méthylée en 5'. E: Inhibition de l'initiation à la traduction en inhibant l'association des sous-unités du ribosome. F: Inhibition de l'élongation des chaines polypeptidiques et terminaison précoce. G: Dégradation pendant la traduction des chaines polypeptidiques naissantes.

Ces mécanismes de régulation peuvent également être complémentaires bien qu'il n'y ait pas encore d'explication quant aux éventuels facteurs qui peuvent déterminer le choix de du type de régulation. Il peut dépendre de la cible, du miR ou du type cellulaire (Behm-Ansmant, Rehwinkel et al. 2006; Mishima, Giraldez et al. 2006; Eulalio, Rehwinkel et al. 2007; Kedde, Strasser et al. 2007; Eulalio, Huntzinger et al. 2008). L'appariement de la région 5' du miR est capitale pour la régulation, c'est la région « seed » souvent flanquée de deux adénosines (Doench and Sharp 2004; Lewis, Burge et al. 2005 ; Brennecke, Stark et al. 2005). Mais de nombreux autres facteurs peuvent entrer en jeu dans l'efficacité de régulation des miR. La partie 3' terminale du miR est souvent conservée et pourrait jouer un rôle important dans la reconnaissance des cibles. Un enrichissement en base A et U, des sites au niveau de l'ARNm peut influer sur le miR ainsi que sa position sur le brin d'ARN et peut également jouer un rôle (pour revue Grimson, Farh et al. 2007). Récemment, une étude a montré la présence d'une région très importante pour le choix du mode de régulation. La séquence centrale de la cible pourrait être très importante pour le clivage de l'ARNm par la protéine Argonaute du complexe RISC, si elle ne s'apparie pas totalement, il y aurait inhibition de la traduction sans dégradation de l'ARNm (Aleman, Doench et al. 2007). Un

miR pourrait réguler plusieurs catégories de cibles, il semblerait que les cibles régulées par inhibition de la traduction soient beaucoup plus nombreuses que les cibles régulées par clivage de l'ARNm (Karginov, Conaco et al. 2007).

e. Expression des miR dans le système nerveux central

Les miR ont un rôle important dans le SNC. Beaucoup de miR sont exprimés dans le cerveau (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2002) et nombreux sont ceux qui sont exprimés selon un schéma temporel et spatial déterminé (Krichevsky, King et al. 2003; Mansfield, Harfe et al. 2004; Darnell, Kaur et al. 2006; Deo, Yu et al. 2006) suggérant leur rôle dans la régulation du développement du système nerveux. Certains miR sont fortement et spécifiquement exprimés dans toutes les régions du cerveau, comme les miR9, miR124 et miR128 (Landgraf, Rusu et al. 2007; Mishima, Mizuguchi et al. 2007). Les miR124 et 128 sont spécifiques des neurones alors que les miR23, 29 et 26 sont spécifiques ou enrichis dans les astrocytes (Smirnova, Grafe et al. 2005) (Klein, Impey et al. 2005; Wang, Wilfred et al. 2008). Le miR124 est le miR spécifique du cerveau le plus abondant, représentant 25 à 48% des miR cérébraux (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2002; Kosik and Krichevsky 2005; Darnell, Kaur et al. 2006; Deo, Yu et al. 2006; Kloosterman and Plasterk 2006). Il est présent d'E12 à l'âge adulte *in vivo* chez le rat, la souris et le singe (Miska, Alvarez-Saavedra et al. 2004; Deo, Yu et al. 2006). Ce miR est exprimé faiblement dans les progéniteurs et fortement dans les neurones matures. Son expression augmente au cours de la différenciation neuronale ce qui confirme son implication dans celle-ci (Krichevsky, King et al. 2003; Deo, Yu et al. 2006; Yu, Chung et al. 2008). Il induit un profil d'expression neuronal lorsqu'il est exprimé dans des cultures de cellules Hela (Lim, Lau et al. 2005). Des études de cultures de neurones ou d'astrocytes ont montré qu'il était exprimé uniquement dans les neurones et non dans les astrocytes, les études *in vivo* tendent à le confirmer (Krichevsky, King et al. 2003; Miska, Alvarez-Saavedra et al. 2004; Smirnova, Grafe et al. 2005; Deo, Yu et al. 2006; Nelson, Baldwin et al. 2006; Wang, Wilfred et al. 2008). Le miR 124 inhibe l'expression d'au moins 174 gènes non neuronaux dont l'intégrine-β1 (ITG-β1) qui serait la plus réprimée (Lim, Lau et al. 2005). Sa séquence est conservée du ver (C. elegans) à l'humain. Le miR 124 ne serait pas le régulateur primaire de la différentiation neuronale puisque dans les cellules exprimant ce miR, ses gènes cibles sont réprimés transcriptionnellement. Cependant, il permettrait l'inhibition des gènes des progéniteurs dans les neurones et le maintien d'un profil d'expression génique spécifique des neurones (Farh, Grimson et al. 2005; Conaco, Otto et al.

2006; Cao, Pfaff et al. 2007). Il semblerait que le miR124 induise une différentiation neuronale *in vitro* en partie en inhibant PTBP1, un facteur agissant sur l'épissage alternatif des ARNm (Makeyev, Zhang et al. 2007) et en inhibant une phosphatase qui interagit avec le facteur de répression transcriptionnelle REST (Visvanathan, Lee et al. 2007). De façon intéressante REST permet l'inhibition des gènes neuronaux dans les cellules non neuronales dont le gène du miR124 (Conaco, Otto et al. 2006).

f. Utilisation des miR pour le ciblage cellulaire

La première étude à avoir utilisée les miR pour obtenir une expression du transgène cellule-spécifique est celle de Brown et al, en 2006. Une séquence reconnue par un miR spécifique du lignage hématopoïétique a été incorporée dans le vecteur et a permis d'éteindre l'expression du transgène spécifiquement dans ces cellules sans perturber l'expression dans les types cellulaires non hématopoïétiques (Brown, Venneri et al. 2006). Puis, cette technique s'est montrée efficace pour éteindre l'expression du transgène grâce à des miR exprimés spécifiquement dans des lignées cellulaires, différents tissus ou pendant différents stades de différentiation (Brown, Gentner et al. 2007). La répression de l'expression du gène cible est proportionnelle au nombre de copies de la séquence cible présente dans la partie 3' non traduite (Doench, Petersen et al. 2003; Wu and Belasco 2005; Brown, Gentner et al. 2007) mais également relative à la quantité de miR exprimée par la cellule. Pour une meilleure efficacité de cette méthode, le miR choisi devra être abondant, très spécifique et sa séquence cible devra être uniquement reconnaissable par ce miR pour éviter la perte de spécificité de la régulation.

4. Utilisation des petits ARN interférents

Dans beaucoup d'organisme, l'introduction d'ARN double brin dans la cellule provoque un mécanisme de défense entrainant l'inhibition post-transcriptionnelle du gène correspondant (pour revue Cogoni and Macino 2000). Ce mécanisme a été appelé ARN interférence. Ce mécanisme a été impliqué dans la défense de la cellule contre les virus. L'insertion dans la cellule d'ADN codant pour un ARN double brin clivé pour obtenir un petit ARN interférent (small interfering RNA ; siARN) permet l'inhibition de certaines gènes. Le mécanisme d'action des siRNA est bien caractérisé (Nilsen 2007; Pillai, Bhattacharyya et al. 2007; Wu and Belasco 2008). Les siARN se fixent spécifiquement au complexe

Argonaute2/RISC et conduit au clivage et à la dégradation de l'ARNm qui lui est parfaitement complémentaire. Les siARN sont, par conséquent, des outils extrêmement performants et utilisés en recherche fondamentale et dans le cadre de stratégie thérapeutique pour inhiber sélectivement l'expression d'un gène cible *in vitro* ou *in vivo* (Abbas-Terki, Blanco-Bose et al. 2002; Xia, Mao et al. 2002; Huang and Kochanek 2005; Alves, Nascimento-Ferreira et al. 2008; Kim and Rossi 2008).

Matériels et Méthodes

IV. Matériels et méthodes

A. Clonage des vecteurs de transfert

Les plasmides de transfert contiennent la séquence ψ, essentielle pour l'encapsidation du génome viral dans la particule. Une partie du promoteur U3 a été délétée, ce qui inhibe l'activité du promoteur U3, ces vecteurs sont dits « self-inactivating » (SIN) (Zufferey, Dull et al. 1998). Ceci élimine le risque de production d'ARN viral dans la cellule infectée et diminue ainsi le risque de mobilisation du génome viral. D'autre part, cela diminue le risque d'interférence avec des éléments de régulation proches du site d'intégration, et donc le risque de mutagenèse par insertion. Par ailleurs, une séquence de régulation post-transcriptionnelle issue du virus de l'hépatite B de la marmotte d'Amérique (Woodchuck hepatitis post-regulatory element, WPRE) est placée en aval du gène pour augmenter l'expression du transgène d'une manière post-transcriptionnelle (Zufferey, Donello et al. 1999). Les vecteurs contiennent également la séquence cPPT (Zennou, Serguera et al. 2001) pour faciliter la rétrotranscription de l'ARN viral.

1. Clonage des promoteurs

L'ADN génomique de cellules HeLa, lignée cellulaire humaine, a été obtenu par lyse dans un tampon contenant10 mg/ml de protéinase K, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH8.3, 1,5 mM MgCl2, 0.1 mg/ml gélatine, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20 et une incubation à 55°C sur la nuit. Cette solution d'ADN génomique a été ensuite utilisée pour faire une PCR du promoteur EAAT1 avec les oligomères suivant (Kim, Choi et al. 2003) :

EAAT1F : ATCGATATGTCTACACAAACTGAAATAATG

EAAT2R : GGATCCAAGATATCAAGCAGTAACG

Le produit de PCR a ensuite été inséré dans le vecteur PCR 2.1 TOPO (Invitrogen) et transformé dans des bactéries SCS110. Ces bactéries permettent de ne pas méthyler le site de digestion Cla1 nécessaire pour la suite du clonage. Le plasmide ainsi obtenu est digéré par l'enzyme de restriction ClaI et le promoteur EAAT1 ainsi isolé a été cloné dans le plasmide SIN-cPPT-PGK-GDNF-WPRE pour obtenir le vecteur intermédiaire SIN-cPPT-EAAT1-GDNF-WPRE.

La plupart des clonages ont été faits grâce au système Gateway (Invitrogen). La séquence d'intérêt est clonée dans un vecteur (pENTR/D-TOPO ou pENTR4) possédant de

part et d'autre de la séquence insérée des séquences att. Les vecteurs de destination utilisés lors de ma thèse contiennent une séquence Gateway flanquée également de ces régions att. Ces séquences permettent la recombinaison site-spécifique des deux vecteurs. Ainsi dans un vecteur contenant déjà les séquences nécessaires au transfert et la séquence Gateway, nous pouvons insérer n'importe quel transgène en une réaction de recombinaison (LRclonase).

Le plasmide pBS-SK+-Gateway a été digéré par XbaI, les extrémités cohésives ont été rendues franches grâce à l'enzyme T4 DNA polymérase puis les groupements phosphates ont été enlevés par l'enzyme CIP pour éviter la fermeture du vecteur sur lui-même. Pour faciliter le clonage, un oligomère contenant un site de digestion BglII a été inséré à ce vecteur. Puis, des digestions par XhoI et BglII sont effectué pour obtenir la cassette gateway.

Le plasmide SIN-cPPT-EAAT1-GDNF-WPRE et SIN-cPPT-CMV-nlsLacZ-WPRE ont été digéré par XhoI et BamHI pour extraire les transgènes GDNF et nlsLacZ puis la cassette Gateway a été insérée (les sites BamHI et BglII étant compatibles) pour obtenir les plasmides SIN-cPPT-CMV-Gateway-WPRE et SIN-cPPT-EAAT1-Gateway-WPRE.

La construction du vecteur SIN-cPPT-PGK-Gateway-WPRE avait déjà été réalisée auparavant, nous l'avons donc utilisée sans modification.

2. Clonage des plasmides contenant la cible du miR124

Nous avons choisi la cible du miR124 naturelle la plus réprimée: l'intégrine beta-1 (Lim, Lau et al. 2005). Plusieurs oligomères ont été construits afin d'obtenir, une, deux ou quatre copies de la cible du miR124. D'autre part, nous avons également intégré une adénosine en 3' car une étude suggère que l'insertion de cette adénosine augmenterait l'efficacité de régulation des miR (Wu and Belasco 2005).

MIR-1sens : GATCCCTCGAG-**GCTGAGGTCACAGTGTGCCTTT**-CTCGAGGTCGACG

MIR-1antisens : GATCCGTCGACCTCGAG-**AAAGGCACACTGTGACCTCAGC**-CTCGAGG

MIR(A)-1sens : GATCCCTCGAG-**GCTGAGGTCACAGTGTGCCTTA**-CTCGAGGTCGACG

MIR(A)-1antisens: GATCCGTCGACCTCGAG-TAAGGCACACTGTGACCTCAGC-CTCGAGG

MIR-2sens:GATCCCTCGAG-**GCTGAGGTCACAGTGTGCCTTT**-GAGA-**CTGAGGTCACAGTGTGCCTTT**-CTCGAGGTCGACG

MIR-2antisens : GATCCGTCGACCTCGAG-**AAAGGCACACTGTGACCTCAGC**-TCTC-**AAAGGCACACTGTGACCTCAGC**-CTCGAGG

MIR(A)-2sens : GATCCCTCGAG-**GCTGAGGTCACAGTGTGCCTTA**-GAGA-**GCTGAGTCACAGTGTGCCTTA**-CTCGAGGTCGACG

MIR(A)-2antisens : GATCCGTCGACCTCGAG-**TAAGGCACACTGTGACCTCAGC**-TCTC-**TAAGGCA CACTGTGACCTCAGC**-CTCGAGG.

Ces oligomères sens et antisens ont été hybridés et clonés dans le plasmide pBC-SK+ (Stratagene). Le plasmide résultant a été digéré par l'enzyme Asp718 ainsi que le vecteur de transfert lentiviral SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE. Le fragment contenant les cibles du miR124 a été ligué dans la région 3' non-traduite, après le WPRE. Les clones contenant une copie, deux copies et quatre copies cibles ont été sélectionnés et amplifiés.

Nous avons inséré deux copies du miR(A)-4 dans le vecteur SIN-cPPT-PGK-Gateway-WPRE. Le gène codant l'EGFP (« enhanced green fluorecent protein » ; clontech) a été ensuite inséré dans le plasmide pENTR-4 et une recombinaison par LR clonase a été effectuée pour transférer le gène GFP dans le vecteur lentiviral SIN-cPPT-PGK-GFP-WPRE-MIR(A)4.

Nous avons également inséré les séquences miR(A)-4 dans le vecteur SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE-LTR-RFA-miR(A)4

3. Clonage des plasmides GLAST et GLT-1

Afin d'obtenir l'ADN codant pour le gène GLAST de souris (Genbank AF330257: nucléotides 67-1698), nous avons pratiqué une PCR à partir du plasmide pcDNA3-myc-GLAST (donné par le Dr. Tanaka) avec les oligomères suivants : GLAST-1F: CACCAGATCTCCACCATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGACCA AAAGCAACGGAGAAGAGCC et GLAST-2R: CTCGAGCTACATCTTGGTTTCGCT GTCTGCCAC. Nous avons fait la même chose avec pour obtenir l'ADNc de GLT-1 de souris avec le plasmide pcDNA3-myc-GLT-1 (donné par le Dr. Tanaka) et les oligomères :

GLT-1-1F :

CACCGGATCCACCATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGCATCA ACAGAGGGTGCCAAC

et GLT-1-2R : CTCGAGCGGGTCATTATTTTTCACGTTTCCAAGGTTCTTCC

Afin de faciliter la détection de ces protéines, un tag HA (hémaglutinine : épitope YPYDVPDYA) a été inséré dans la partie N-terminale. Les produits de PCR ont été insérés dans le plasmide pENTR/D-TOPO (Invitrogen). L'ADNc de GLAST ou de GLT-1 a été ensuite transféré par recombinaison avec la LRclonase (Invitrogen) dans le plasmide SIN-cPPT-PGK-Gateway-WPRE-miR(A)4.

4. Clonage des siGLAST et siGLT-1

Des siARN ciblant les ARNm GLAST et GLT-1 du rat et de la souris ont été choisis grâce à un algorithme public (Dharmacon). Des oligonucléotides contenant le brin sens, une boucle, le brin antisens et le codon stop (Brummelkamp, Bernards et al. 2002) ainsi que une partie du promoteur pol III H1 ont été synthétisés : siGLAST : CTAGTTTCCAAAAA-**ACAAACGCATCACCAGATT-**TGACAGGAAG-**AATCTGGTGATGCGTTTGT-**GGGGA TCTGTGGTCTCATACAGAAC
siGLT-1 : CTAGTTTCCAAAAA-**ACACAACTCTGTCGTAATA-**TGACAGGAAG-**TATTA CGACAGAGTTGTGT-**GGGGATCTGTGGTCTCATACAGAAC.
Ces oligomères ainsi que H1-3F: CACCGAACGCTGACGTCATCAACCCG ont été utilisés pour faire une réaction de PCR sur le plasmide pBC-H1 (pBC plasmide; Stratagene) contenant le promoteur H1 (Genbank: X16612, nucleotides 146-366 (Brummelkamp, 2002). Le produit de PCR a été ensuite cloné dans le vecteur pENTR/D-TOPO (Invitrogen). La cassette H1-siARN a été transférée grâce au system de recombinaison LR clonase dans le plasmide SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE-LTR-TRE-gateway-miR(A)4

B. Production des vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux utilisés sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ils sont incapables de se répliquer et sont dépourvus de toutes les séquences codantes pour les protéines du virus sauvage. Pour une meilleure biosécurité, ces plasmides ont été construits afin de séparer les séquences cis, nécessaires pour le transfert du génome viral dans la cellule cible et les séquences trans, nécessaires pour l'encodage des protéines virales.
La production des vecteurs lentiviraux est basée sur la cotransfection transitoire de cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney) par quatre plasmides (Buchschacher and Wong-Staal 2000; Hottinger, Azzouz et al. 2000). Ces cellules possèdent une capacité de transfection très

importante et expriment l'antigen T du virus SV40, ce qui augmente leur capacité à produire des vecteurs à haut titre.

Le plasmide de transfert, le plasmide pCMVΔR8.92 qui contient l'ensemble des gènes de structure et des enzymes du virus (trans) (Gag-pol ; protéines de la capside, reverse transcriptase, intégrase, protéase). Finalement, le gène rev est porté par un autre plasmide. Ce plasmide pRSV-Rev contient le gène rev sous le contrôle du promoteur rous sarcoma virus (RSV) qui est important pour l'expression des protéines virales. Le dernier plasmide code pour l'enveloppe du vecteur. Le plasmide pMD.2G contient le gène codant pour la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Le plasmide p-MOKOLA (fourni par Jacques Mallet) : contient le gène codant pour la protéine G du virus Mokola.

Les virus s'auto-assemblent dans le cytoplasme des cellules 293T et bourgeonnent vers le milieu extracellulaire. Quarante-huit heures après la quadruple transfection, le surnageant est collecté et filtré puis les virus sont concentrés par ultracentrifugation à 19000 rpm pendant 1h30 pour les stocks *in vitro* et deux fois 1h30 pour les stocks *in vivo*, plus concentrés. Les virus sont finalement re-suspendus dans du tampon phosphate salin (PBS 0,1M) contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA). Les lots de virus sont testés pour vérifier l'absence de virus capable de réplication. Pour cela des cellules Hela P4 sont infectées avec le vecteur puis après plusieurs jours le surnageant est dosé pour la protéine de la capside p24. La présence de cette protéine correspondrait à la production d'un virus réplicatif. Les cellules P4 possèdent un gène LacZ provenant de l'intégration d'un virus. A l'état normal, ce gène n'est pas exprimé. Pour son expression, la présence de la protéine Tat est nécessaire. Les cellules P4 subissent ensuite un immunomarquage LacZ. La présence d'un marquage LacZ signifierait que le vecteur produit possède la séquence Tat qui va permettre l'expression du gène LacZ des cellules P4, et donc qu'il y a eu un évènement de recombinaison permettant l'insertion de la séquence Tat dans le vecteur (Escarpe, Zayek et al. 2003). Dans les deux cas, si les tests sont positifs, le vecteur produit est détruit. Le titre infectieux du lot est évalué par dosage ELISA de la protéine de la capside virale p24 (Gentaur).

C. Injections stéréotaxiques

Des rats Lewis mâles de 200g et des souris C57blk6 de 20g ont été utilisés. Les injections de lentivirus se font dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Les rats

sont anesthésiés à l'aide d'un mélange de kétamine (15 mg/kg) et de xylazine (1,5 mg/kg) injecté par voie intramusculaire (i.m.) et intrapéritonéal (i.p.) pour les souris. Les animaux sont placés dans un cadre stéréotaxique avec la barre de gueule réglée à -3,3 mm pour les rats et 0 pour les souris. Les animaux reçoivent les injections via une canule de 34 gauges reliée à une seringue Hamilton (0,2 µL/min). Les rats sont injectés aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : antérieur : + 0,5 mm, latéral : ± 3 mm par rapport à Bregma, et ventral : - 4,5 mm par rapport à la dure mère et pour les souris :

- Dans le striatum : antérieur : + 1 mm, latéral : ± 1.8 mm par rapport à Bregma, et ventral : - 2.7 mm par rapport à la dure mère.
- Dans l'hippocampe : antérieur : -2 mm, latéral : ± 2 mm par rapport à Bregma, et ventral : - 1.5 mm par rapport à la dure mère
- Dans le cervelet : antérieur : -2 mm, latéral : ± 0.5 mm par rapport à Lambda, et ventral : +0.8 mm par rapport à la dure mère

Après la fin de l'injection, les canules restent en place 5min puis sont lentement retirées, la peau du crâne est suturée et les animaux sont placés dans leur cage.

Les p24 obtenu pour chaque production de vecteur lentiviraux étant variable, nous avons adapté nos protocoles selon la concentration de virus à disposition. Pour toutes les expériences, les animaux ont été sacrifiés trois semaines après l'injection des vecteurs sauf mention contraire.

1. Comparaison de l'infection des enveloppes VSV, Mokola et Rabies

Les vecteurs lentiviraux VSVg-PGK-nlsLacZ, Mokola-PGK-nlsLacZ et Rabies-PGK-nlsLacZ ont été dilués pour obtenir une concentration de 150000 ng de p24/ml. Les rats reçoivent une injection stéréotaxique de 4 µL de vecteurs des différents pseudotypes, les souris reçoivent 2 µL

2. Choix de la dose de Mokola

Le vecteur Mokola-PGK-nlsLacZ a été dilué à 150000 ng de p24/ml les souris ont été injectées avec des volumes de 2, 4, 6 et 8µL. De plus, différentes quantités du vecteur Mokola-PGK-nlsLacZ-miR(A)4 ont été injectées dans un volume de 3µl : 200 400 et 600ng de p24.

3. Comparaison des promoteurs

Les vecteurs ont été dilués à 135000 ng de p24/ml. Les vecteurs pseudotypés avec VSVg (VSVg-PGK-nlsLacZ et VSVg-EAAT1-nlsLacZ) ont été injectés à 3 µL pour les rats et 2 µL pour les souris. Les vecteurs pseudotypés avec Mokola (Mokola-PGK-nlsLacZ et Mokola-EAAT1-nlsLacZ) ont été injectés à 6 µL pour les rats et 4 µL pour les souris.

4. Efficacité de la cible du miR124 *in vivo*

Les vecteurs VSVg-PGK-nlsLacZ et VSVg-PGK-nlsLacZ-miR(A)4 ont été dilués à 150000 ng de p24/ml. Les souris ont été injectées avec 2 µL.

5. Ciblage astrocytaire dans le striatum

Les vecteurs Mokola-PGK-nlsLacZ et Mokola-PGK-nlsLacZ- miR(A)4 ont été dilués à 100000 ng de p24/ml. Les souris ont reçu 4 µL et les rats 6 µL.

6. Ciblage astrocytaire dans le cervelet et l'hippocampe

Les vecteurs Mokola-PGK-GLAST-miR(A)4 et Mokola-PGK-nlsLacZ- miR(A)4 ont été dilués à 10000 ng de p24/ml et 1µl a été injecté dans le cervelet des souris.

7. Effet de la surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1

Les vecteurs Mokola-PGK-nlsLacZ- miR(A)4, Mokola-PGK-GLAST- miR(A)4 et Mokola-PGK-GLT-1- miR(A)4 ont été injecté à 400ng dans e striatum des souris. Une petite quantité de VSVg-PGK-GFP a été injecté, pour les prélèvements des Western blot, afin de visualiser le site d'injection au microscope à fluorescence. Pour l'étude de la protection en condition excitotoxique 60 mmol de quinolinate (dilué dans du PBS) à été injecté (0.5 µl à 0.5µl/min) trois semaines après l'injection des vecteurs au même coordonnées. Les souris ont été sacrifiées deux semaines plus tard. Le quinolinate est un agoniste sélectif des récepteurs NMDA qui n'est pas transportable par les transporteurs au glutamate. L'injection intrastriatale de QA provoque des lésions importantes. Le quinolinate active les récepteurs NMDA et induit aussi une libération massive de glutamate endogène, par un mécanisme d'exocytose qui semble lié à l'activation directe des récepteurs NMDA présynaptiques des neurones glutamatergiques. L'injection de QA permet ainsi de mesurer la gestion *in situ* du glutamate sans avoir à injecter du glutamate exogène. Nous l'avons donc utilisé pour produire des conditions pathologiques d'excitotoxicité.

8. Effet de l'inhibition des transporteurs GLAST et GLT-1

Les vecteurs SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE-LTR-TRE-siGLAST-miR(A)4 , SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE-LTR-TRE-siGLT-1-miR(A)4 et SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE-LTR-TRE-siGFP-miR(A)4 ont été injectés dans le striatum de souris à raison de 400ng par site.

D. Quantification des ARN par RT- PCR en temps réel

1. Extraction des ARNm

Six puits de plaque 24 puits sont poolés pour obtenir un échantillon de culture pure de neurones. Trois puits de plaque 6 puits sont poolés pour les cultures d'astrocytes pures. Les extractions sont faites avec le kit d'extraction d'ARN totaux sur colonne (Kit RNA II, Macherey-Nagel). Les cellules sont lysées dans 350 µl de tampon de lyse contenant du β-mercaptoéthanol puis homogénéisées grâce à une seringue de 20G. Après filtration, les acides nucléiques sont précipités à l'éthanol et fixés à la colonne d'extraction. Après récupération de l'ADN , et traitement à la DNAse, les ARN totaux sont élués.

2. Reverse transcription

L'ADN potentiellement présent avec les ARNm est dégradé par traitement avec la DNase I (0,1 u/µL, Promega) de manière à éviter des contaminations lors de la PCR. Les ARNm (0.8 µg) sont réverse-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) par la Superscript II (4 u/µL, Invitrogen) en présence d'hexamères servant d'amorces (pdN6, 2 µM, Invitrogen), d'un mélange de déoxy-nucléotides (dNTP, 1 mM, Promega) et d'inhibiteur de RNase (Rnasin, 0,32 u/µL, Promega). Un aliquot d'ARNm subit le même traitement sans reverse transcriptase de manière à avoir un contrôle négatif. A la fin de la réaction, les ARNm restant sont digérés par la RNase H.

3. PCR en temps réel

La technique de PCR en temps réel permet de suivre en continu par fluorométrie la réaction d'amplification d'une séquence d'ADN grâce à des déoxy-nucléotides qui fluorescent lorsqu'ils sont intégrés à de l'ADN double brin.

La séquence des ADNc de nlsLacZ est amplifiée par la Taq polymerase à l'aide d'amorces spécifiques (10µM) (LACZ-1F : CCTTACTGCCGCCTGTTTTGAC et LACZ-2R : TGATGTTGAACTGGAAGTCGCC) et de déoxy-nucléotides couplés au fluorophore

SYBR green (Invitrogen). En parallèle, une séquence du gène de la cyclophiline (CYCLO-1F : ATGGCAAATGCTGGACCAAA et CYCLO-2R : GCCTTCTTTCACCTTCCCAAA) est amplifiée et sert à la normalisation des données. Le thermocycleur ABI PRISM 7000 a été programmé pour une étape dénaturation initiale (95°C, 2min) suivie de 40 cycles d'amplification (95°C, 15 sec; 60°C, 1 min), puis d'une étape de dissociation de 60°C à 95°C par pas de 0,5°C permettant de vérifier la sélectivité des oligonucléotides.

La quantité de séquence amplifiée est évaluée par une mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle (normalisée par rapport à la fluorescence de base, mesurée dans les premiers cycles). Le nombre de cycles (Ct) nécessaires pour dépasser un seuil de fluorescence est calculé. La quantité relative de la séquence LacZ amplifiée est normalisée par la cyclophiline présumée constante selon la formule : $2^{[(CtLacZ-Ctcyclo)]}$

Cette analyse a été effectuée sur 7 ou 8 échantillons par condition provenant de deux cultures différentes. Les données sont exprimées en moyenne des valeurs normalisées pour la quantité relative d'ARNm.

Le même protocole a été utilisé pour quantifier la quantité d'ARNm de l'intégrine-β1 avec les amorces sens : TCAACTGCGATAGGTCCAACG et antisens : AAGCACCACATTCA CAGATGCC. Les analyses RT-QPCR ont été réalisées sur cinq échantillons par condition.

4. Quantification du miR124

Sur les mêmes échantillons, nous avons quantifié la quantité du miR124 grâce au kit Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems). La reverse transcription a été faite à partir de 160ng d'ARN totaux avec le kit Taqman MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystem). Les ADNc on été obtenus avec l'enzyme Multiscribe RT et une amorce en épingle à cheveux spécifique du miR124. Les PCR ont été réalisées avec une sonde Taqman liée à un fluorochrome FAM et les amorces fournies dans le kit.

E. Transfection transitoire au chlorure de calcium des cellules 293T

Un mélange contenant l'ADN du plasmide d'intérêt, de $CaCl_2$ (Chlorure de calcium) et d'HBS (Hepes Buffer Saline) est préparé. Le mélange est ajouté au milieu de culture des cellules. Les cellules sont incubées pendant 5 à 6 h puis le milieu est renouvelé. Les cultures sont gardées 72h pour permettre l'expression de la protéine puis traitées pour le western blot, l'immunohistochimie ou l'uptake d'aspartate.

F. Mesure de l'uptake d'aspartate tritié

Le D-Aspartate a été utilisé dans ces expériences car c'est un analogue du glutamate transporté seulement par les transporteurs membranaires comme GLAST et GLT-1, de plus, il n'est pas métabolisé dans les cellules. Les cultures sont incubées à température ambiante avec 500µM de D-aspartate en présence de 1 µCi/ml de [3H]-D-Aspartate. Après 5 minutes d'incubation, l'incorporation d'aspartate tritié par les transporteurs est arrêtée par aspiration du milieu puis les cellules sont rincées trois fois avec du PBS. Les cellules ont ensuite lysées avec une solution de NaOH (0,1N) et de triton 0,1%. Un aliquot de 500µl est mis en présence de scintillant (Optiphase Hisafe, Perkin Elmer). L'incorporation de radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard). Des incubations à 4°C sont effectuées afin de déterminer l'uptake non spécifique. Un aliquot de 50µl est mis de côté pour la quantification de la quantité de protéine selon la méthode de Bradford. La quantité d'aspartate recapté est exprimée en nmol d'aspartate/mg de protéine.

G. Immunoblots

1. Préparation des homogénats de cerveaux

Le cerveau des rats et des souris est prélevé rapidement et le striatum est disséqué sur de la glace à partir de tranches de 1 mm. Chaque structure est homogénéisée à l'aide d'un potter verre-verre dans 300 µL tampon de lyse pour les rats et 200µl pour les souris.

Pour la surexpression et l'inhibition des transporteurs GLAST et GLT-1, des punchs de cerveau ont été réalisé dans la zone d'injection, détectée grâce à la fluorescence GFP. Deux punchs de 1,25 mm de diamètre ont été réalisés par hémisphère. Ils sont ensuite homogénéisés dans 30µl de tampon de lyse. Le tampon de lyse est composé de 50mM TrisHCl pH7,4 ; 100mM NaCl ; 1% SDS ; 1/200 un cocktail d'inhibiteurs de protéase. La quantité de protéines est mesurée par la méthode de Bradford. Un aliquot de chaque échantillon est directement dilué dans du tampon de charge (62,5 mM Tris, pH=6,8, 100 mM DTT, 10% glycérol, 2% SDS et bleu de bromophénol) et mis à bouillir pendant 5 minutes. Le reste de l'échantillon est stocké à -80°C.

2. Electrophorèse, transfert et immunoblot

Les échantillons dilués (20 µg de protéine) sont chargés sur un gel d'acrylamide à 10% et migrent en conditions dénaturantes. Les protéines sont alors transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont colorées au rouge Ponceau pour contrôler la migration et le transfert. Les membranes sont prétraitées pendant 1 heure dans du tampon Tris 25 mM pH=7,4, NaCl 150 mM et 0,1% Tween-20 (TBS-T) avec 5% de lait en poudre. Les membranes sont alors incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T et 5% de lait sur la nuit à 4°C. Après rinçage avec du TBS-T, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP), dilué au 5000ème dans du TBS-T + 5% de lait. Après rinçage, les anticorps secondaires sont détectés par une réaction de chemiluminescence (ECL, Amersham) et suivie d'une exposition des membranes sur film (Biomax ML, Kodak). Les films sont révélés.

Certaines membranes ont été utilisées plusieurs fois, en particulier pour vérifier la quantité de protéines chargées avec un marquage tubuline. Dans ce cas, les membranes ont été incubées pendant 20 min avec la solution « stripping » du kit Re-blot afin de décrocher les anticorps de la première hybridation. Après rinçage au TBS-T, les membranes subissent alors une deuxième hybridation.

H. Cultures primaires

1. Cocultures primaires de striatum

Des rates gestantes Sprague Dawley sont euthanasiées avec une dose létale de pentobarbital, et les embryons E15-E16 sont rapidement prélevés et disséqués dans un tampon froid sodique Hank sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}. Les striata sont isolés, émincés et traités pendant 15 min à 37°C par de la DNase I (0.3 mg/ml). Les tissus sont dissociés mécaniquement avec des pipettes Pasteur érodées et les débris sont enlevés après décantation. Les cellules sont ensuite concentrées par centrifugation (20°C, 10 min, 200 *g*) et resuspendues dans du milieu Neurobasal contenant 2% de B27 (Invitrogen), 1% d'un mélange antibiotique-antimycotique (Invitrogen), and 0.5 mM de L-glutamine. Les cellules sont ensemencées à une densité de 200000 cellules/cm² dans des plaques 24 puits traitées avec 50 µg/ml de poly-D-lysine (30–70 kDa). Les cultures sont placées dans un incubateur humide (5% CO2, 37°C) et la moitié du milieu est changé une fois par semaine. Les astrocytes se divisent au fil des jours pour obtenir une culture mixte neurone/astrocyte.

Les infections des cocultures se font à DIV11. Les vecteurs lentiviraux sont déposé en goutte à goutte dans les puits. Pour la comparaison des trois enveloppes, la même quantité de p24 a été utilisée pour les infections (50ng/puits). Pour les études suivantes concernant la partie changement de promoteur et miR, l'infection se fait à 50ng/puits, pour les vecteurs pseudotypés avec VSV. Pour les vecteurs pseudotypés avec Mokola, les infections se font à 100ng/puits. Les cultures sont étudiées à DIV20-21.

2. Cultures de neurones purs

Le protocole de culture est le même que celui de la coculture, mais à DIV1, les cultures subissent un pulse de cytosine arabinoside (Ara C) à 10µM pour inhiber la croissance astrocytaire. Après 48h, le milieu est changé totalement. Par la suite, la moitié du milieu est changée deux fois par semaine. L'ensemencement se fait à 400000 cellules/cm²

Les infections se font à DIV4 avec les mêmes quantités de vecteurs lentiviraux que pour la coculture. Les cultures sont étudiées à 11 DIV pour toutes les expériences.

3. Cultures d'astrocytes purs

Les striata d'embryons de rats E19 Sprague–Dawley sont disséqués dans un tampon froid sodique Hank sans Ca2 ni Mg2 et transférés dans un milieu 50% DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco), 50% F12 (Gibco), 10% SVF et 1% d'un mélange antibiotique-antimycotique (Invitrogen). Les cellules sont dissociées avec des aiguilles de tailles décroissantes (1.1x 40 mm, 0.9x 25 mm, 0.6x20 mm) puis ensemencées à 200000 cell/cm$^{2.}$ Le milieu est changé complètement 4-5 jours après l'ensemencement puis tous les 2-3 jours. Les plaques de cultures sont régulièrement secouées afin de décoller les cellules moins adhérentes (oligodendrocytes, oligodendrocytes de type 2, progéniteurs astrocytaires et la microglie).

Les infections se font à DIV10-15 avec 50ng p24/cm^2 pour les vecteurs pseudotypés avec VSV et 100ng of p24/cm^2 pour ceux pseudotypés avec Mokola. Après confirmation par comptage, nous considérons que le nombre de cellules a doublé depuis l'ensemencement. Toutes les expériences ont été faites 7 jours après l'infection.

I. Analyse en cytométrie de flux

Les cultures ont été dissociées avec une solution de dissociation non enzymatique (Sigma) puis fixées au paraformaldéhyde 2%. Après rinçage, les cellules ont été

perméabilisées pendant 10 min sur la glace avec du Tween 0,1% puis rincées au PBS. L'incubation pour les anticorps primaires s'est faite pendant 15min à température ambiante. Chaque échantillons a été doublement marqué pour la protéine β-galactosidase (du poulet, 1:50; AbCAM) et NeuN (conjugué avec Alexa Fluor 488; 1:25; Chemicon) ou S100β (du lapin, 1:200; AbCAM). Les anticorps secondaires ont été incubés à température ambiante pendant 15min : anti lapin conjugué à la phycoérythrine (1:200, Molecular Probes) et anti-poulet conjugué à l'Alexa Fluor 633 (1:200, Molecular Probes). Les cellules ont été ensuite analysées grâce au cytométre LSR I (BD Biosciences) en utilisant le logiciel CellQuest (BD Biosciences).

J. Immunohistologie

1. Obtention des coupes

Les animaux ont été perfusés avec une solution de Tampon sodique 4% paraformaldéhyde (PFA) et acide picrique. Les cerveaux sont cryoprotégés dans un bain de sucrose 30%. Les cerveaux sont ensuite coupés dans le plan coronal en sections sériées de 40 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome à congélation. Les sections sont collectées en 10 séries pour les rats et en 7 pour les souris et conservées dans une solution de stockage à -20°C.

2. Protocole d'immunohistochimie

Les coupes sont rincées dans du PBS 0,1 M, exposées pendant 30 min à 1% de peroxyde d'hydrogène pour inactiver les péroxydases endogènes, puis prétraitées avec 0,1% de Triton X-100, 10% de sérum normal de chèvre (NGS) dans 0,1 M de PBS pendant 1 h. Les coupes sont incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans 0,1% de Triton X-100, 10% NGS, 0,1 M PBS. Les coupes sont rincées, puis incubées avec l'anticorps secondaires biotinylé dilué au 1/1500ème dans 0,1% de Triton X-100, 10% de NGS, PBS 0,1 M pendant 1h. Le signal des anticorps secondaires est alors amplifié par incubation pendant 1 h avec un complexe avidine-biotine couplée à une péroxydase (HRP) (Vectastain ABC Kit) dans 0,1 M PBS puis visualisé avec 3,3' diaminobenzidine (DAB Metal Concentrate; Pierce). Les coupes sont montées sur lames, mises à sécher puis montées avec de l'Eukitt entre lame et lamelle après déshydratation dans des bains successifs d'éthanol et de toluène.

Pour les marquages avec l'anticorps anti-NeuN issus de la souris sur les coupes de souris, le protocole de marquage a été effectué en utilisant le kit Mouse on Mouse (Vector) afin de

diminuer le marquage non spécifique. Les concentrations utilisées pour les anticorps sont présentées dans le Tableau 3.

Anticorps anti-	Espèce	Fournisseur	Dilution Immunohistologique		Dilution Immunoblot
			Amplification-DAB	Immunofluorescence	
Tubuline	souris	Sigma			1/5000
galactosidase	souris	Sigma		1/4000	
galactosidase	lapin	Invitrogen	1/2000	1/2000	
galactosidase	poulet	ABCAM		1/4000	
Calbindine	souris	Sigma		1/200	
Iba1	lapin	Wako		1/500	
S100b	souris	Sigma		1/3000	
DARPP32	lapin	Chemicon	1/2000	1/2000	
GLAST	lapin	Tanaka		1/2000	1/10000
GFP		Ozyme			1/200
GLT-1	lapin	Tanaka		1/1000	1/10000
HA conjugué A488	rat	Roche		1/100	
HA	mouse	Covance		1/1000	1/1000
GFAP conjugué Cy3	mouse	Sigma		1/200	
NeuN	souris	Chemicon	1/200 (kit MOM)	1/500 (souris :Tampon citrate)	

Tableau 3 : Concentrations des anticorps utilisés selon le protocole effectué.

3. Protocole d'immunofluorescence

Pour le marquage NeuN chez la souris, un traitement de démasquage des sites a été pratiqué avant le blocage. Les coupes sont chauffées dans un tampon citrate (10mM sodium citrate, 0,05% Tween 20, pH6.0) pendant 40 min à 95°C.

Les coupes de cerveau sont rincées dans du PBS, prétraitées avec 0,1% de Triton X-100, 10% de NGS dans 0,1 M de PBS pendant 1h. Les coupes sont incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans la même solution. Après rinçage les coupes sont incubées 1 h avec l'anticorps secondaire (dilution 1/500ème) couplé à un fluorochrome (AlexaFluor 488 ou 594). Les coupes sont alors rincées, montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de

montage aqueux adapté à la conservation de la fluorescence (Fluorsave) et sont stockées à l'abri de la lumière à 4°C. Les concentrations utilisées pour les anticorps sont présentées dans le Tableau 3.

4. Immunofluorescence sur cultures

Les cultures sont fixées avec du paraformaldéhyde 4%. Les lamelles sur lesquelles ont été ensemencées les cellules sont ensuite rincées dans du PBS, prétraitées avec 0,2% de Triton X-100 dans 0,1 M de PBS pendant 20min puis dans du PBS 0.1 M, 10%NGS, 0.03% Triton X-100 pendant 1h. Les lamelles sont incubées 3h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 0.1M, 0.01% Triton X-100, 0.1% NGS. Après rinçage les lamelles sont incubées 1 h avec l'anticorps secondaire (dilution 1/500ème) couplé à un fluorochrome (AlexaFluor 488 ou 594). Les lamelles sont alors rincées et montées sur lames à l'aide d'un milieu de montage aqueux adapté à la conservation de la fluorescence (Fluorsave) et sont stockées à l'abri de la lumière à 4°C. Les concentrations utilisées pour les anticorps sont présentées dans le Tableau 3.

K. Analyse des immunomarquages

Une analyse par microscopie confocale a été menée pour étudier la colocalisation cellulaire des différents marqueurs en utilisant un microscope Zeiss Axioplan2 (Zeiss). Pour chaque condition, le nombre de cellules LacZ-NeuN positives et LacZ-S100β positive a été compté sur 6 images (objectif x63) par section, sur trois sections et sur trois animaux différents. L'intensité de fluorescence (exprimé en unité arbitraire) des cellules LacZ positives a été mesurée sur 3 images (objectif x40) par section sur trois sections et sur trois animaux grâce au logiciel MorphoExpert (Explora Nova) objective et *in vitro* sur trois puits différents et de deux ou trois cultures différentes. La quantification du nombre des cellules infectées et du volume d'infection a été faite avec le logiciel Mercator (Explora Nova). Le comptage a été fait sur 7 coupes par animal (distance intercoupe : 240 µm) et sur trois animaux (objective 5x). La segmentation des objets LacZ positifs a été faite grâce à un seuillage par intensité de lumière suivie d'un filtrage par taille et forme des objets. Le nombre de cellules estimé a été corrigé par le facteur Abercrombie (Coggeshall 1992). Les volumes d'infection ont été évalués à partir de coupes sériées en utilisant la méthode de Cavalieri. Dans l'exemple d'un volume V d'infection : V= S x k x n ;où k est la distance intercoupe, n le nombre de coupes présentant un marquage et S l'aire moyenne de la lésion sur les n coupes (Coggeshall 1992).

La quantification du volume de lésion après injection de quinolinate s'est faite sur les coupes immunomarquées pour DARPP32. Les zones présentant une baisse ou une perte du marquage ont été délimitées et les volumes quantifiés avec le logiciel MCID. Les volumes de lésion ont été évalués à partir de coupes sériées grâce à la méthode de Cavalieri.

L. Mesure autoradiographique de la consommation cérébrale de 2-deoxy-D-[14C]glucose (2DG)

Le deoxyglucose, qui est transporté comme le glucose, reste séquestré dans les cellules après sa conversion en deoxyglucose 6-phosphate par l'héxokinase ce qui permet d'évaluer la consommation de glucose par les cellules de cerveau en utilisant le modèle développé par Sokoloff (1977). Des souris injectées avec des vecteurs lentiviraux contenant le siGLAST ou siGLT-1 à droite et le siGFP à gauche reçoivent une injection intrapéritonéale de 2DG (0.15µCi/g). Les souris vigiles sont laissées dans leur cage pendant 45 min, puis sont euthanasiées avec une overdose de pentobarbital. Les cerveaux sont extraits, congelés dans de l'isopentane à -40°C. Ils sont ensuite coupés au cryostat en sections sériées de 20 µm d'épaisseur avec espace intercoupe de 60 µm. Les sections sont déshydratées au fur et à mesure de la coupe à l'aide d'un banc chauffant à 60°C et sont mises à exposées sur un film Biomax MR (Kodak) pendant 10 jours. Les films sont alors révélés en chambre noire et les autoradiogrammes sont digitalisés.

Dans nos conditions expérimentales, il n'est pas possible de calculer une consommation moyenne de glucose à proprement parler selon l'équation de Sokoloff, car nous n'avons pas réalisé de fonction d'entrée (Sokoloff, Reivich et al. 1977). Pour simplifier, nous utiliserons le terme de 'consommation' de glucose alors que le paramètre véritablement mesuré est l'accumulation de glucose-6-phosphate radioactif dans le parenchyme cérébral.
L'analyse des autoradiogrammes s'est fait avec le logiciel MCID. La région d'intérêt a été délimitée sur les coupes immunomarquées pour la protéine β-galactosidase. Un standard de radioactivité du carbone 14 a servi pour la conversion de la DO en nCi/g de 2DG. Les mesures se sont faites en comparant le côté gauche contrôle avec le côté droit sur 12 coupes adjacentes pour chaque animal en soustrayant la D.O du fond (non spécifique).

M. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard (SEM). L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour des comparaisons de moyennes entre groupes expérimentaux, suivie d'un test a posteriori PLSD de Fisher pour comparer les groupes deux à deux. Pour les comparaisons de données appariées (ex : comparaison entre striatum droit et gauche du même individu) un test t apparié a été employé. Pour les données non appariées, un test de Student non apparié à été effectué. Lorsque les données étudiées n'étaient pas paramétriques (ex : pourcentage) le test de Mann-Whitney a été utilisé.

Résultats et discussion

V. Développement d'un vecteur lentiviral ciblant les astrocytes *in vivo*

Dans cette première partie, notre objectif était de développer un vecteur lentiviral permettant une transduction des astrocytes *in vivo* de façon majoritaire et avec une efficacité importante. Nous avons utilisé pour cette étude le transgène nlsLacZ, produisant la protéine β-galactosidase dont l'accumulation est restreinte au noyau des cellules infectées. Ce transgène nous permet une visualisation individuelle des cellules infectées. Le vecteur VSV-PGK-nlsLacZ couramment utilisé dans la littérature et au laboratoire a un tropisme fortement neuronal, et nous servira de vecteur contrôle pour la comparaison avec les autres constructions. Au cours de ce travail, nous avons développé trois voies de recherche. Une première voie dans laquelle nous avons changé les protéines de l'enveloppe du vecteur lentiviral. Nous avons ainsi testé l'effet du pseudotypage sur le tropisme et l'efficacité d'infection avec les enveloppes VSV, Mokola et Rabies. La deuxième voie de recherche a consisté à utiliser un promoteur permettant une expression spécifiquement astrocytaire. Nous avons comparé l'effet sur le tropisme et l'efficacité d'infection de différents promoteurs : PGK, le promoteur ubiquitaire de la phosphoglycérate kinase ; CMV, le promoteur du cytomégalovirus et EAAT1, le promoteur du transporteur astrocytaire GLAST. Enfin, nous avons développé une troisième voie de recherche utilisant une nouvelle méthode de ciblage. Cette méthode basée sur un principe de sélection négative repose sur l'insertion, à la fin de la cassette d'expression, d'une cible endogène d'un microARN spécifique des neurones, afin de diminuer l'expression du transgène dans les neurones infectés par le vecteur lentiviral.

La sélection des vecteurs performants pour la transduction des astrocytes s'est faite sur plusieurs modèles. Tout d'abord, une première sélection s'est faite *in vitro* sur des cocultures primaires de striatum. Puis, les vecteurs ont été testés *in vivo* chez le rat et la souris.

A. Changement de pseudotype : VSV, Rabies et Mokola

1. Résultats du pseudotypage

Les expériences présentées dans cette partie comparent l'efficacité de transduction et le tropisme de vecteurs lentiviraux pseudotypés avec les glycoprotéines G de l'enveloppe VSV, Mokola ou Rabies. Ces vecteurs ont le même transgène et le même promoteur. Les

différences observées seront attribuables uniquement au changement d'enveloppe et donc à l'efficacité que possède chaque vecteur à entrer dans la cellule.

a. Effet du pseudotypage *in vitro*

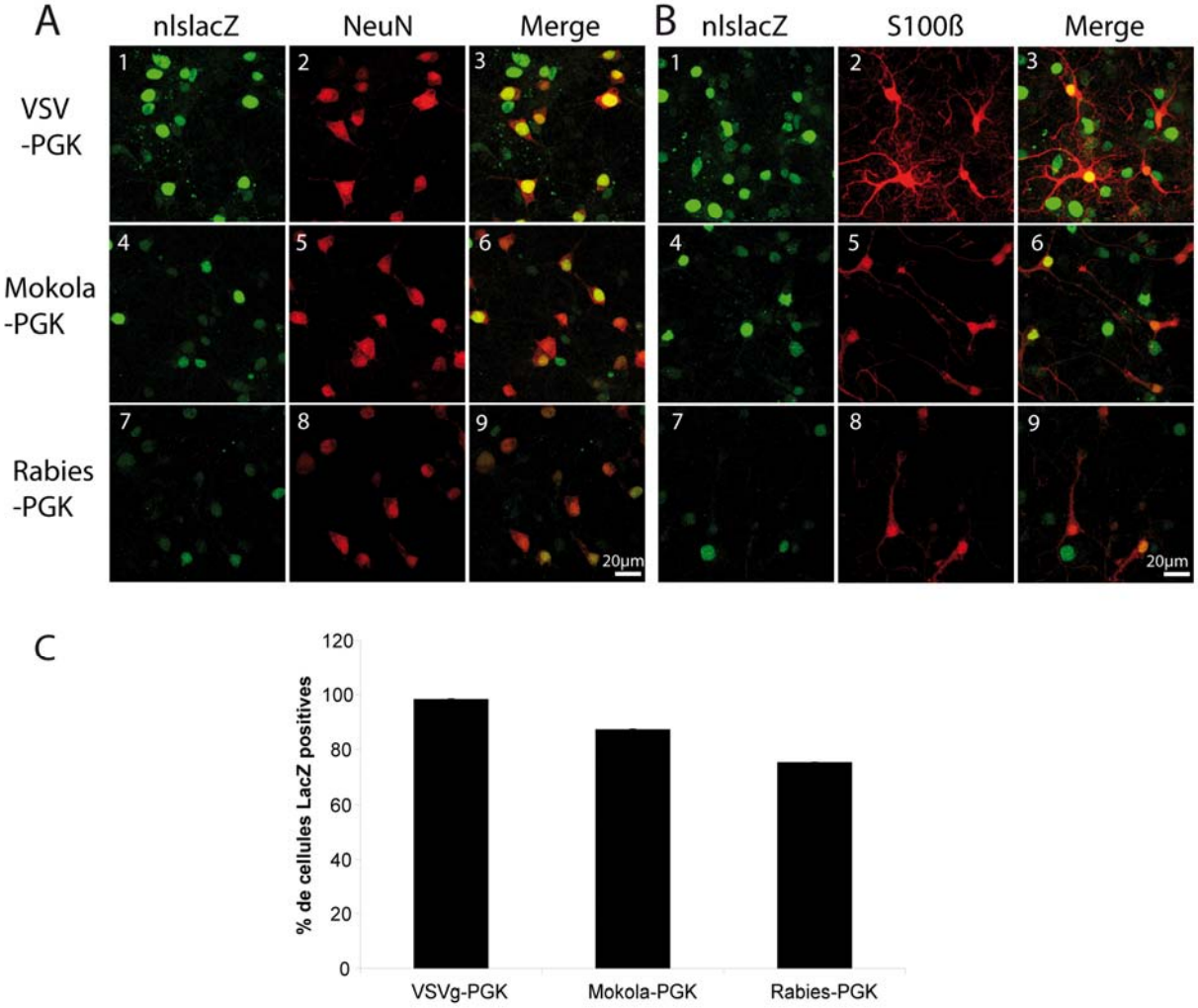


Figure 15: Effet du pseudotypage sur l'expression du transgène ß-galactosidase. Des cocultures ont été transduites avec des vecteurs lentiviraux contenant le transgène nlsLacZ sous contrôle du promoteur PGK. Doubles marquages immunofluorescents de cocultures.(A: en rouge les neurones marqués avec neuN, B: les astrocytes marqués avec S100ß) après infection avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV(1, 2, 3), Mokola (4, 5, 6) et Rabies (7, 8, 9). Les cellules transduites expriment le transgène ß-galactosidase (en vert). Le niveau d'expression est élevé lorsque le vecteur est pseudotypé avec VSV, est intermédiaire avec l'enveloppe Mokola et est faible avec l'enveloppe Rabies. Le pourcentage de cellules LacZ positives suit la même évolution en C.

Des cocultures de neurones et d'astrocytes de striatum de rats ont été infectées avec les différents vecteurs à DIV11 et fixées à DIV21. Puis un double marquage immunofluorescent a été effectué permettant de visualiser les cellules exprimant le transgène nlsLacZ (en vert) et les astrocytes grâce au marqueur S100β ou bien les neurones avec le

marqueur NeuN (en rouge). Trois pseudotypages ont été testés avec le même promoteur PGK : le vecteur pseudotypé avec VSV (VSV-PGK-nlsLacZ), Mokola (Mokola-PGK-nlsLacZ) et Rabies (Rabies-PGK-nlsLacZ). Le transgène étant toujours nlsLacZ, nous nommerons nos vecteurs uniquement par leur enveloppe et leur promoteur.

Le vecteur VSV-PGK possède une efficacité importante concernant aussi bien le nombre de cellules infectées, 98% des cellules expriment le transgène, que le niveau d'expression du transgène comme le montre la figure 15. Mokola-PGK induit une expression plus faible du transgène avec 87% des cellules LacZ positives. Rabies-PGK ne permet qu'une expression très faible du transgène, les cellules transduites ne représentent alors que 75 % de la population. *In vitro*, les vecteurs sont dans le milieu de culture et nous ne changeons pas ce milieu avant plusieurs jours. Les vecteurs sont dans des conditions très favorables pour infecter les cellules. C'est pourquoi le pourcentage de cellules infectées est très élevé et même pour une enveloppe au tropisme très neuronal comme VSV, presque tous les astrocytes sont marqués. L'étude *in vitro* n'est peut-être pas assez discriminante, il est donc nécessaire d'étudier le tropisme en condition d'utilisation, c'est-à-dire *in vivo*.

b. Effet du pseudotypage *in vivo*

Des rats et des souris ont reçu des injections stéréotaxiques de vecteur lentiviral au niveau du striatum. Ces animaux ont été injectés les vecteurs VSV-PGK, Mokola-PGK ou Rabies-PGK. Trois semaines après l'injection, les animaux sont sacrifiés et les coupes de cerveaux subissent un protocole d'immunohistochimie.

<u>-Effet du pseudotypage sur l'efficacité d'infection</u>

Les coupes de rats et de souris ont subi un marquage immunohistochimique permettant de visualiser la protéine β-galactosidase afin de déterminer l'étendue de la zone d'infection dans le striatum des animaux.

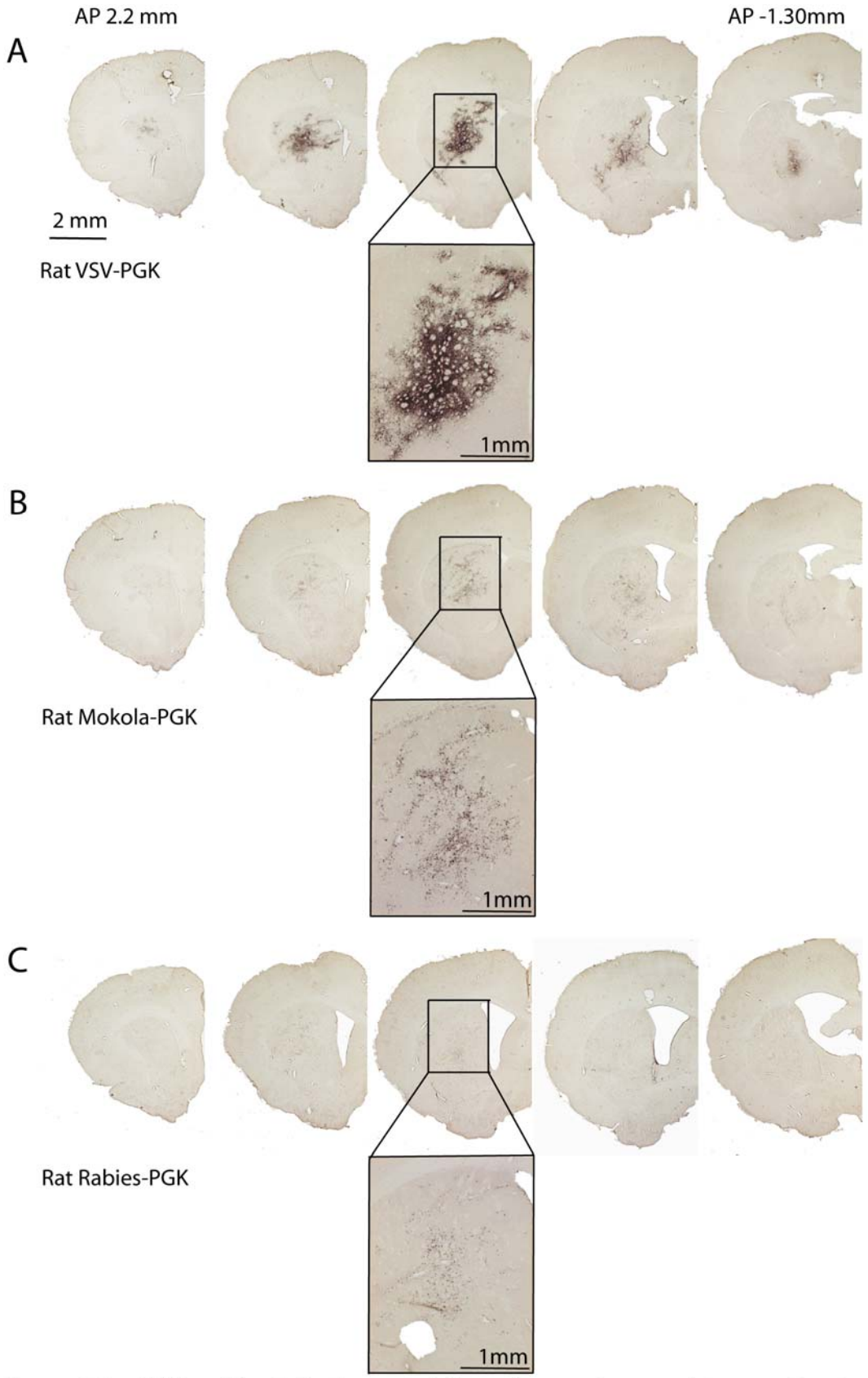


Figure 16: L'efficacité d'infection est influencée par le pseudotypage in vivo. Immunohistochimie de la protéine ß-galactosidase dans le striatum de rats après infection par des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV (en A), Mokola (en B) et Rabies (en C). Le nombre de cellules exprimant le transgène ainsi que le niveau d'expression sont élevés pour VSVg, plus faibles avec Mokola et encore moindre avec Rabies.

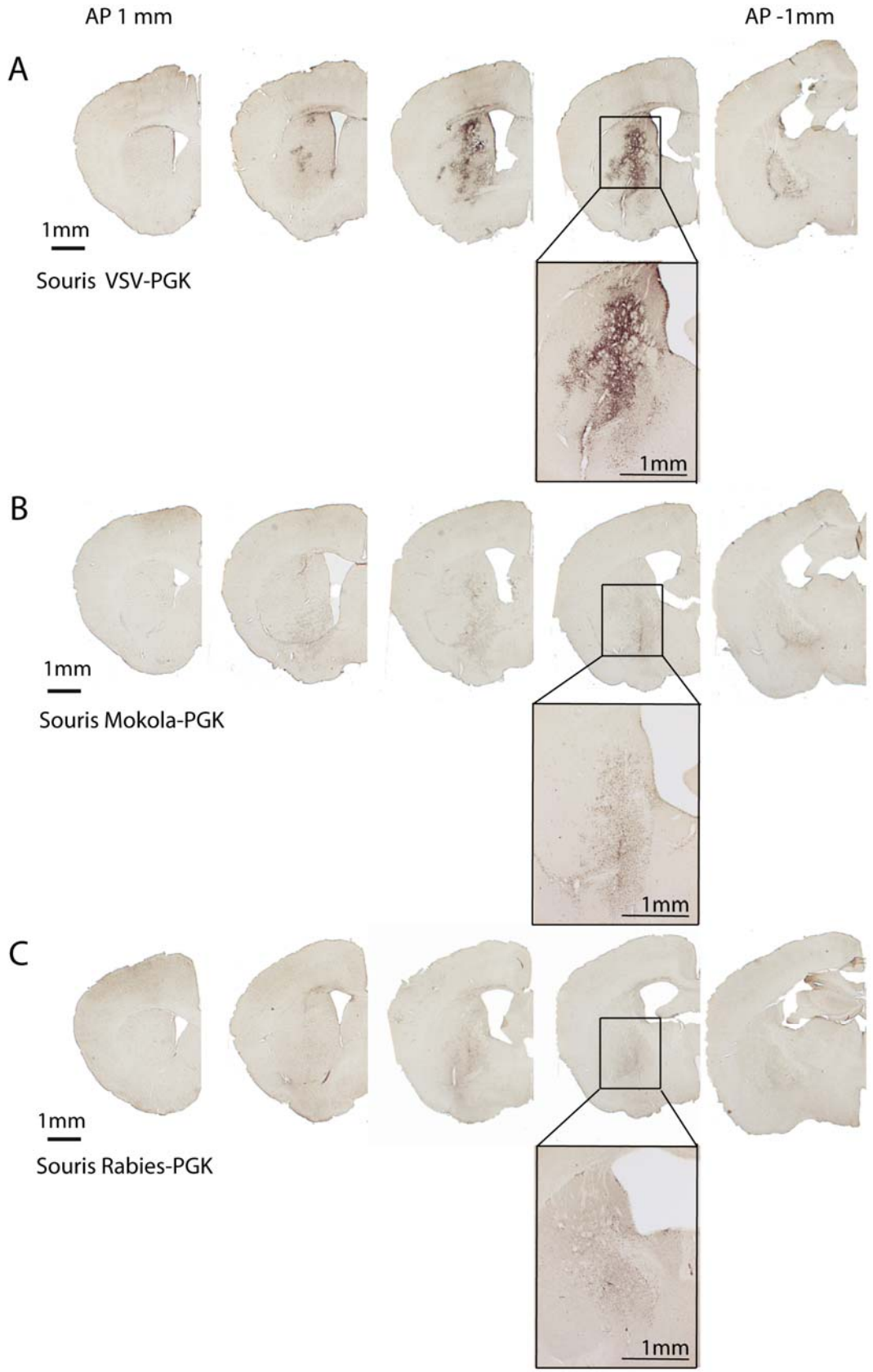


Figure 17: L'efficacité d'infection est influencée par le pseudotypage chez la souris. Immunohistochimie de la protéine ß-galactosidase dans le striatum de souris après infection par des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV (en A), Mokola (en B) et Rabies (en C). Le nombre de cellules exprimant le transgène et le niveau d'expression sont élevés pour VSV, plus faibles avec Mokola et encore moindre avec Rabies.

Chez le rat (Figure 16) comme chez la souris (Figure 17), la plus forte efficacité d'infection s'observe avec VSV-PGK. Le niveau d'expression est très important, le marquage ne se situe pas uniquement au niveau nucléaire mais également dans les projections d'où l'intensité du marquage observée en A dans la figure 16. Avec Mokola-PGK (en B), l'intensité du marquage est plus faible, il se limite aux noyaux des cellules infectées mais le niveau d'expression du transgène et le nombre de cellules infectées restent importants. En revanche, l'efficacité d'infection avec Rabies-PGK (en C) est très faible, trop faible pour pouvoir par la suite espérer un effet fonctionnel avec un autre transgène.

Ces données confirment globalement les résultats portant sur l'efficacité d'infection observés *in vitro*. L'efficacité de transduction la plus forte est observée avec VSV-PGK. Une efficacité modérée est observée avec Mokola-PGK et enfin Rabies-PGK ne permet qu'une efficacité faible.

-Effet du pseudotypage sur le tropisme

Un double marquage immunofluorescent a été effectué sur les coupes de cerveaux de rats et de souris permettant de visualiser les cellules exprimant le transgène nlsLacZ (en vert) et les astrocytes grâce au marqueur S100β ou bien les neurones avec le marqueur NeuN (en rouge).

Tropisme in vivo chez le rat

Chez le rat (Figure 18 A et B) le tropisme de VSV-PGK est fortement neuronal avec 93 % des cellules infectées qui sont des neurones et seulement 4 % d'astrocytes qui expriment le transgène. L'enveloppe Mokola permet de modifier significativement le tropisme du vecteur, 56% des cellules infectées sont des neurones tandis que les astrocytes représentent 32% des cellules infectées. Concernant Rabies, les doubles marquages nous montrent un tropisme majoritairement neuronal avec un faible marquage des astrocytes, ce qui fait de cette enveloppe une option peu favorable au ciblage astrocytaire. Nous n'avons donc pas fait de quantification plus précise concernant cette enveloppe. Mokola est donc chez le rat l'enveloppe permettant le meilleur tropisme astrocytaire bien qu'il reste majoritairement neuronal.

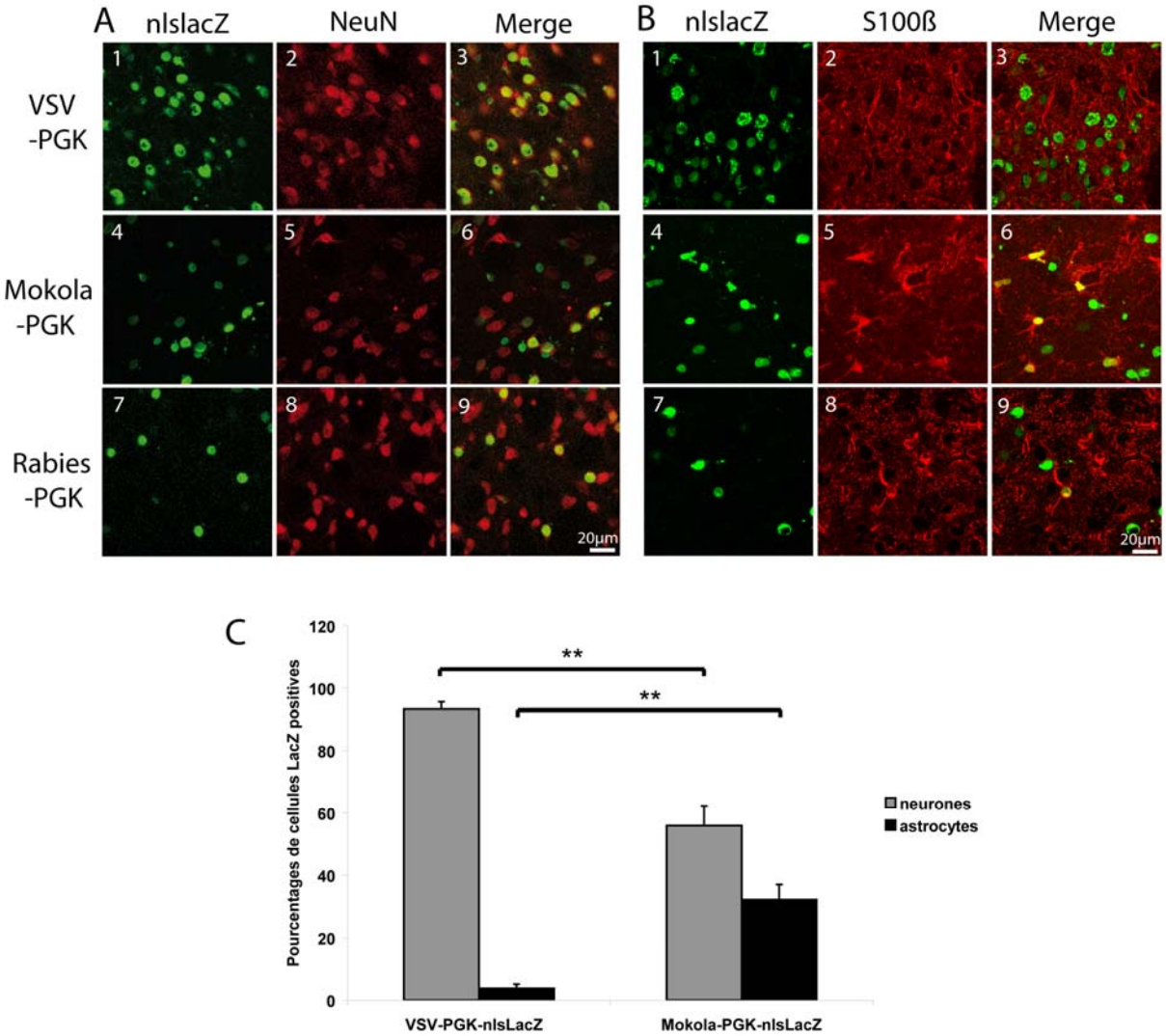


Figure 18: Influence du pseudotypage sur le tropisme neuronal ou astrocytaire des vecteurs lentiviraux chez le rat. Double marquage immunofluorescent de striatum de rats (A: en rouge les neurones marqués avec neuN, B: les astrocytes marqués avec S100ß) après infection avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV(1, 2, 3), Mokola (4, 5, 6) et Rabies (7, 8, 9). Les cellules transduites expriment le transgène ß-galactosidase (en vert). L'utilisation de l'enveloppe Mokola permet de changer significativement le tropisme. Le pourcentage de cellules NeuN-LacZ positives est significativement diminué (56±6% avec Mokola (282/500) contre 93%±2% avec VSV (854/913)), Mann-Whitney U test, p= 0,0039) tandis que celui des cellules S100ß-LacZ positives est significativement augmenté (32±5% avec Mokola (210/657) contre 4%±1% avec VSV (33/834), Mann-Whitney U test, p= 0,0039)(C).

Tropisme in vivo chez la souris

Chez la souris (Figure 19), le tropisme de VSV-PGK reste fortement neuronal avec 93 % de cellules LacZ-NeuN positives et seulement 9 % de S100β-LacZ positives. Au contraire le vecteur pseudotypé avec Mokola possède un tropisme majoritairement astrocytaire avec 18 % de cellules infectées qui sont NeuN positives et 68 % qui sont des astrocytes contrairement au tropisme observé chez le rat. Avec Rabies, le tropisme est légèrement plus astrocytaire que chez le rat mais reste en majorité neuronal, nous avons

éliminé cette option pour la suite de notre étude. Un vecteur pseudotypé avec Mokola reste la meilleure solution pour cibler les astrocytes *in vivo*, particulièrement chez la souris.

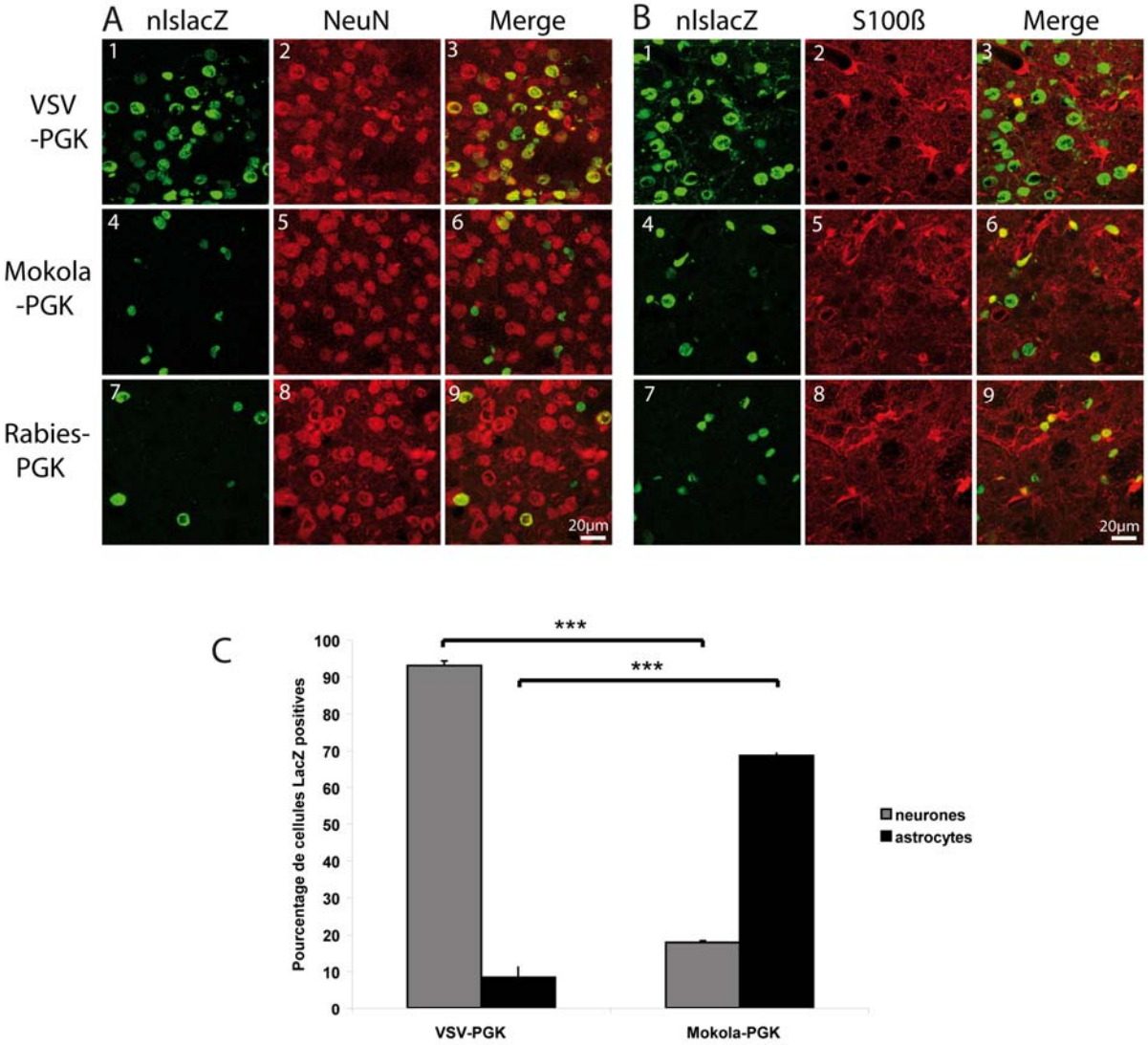


Figure 19 : Influence du pseudotypage sur le tropisme neuronal ou astrocytaire des vecteurs lentiviraux. Double marquage immunofluorescent de striatum de souris (A: en rouge les neurones marqués avec neuN, B: les astrocytes marqués avec S100ß) après infection avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV(1, 2, 3), Mokola (4, 5, 6) et Rabies (7, 8, 9). Les cellules transduites expriment le transgène ß-galactosidase (en vert). L'utilisation de l'enveloppe Mokola permet de diminuer significativement le pourcentage de cellules NeuN-LacZ positives (C) (18±4% (93/520) contre 93±1% avec VSV (1440/1546), Mann-Whitney U test, $p<0.001$). Le pourcentage d'astrocytes est significativement augmenté (68±8% (282/416) contre 9±2% avec VSV (100/1191), Mann-Whitney U test, $p<0.001$).

Amélioration de l'efficacité d'infection des vecteurs pseudotypés avec Mokola

Afin d'augmenter le nombre de cellules infectées par les vecteurs pseudotypés avec Mokola, nous avons injecté dans le striatum de souris différentes quantités de vecteurs. La concentration du vecteur Mokola-PGK est de 135 ng de p24/µl. Les volumes d'injection

testés ont été de 2, 4, 6 et 8µL. Cette expérience nous a montré que le volume maximal d'injection dans le striatum de souris sans qu'il y ait de transfert du vecteur du côté controlatéral est de 4µl. Pour la suite des expériences *in vivo*, nous avons donc injecté un volume de 4µl pour les vecteurs pseudotypés avec Mokola et de 2µl pour les vecteurs pseudotypés avec VSV.

2. Discussion sur le pseudotypage

Lors de nos expériences *in vivo*, nous avons montré que le vecteur pseudotypé avec l'enveloppe VSV avait un tropisme fortement neuronal. Ceci est en accord avec les résultats précédents (Naldini, Blomer et al. 1996; Deglon, Tseng et al. 2000; de Almeida, Zala et al. 2001; Desmaris, Bosch et al. 2001; Mazarakis, Azzouz et al. 2001; Kang, Stein et al. 2002). Concernant l'enveloppe Mokola, nous avons observé un tropisme mixte chez le rat et majoritairement astrocytaire chez la souris.

a. L'efficacité de transduction reflète la capacité d'entrée dans la cellule cible

L'efficacité de transduction observée avec nos trois pseudotypes est très différente. Pourtant, nos vecteurs sont identiques excepté pour les glycoprotéines de l'enveloppe qui permettent la reconnaissance et la fixation aux récepteurs membranaires situés sur la cellule cible et également la fusion des membranes et l'entrée dans la cellule. Dans des conditions comparables d'espèce et de type cellulaire, le niveau d'expression reflète le nombre de copies du transgène exprimées par la cellule donc la facilité avec laquelle le vecteur entre dans la cellule. Nous allons discuter dans les paragraphes suivants les possibles raisons à l'origine des différences observées.

b. Les facteurs influençant l'efficacité de transduction et le tropisme

<u>- Avant toute comparaison…</u>

Il est difficile de comparer les études de différentes équipes concernant les pseudotypes. En effet, d'une étude à l'autre de nombreux facteurs peuvent varier. Nous avons déjà évoqué, en introduction, les différences qui peuvent être liées aux espèces utilisées ou au type de lentivirus utilisés. Mais il existe également des variations au niveau des souches

d'enveloppe utilisées. En effet, une enveloppe Rabies peut être issue de la souche CVS (Wong, Azzouz et al. 2004; Kato, Inoue et al. 2007), ERA (Mazarakis, Azzouz et al. 2001; Wong, Azzouz et al. 2004; notre souche) ou SAD B19 (Mochizuki, Schwartz et al. 1998; Liehl, Hlavaty et al. 2007) et l'enveloppe Mokola peut être issue de la souche provenant du Zimbabwe (Desmaris, Bosch et al. 2001 ; notre souche) ou de l'Ethiopie (Watson, Kobinger et al. 2002). La souche de l'enveloppe utilisée n'est pas toujours précisée dans les articles, ce qui rend leur détermination et leur comparaison d'autant plus complexe.

Les comparaisons de l'efficacité de transduction du pseudotype se font en infectant des cellules avec des titres équivalents. Or, les techniques de titration sont variables d'une étude à l'autre. Il existe deux catégories de méthodes de titration, la quantification du nombre de particules virales et la quantification du pouvoir de transduction. Il existe des mesures du nombre de particules présentes déterminées par RT-PCR pour quantifier l'ARN viral (Scherr, Battmer et al. 2001), par ELISA pour déterminer la quantité de la protéine de structure p24 (Mochizuki, Schwartz et al. 1998; Logan, Nightingale et al. 2004 ; notre méthode de titration) ou encore par mesure de l'activité de l'enzyme reverse transcriptase (Liehl, Hlavaty et al. 2007). Ces méthodes donnent une quantité relative de particules infectieuses puisque seulement une faible proportion des particules possédant par exemple la protéine p24 peut permettre une transduction. D'autres méthodes permettent de mesurer les titres fonctionnels car elles sont directement basées sur l'expression du transgène dans des cellules infectées (Zhang, La Russa et al. 2002) ou sur le nombre de copies intégrées dans l'ADN des cellules transduites (Sastry, Johnson et al. 2002). Dans les études citées ci-dessus, la titration se fait en fonction de l'expression du transgène dans différentes lignées cellulaires. Ces lignées ainsi que le transgène utilisé (β-galactosidase, GFP) peuvent influencer le titre obtenu (Desmaris, Bosch et al. 2001). Titrer sur une lignée cellulaire ne reflète pas seulement l'infectivité des particules mais également la capacité de la lignée cellulaire choisie à être transduite, l'abondance ou l'accessibilité des récepteurs avec lesquelles interagissent les protéines de l'enveloppe. Ces récepteurs peuvent varier d'une lignée cellulaire à l'autre, certaines titrations peuvent donc être sous-estimées ou surestimées. Généralement, une lignée cellulaire est choisie pour sa facilité d'infection et non pas pour sa représentativité de ce qui se passera lors de son utilisation, *in vivo* par exemple. Pour des études *in vitro*, ce type de titration peut-être efficace, cependant pour des études *in vivo*, il me semble plus pertinent d'utiliser un titre relatif du nombre de particules.

Il est donc important de considérer ces points pour comparer nos résultats à la bibliographie. Il semblerait que pour de nombreuses études, l'enveloppe Rabies aussi bien *in*

vitro qu'*in vivo* ait une efficacité de transduction plus faible que VSV (Mochizuki, Schwartz et al. 1998; Mazarakis, Azzouz et al. 2001; Watson, Kobinger et al. 2002; Wong, Azzouz et al. 2004; Liehl, Hlavaty et al. 2007). Concernant le vecteur Mokola, nos résultats sont en accord avec les résultats publiés par d'autres équipes. L'efficacité de transduction est plus faible qu'avec VSV (Mochizuki, Schwartz et al. 1998; Desmaris, Bosch et al. 2001; Wong, Azzouz et al. 2004). Une autre étude montre une efficacité d'infection plus élevée mais les vecteurs ne sont pas identiques (les séquences cPPT et WPRE manquent dans le vecteur VSV, ce qui peut diminuer l'efficacité) et la souche utilisée est différente également (souche Mokola provenant de l'Ethiopie ; Watson, Kobinger et al. 2002). De plus, le titre fonctionnel a été mesuré sur des lignées cellulaires différentes.

Concernant l'enveloppe Mokola, nous avons montré que 56% des cellules infectées sont des neurones et 32% des astrocytes chez le rat. Une autre étude a quantifié le tropisme de l'enveloppe Mokola (Desmaris, Bosch et al. 2001). Ces auteurs montrent que chez le rat, 71% des cellules infectées sont des neurones et 13 % des astrocytes. Le pourcentage de neurones est relativement équivalent et les différences du pourcentage d'astrocytes peuvent être dues aux marqueurs astrocytaires utilisés (notre marqueur est S100β alors que Desmaris et al. utilisent GFAP). D'autre part, ces différences peuvent également être dues à l'utilisation du promoteur CMV au lieu de PGK. D'autres études montrent que l'utilisation de Mokola induit une transduction préférentiellement astrocytaire (Watson, Kobinger et al. 2002; Pertusa, Garcia-Matas et al. 2008) mais aucune quantification n'a été faite.

<u>- La production virale influence la transduction</u>

Le pseudotypage peut influencer l'efficacité d'infection à l'étape de la production virale. En effet, plusieurs études montrent que la production des vecteurs pseudotypés avec Mokola ou Rabies fournit des vecteurs moins infectieux que ceux produits aves VSV (Mochizuki, Schwartz et al. 1998; Mitrophanous, Yoon et al. 1999; Desmaris, Bosch et al. 2001; Sena-Esteves, Tebbets et al. 2004; Wong, Azzouz et al. 2004; Liehl, Hlavaty et al. 2007). Plusieurs explications sont avancées, la résistance du pseudotype lors de la production (notamment l'étape d'ultracentrifugation) ou l'assemblage des particules peuvent être différents selon les pseudotypes. En effet, les particules des vecteurs pseudotypés avec VSV sont plus nombreuses, mieux assemblées avec les protéines de l'enveloppe et mieux libérées (Desmaris, Bosch et al. 2001). Cette différence d'infectivité peut être due à

une diminution de l'incorporation de la protéine G de l'enveloppe Mokola dans la particule. De plus, les oligomères de protéine G de Mokola sont moins stables que ceux de VSV (Desmaris, Bosch et al. 2001) ce qui peut engendrer des différences d'interactions avec leurs récepteurs spécifiques et des perturbations dans le processus de fusion. En outre, l'efficacité de transduction de VSV est influencée par le fait que cette protéine stimule le processus de fusion (Sharma, Miyanohara et al. 2000) et donc facilite son entrée dans la cellule.

- Les récepteurs spécifiques aux glycoprotéines virales influencent le tropisme et la capacité de transduction d'un vecteur

Les enveloppes VSV, Rabies et Mokola font partie de la même famille, les Rhabdovirus. Leur voie d'entrée dans la cellule se fait par interaction de la protéine G avec un récepteur membranaire. Comme évoqué précédemment, l'efficacité de transduction est dépendante du type de récepteur avec lequel interagissent les protéines de l'enveloppe. Une efficacité moindre peut être due à une abondance plus faible ou une accessibilité réduite des récepteurs. Malheureusement, peu de récepteurs ont été déterminés. Le récepteur de la protéine G de l'enveloppe VSV reste encore à déterminer (Coil and Miller 2004; Da Poian, Carneiro et al. 2005; Carneiro, Lapido-Loureiro et al. 2006). Rabies interagit avec beaucoup de récepteurs neuronaux, la neurotrophine p75 de faible affinité, des molécules d'adhésion cellulaires neuronales, les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (Lentz, Benson et al. 1986; Thoulouze, Lafage et al. 1998; Tuffereau, Benejean et al. 1998). Le récepteur p75 est exprimé faiblement dans le striatum (Wong, Azzouz et al. 2004) ce qui pourrait expliquer la faible capacité d'infection de Rabies et son tropisme préférentiellement neuronal. Le récepteur de la protéine Mokola n'a pas été déterminé. Il est possible que son récepteur soit préférentiellement exprimé dans les astrocytes et plus faiblement dans les neurones et inversement pour VSV.

La possibilité que ces glycoprotéines aient pour récepteurs des composés lipidiques distribués de façon ubiquitaire a été évoquée mais reste encore à prouver (Desmaris, Bosch et al. 2001 ; Coil and Miller 2004; Da Poian, Carneiro et al. 2005; Carneiro, Lapido-Loureiro et al. 2006). Cette hypothèse pourrait laisser penser que les différences de tropisme observées peuvent être également dues à l'influence de facteurs cellulaires agissant sur la transduction de la cellule.

- Les facteurs de restriction cellulaires influencent le tropisme des vecteurs

Il y a une différence importante du tropisme entre le rat et la souris avec le même vecteur. Ceci se retrouve entre l'étude de Desmaris et al. et l'étude de Watson et al.. pour l'enveloppe Mokola, ou encore pour l'enveloppe Rabies (Mazarakis, Azzouz et al. 2001; Wong, Azzouz et al. 2004; Kato, Inoue et al. 2007; Liehl, Hlavaty et al. 2007). Ces différences peuvent être dues, d'une part, à la répartition des récepteurs ou l'accessibilité qui peuvent varier d'une espèce à l'autre, d'autre part de nombreux facteurs exprimés par la cellule hôte peuvent influencer l'infection des rétrovirus et a fortiori des vecteurs dérivés (pour revue Nisole and Saib 2004; Goff 2007). Ils peuvent agir à différents étapes du processus de la fixation au récepteur membranaire jusqu'à l'intégration dans le génome de l'hôte.

Au niveau de l'entrée dans la cellule, le modèle le mieux étudié est la souris et ses gènes permettant une résistance au virus de type MLV (murine leukemia virus). Il a été montré que l'expression d'un variant du récepteur à la glycoprotéine de l'enveloppe MLV permettait une interaction plus faible avec l'enveloppe du virus. Un autre mécanisme permet la mise en place d'un mécanisme d'interférence. La cellule exprime une glycoprotéine similaire à la glycoprotéine du virus MLV qui entre ainsi en compétition avec le récepteur. Ce genre de mécanisme pourrait exister pour les enveloppes des Rhabdovirus et être un facteur influençant le tropisme des enveloppes (Goff 2007).

Les virus sauvages du genre lyssavirus (Rabies, Mokola) ont un tropisme fortement neuronal. Cependant, il ne suffit pas d'utiliser leur enveloppe pour reproduire leur tropisme neuronal (Desmaris, Bosch et al. 2001) comme le confirme nos résultats. Ceci laisse penser que d'autres facteurs intracellulaires agissent sur la transduction après l'entrée du vecteur dans la cellule hôte.

Le facteur Friends virus susceptibily factor 1 (Fv1) chez la souris empêche l'infection de rétrovirus en ciblant les protéines de la capside qui entrent dans la cellule. Cette fixation entraine l'inhibition de la rétrotranscription et de l'intégration (Hatziioannou, Cowan et al. 2004; Hatziioannou, Perez-Caballero et al. 2004). Chez l'Homme, il existe le facteur Ref1 (restriction facteur 1), chez le macaque, TRIM5α qui permet au macaque d'être résistant à l'infection du VIH. Il existe de nombreux variants espèces-spécifiques de ces facteurs (Stremlau, Perron et al. 2005; Kratovac, Virgen et al. 2008). L'existence de ce type de facteur pourrait inhiber la transduction neuronale de notre vecteur dérivé du VIH, chez la souris et ainsi modifier le tropisme. En effet, il a été rapporté que des vecteurs dérivés du SIV

transduiraient moins efficacement des lignées neuronales murines que celles d'autres espèces (Liehl, Hlavaty et al. 2007), le SIV aurait des facteurs de restriction spécifiques chez la souris (Hatziioannou, Cowan et al. 2004). *In vitro* et *in vivo*, la répression de la transduction par des facteurs de restriction peut dépendre de l'espèce transduite et du type cellulaire (Hatziioannou, Cowan et al. 2004; Liehl, Hlavaty et al. 2007; Kahl, Cannon et al. 2008). Les variations d'expressions ou de spécificité de ces facteurs entre espèces et entre types cellulaires pourraient être un facteur important dans le tropisme de nos vecteurs. De plus, de nombreux autres facteurs, outre TRIM5α, sont impliqués dans la restriction des infections lentivirales. La cyclophiline A se lie aux protéines de la capside du virus et inhibe l'infection dans les cellules ciblées (Kahl, Cannon et al. 2008). Le facteur Lv2 inhibe l'infection du VIH dans cellules épithéliales et les macrophages humains (Schmitz, Marchant et al. 2004). Ces restrictions peuvent être dépendantes de la capside, de l'enveloppe et de la voie d'entrée médiée par le récepteur. Il existe encore d'autre facteurs de restriction impliqués dans la spécificité cellulaire qui n'ont pas été identifiés (Kahl, Cannon et al. 2008). Cette voie de recherche, outre l'influence sur le tropisme des vecteurs, a des intérêts très importants dans l'étude du VIH, de ces modèles et des potentiels thérapeutiques.

L'existence de ces facteurs peut également être intéressante dans le développement d'un outil de transfert de gène espèce spécifique ou cellule spécifique. L'expression d'un gène codant pour le facteur TRIM5α, sous le contrôle d'un promoteur neurone-spécifique pourrait inhiber la transduction d'un vecteur dérivé du VIH. Ainsi, après transduction par le vecteur contenant le transgène, l'expression du transgène serait spécifiquement astrocytaire.

En conclusion, dans cette partie nous avons réussi à obtenir un vecteur ciblant majoritairement les astrocytes (68%) avec une efficacité de transduction importante. Cependant, le pourcentage de neurones exprimant le transgène est encore significatif, il semble alors important d'y associer un autre outil pour restreindre cette expression neuronale.

B. Association avec différents promoteurs : PGK, CMV et EAAT1

Afin de réduire l'expression du transgène dans les neurones, nous avons testé trois promoteurs. Le promoteur PGK, utilisé dans la partie précédente, le promoteur CMV (cytomégalovirus) qui pourrait avoir un tropisme astrocytaire dans certaines conditions et le promoteur EAAT1 (transporteur au glutamate GLAST) spécifique des astrocytes. Nous avons testé ces promoteurs avec l'enveloppe VSV et l'enveloppe Mokola.

1. Résultats : Changement de promoteur

Nous avons, comparé l'efficacité de transduction et le tropisme de différents vecteurs possédant une même enveloppe, le promoteur étant la seule chose qui change. Les différences observées seront attribuables uniquement aux différences d'efficacité de transcription des promoteurs, l'entrée dans la cellule est inchangée.

a. Influence du promoteur *in vitro*

Des cocultures de neurones et d'astrocytes de striatum de rats ont été infectées puis un double marquage immunofluorescent a été effectué. Trois promoteurs ont été testés avec deux pseudotypes différents : les vecteurs pseudotypés avec VSV : VSV-PGK, VSV-CMV et VSV-EAAT1 et les vecteur pseudotypés avec Mokola : Mokola-PGK, Mokola-CMV et Mokola-EAAT1.

Nous avons visualisé l'efficacité d'infection de chaque vecteur avec un marquage β-galactosidase (Figure 20). Comme le montre les images, le promoteur CMV conduit à un taux d'expression du transgène beaucoup plus faible que PGK que ce soit avec l'enveloppe VSV ou Mokola. Le niveau d'expression du promoteur EAAT1 est légèrement plus faible que celui du promoteur CMV. La combinaison Mokola-EAAT1 conduit à une expression du transgène très limitée. Concernant l'influence des promoteurs sur le tropisme, les doubles marquages ne montrent pas de préférence astrocytaire ni avec CMV ni avec EAAT1 (Figure 20A-B). Avec Mokola-EAAT1 (Figure 20C-D), une préférence astrocytaire est observée comparable à celle obtenue avec Mokola-PGK (Figure 20C-D) mais les taux d'expression dans les neurones et dans les astrocytes sont plus faibles. Etant donné le faible taux d'expression ainsi que le tropisme qui reste majoritairement neuronal, nous avons éliminé le promoteur CMV de nos options pour la construction d'un vecteur lentiviral ciblant

les astrocytes. Pour la suite des expériences *in vivo*, nous avons testé le promoteur EAAT1 en comparaison avec PGK.

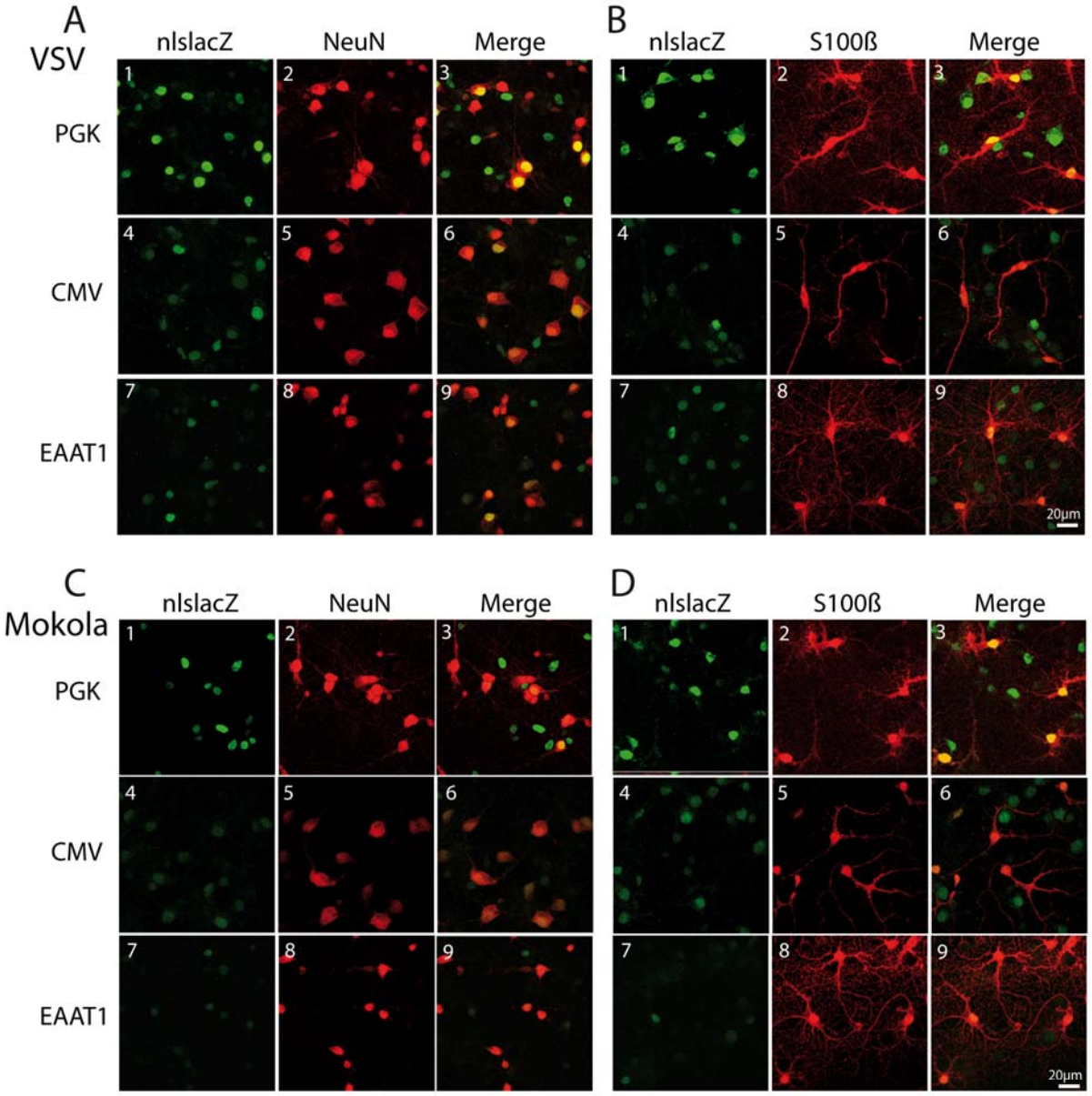


Figure 20: Influence du promoteur sur l'efficacité de transduction et le tropisme des vecteurs lentiviraux. Double marquage immunofluorescent de cocultures (A et C : en rouge les neurones marqués avec neuN, B et D : les astrocytes marqués avec S100ß) après infection avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV (A et B) ou Mokola (C et D). Les cellules transduites expriment le transgène ß-galactosidase (en vert). Le nombre de cellules exprimant le transgène ainsi que le niveau d'expression sont les plus élevés lorsque le transgène est sous contrôle du promoteur PGK. Ces valeurs sont faibles avec CMV et EAAT1 aussi bien avec un pseudotypage VSV que Mokola. Les promoteurs CMV (4, 5, 6) et EAAT1 (7, 8, 9) avec l'enveloppe Mokola et avec VSV ne procurent pas une spécificité astrocytaire importante en comparaison avec PGK (1, 2, 3) alors que le taux d'expression baisse de façon importante.

b. Influence du promoteur *in vivo*

Des rats et des souris ont reçu des injections stéréotaxiques de vecteur lentiviral au niveau du striatum. Ces animaux ont été injectés avec les vecteurs VSV-PGK et VSV-EAAT1. Trois semaines après l'injection, les animaux sont sacrifiés.

<u>-Effet du promoteur sur l'expression du transgène</u>

Les coupes de cerveaux de rats et de souris ont subi un marquage immunohistochimique permettant de visualiser la protéine β-galactosidase afin de déterminer l'étendue de la zone d'infection dans le striatum des animaux.

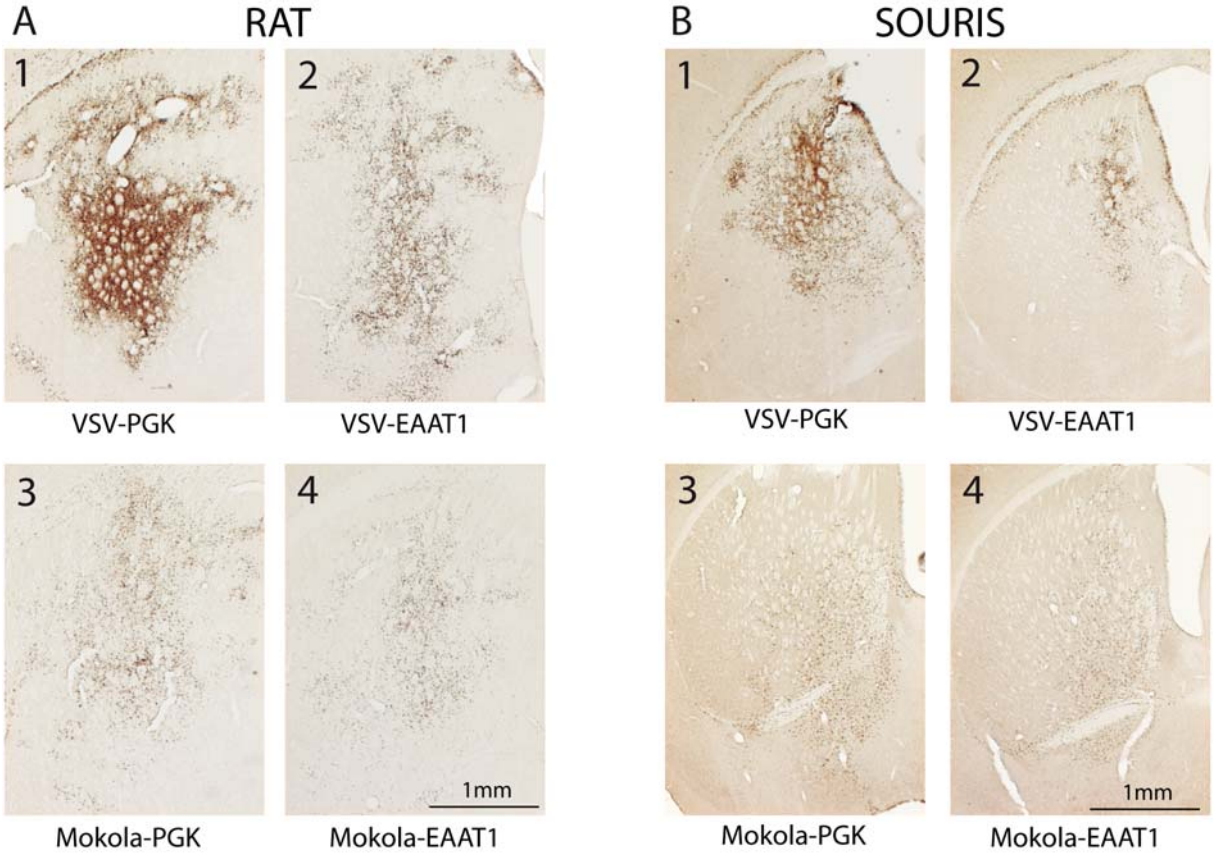


Figure 21 : L'efficacité d'expression est influencée par le promoteur *in vivo*. Immunohistochimie de la protéine ß-galactosidase dans le striatum de rats (A) et de souris (B) après infection par des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV (1, 2)ou Mokola (3, 4) avec le promoteur PGK (1, 3) ou EAAT1 (2, 4). Le nombre de cellules exprimant le transgène et le niveau d'expression sont plus élévés avec PGK que EAAT1que ce soit avec VSV ou Mokola. La combinaison Mokola et EAAT1 montre une efficacité d'infection très faible.

Chez le rat comme chez la souris (Figure 21), la plus forte efficacité d'infection s'observe avec VSV-PGK. Le niveau d'expression est très important, les prolongements neuritiques sont marqués. Avec VSV-EAAT1, l'intensité du marquage est plus faible et il est limité aux noyaux des cellules infectées mais le niveau d'expression du transgène et le nombre de cellules infectées restent importants. Etant donné que ce vecteur infecte à 93 % des neurones, ceci suggère une régulation du promoteur qui n'est pas spécifique des astrocytes. Notons également que bien que la dose de vecteur Mokola soit le double de celle de VSV, l'efficacité d'infection reste plus faible. Le marquage observé avec Mokola-EAAT1 est très faible, probablement trop faible pour pouvoir par la suite espérer un effet fonctionnel avec un autre transgène.

-Effet du promoteur sur le tropisme

Un double marquage immunofluorescent a été effectué sur les coupes de cerveau de rats et de souris permettant de visualiser les cellules exprimant le transgène nlsLacZ (en vert) et les astrocytes grâce au marqueur S100β ou bien les neurones avec le marqueur NeuN (en rouge).

Tropisme in vivo chez le rat

Chez le rat (Figure 22), nous pouvons voir que le tropisme de VSV-EAAT1 est fortement neuronal, ce qui confirme les observations précédentes. Cette combinaison enveloppe VSV-promoteur EAAT1 n'est pas favorable au ciblage astrocytaire. Le remplacement du promoteur PGK par le promoteur EAAT1 associé à l'enveloppe Mokola ne change pas le tropisme de cette construction, il y a toujours une majorité de neurones marqués cependant le taux d'expression est généralement plus faible en comparaison avec les astrocytes. Cette combinaison Mokola-EAAT1 n'est malgré tout pas assez intéressante pour poursuivre les expérimentations. En effet, le faible bénéfice apporté par le promoteur ne suffit pas à compenser la forte diminution du niveau de l'efficacité d'infection. Nous n'avons donc pas fait de quantification plus précise concernant ce promoteur.

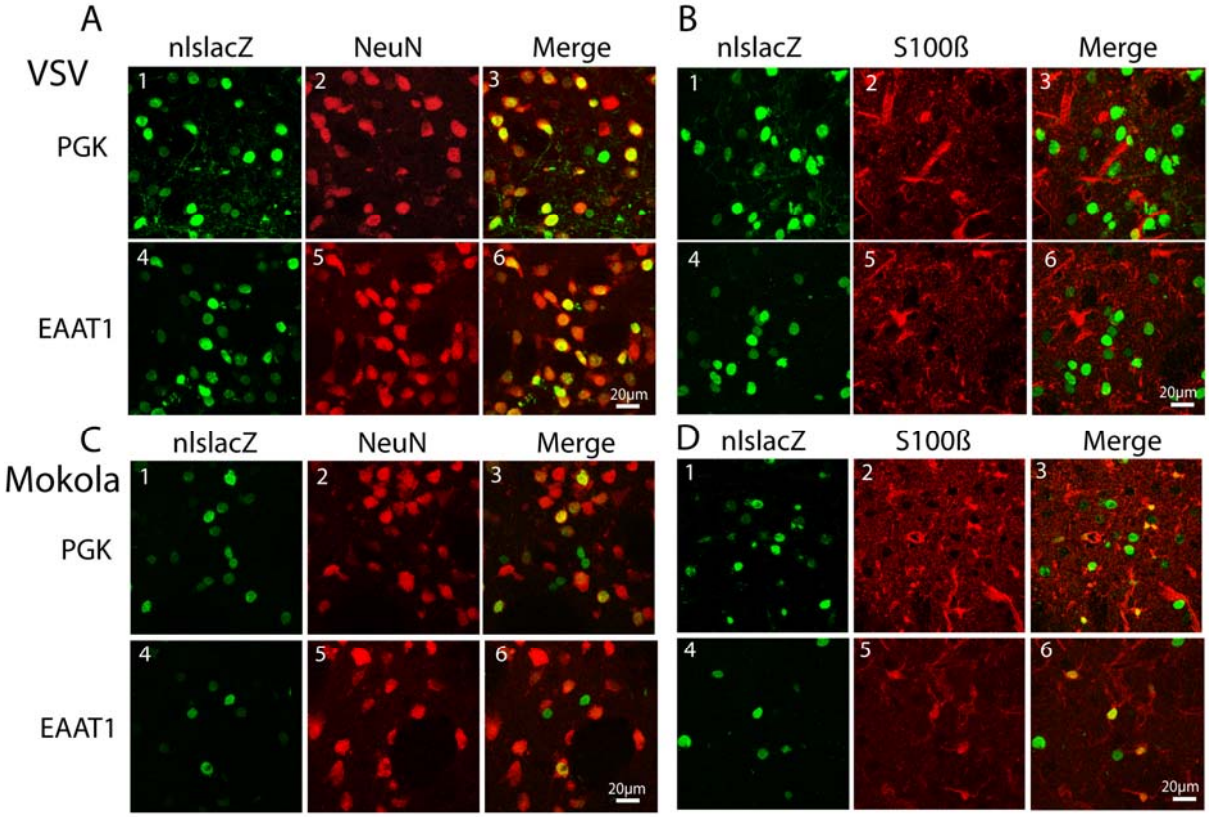


Figure 22 : Influence du promoteur sur le tropisme neuronal ou astrocytaire des vecteurs lentiviraux chez le rat. Double marquage immunofluorescent striatum de rats (A et C : en rouge les neurones marqués avec neuN, B et D : les astrocytes marqués avec S100ß) après infection avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV (A et B) ou Mokola (C et D). Les cellules transduites expriment le transgène ß-galactosidase (en vert). Le promoteur EAAT1 (4, 5, 6) avec l'enveloppe Mokola et avec VSV ne procure pas une spécificité astrocytaire importante en comparaison de PGK (1, 2, 3) alors que le taux d'expression baisse de façon importante.

Tropisme in vivo chez la souris

Chez la souris (Figure 23), comme chez le rat, le tropisme de VSV-EAAT1 reste fortement neuronal. Le promoteur n'est pas assez restrictif pour éviter l'expression du transgène dans les neurones avec ce pseudotypage. Concernant le vecteur Mokola-EAAT1, les doubles marquages ne montrent pas d'amélioration dans le tropisme astrocytaire alors que l'efficacité d'infection est très faible. En effet, après quantification, le pourcentage de cellules LacZ-NeuN positives ne change pas significativement avec Mokola-EAAT1. Il en est de même pour le pourcentage de cellules S100β-LacZ. Nous avons éliminé cette option pour la suite de notre étude. Le vecteur Mokola-PGK est donc le meilleur compromis entre efficacité d'infection et tropisme astrocytaire.

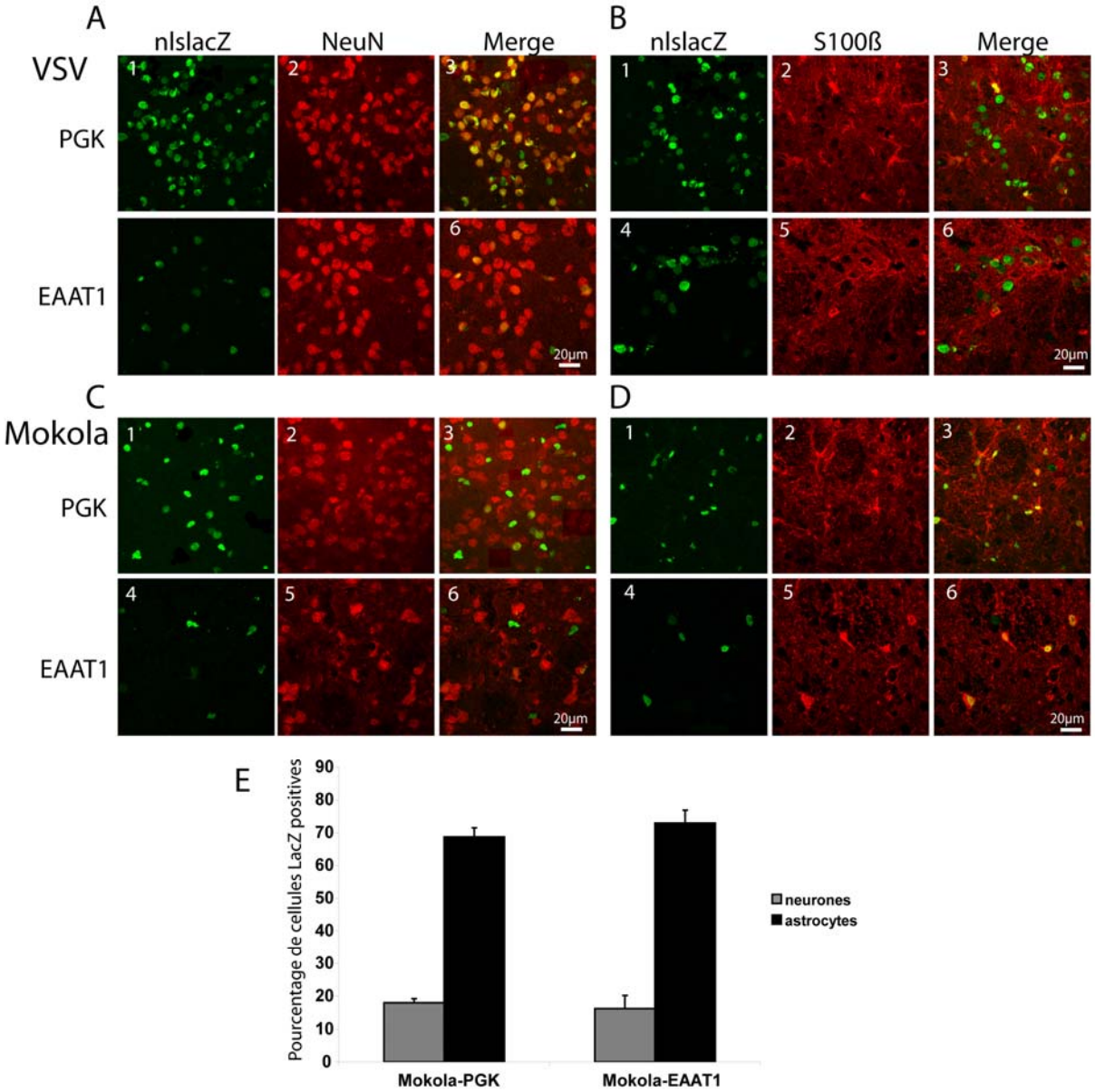


Figure 23 : Influence du promoteur sur le tropisme neuronal ou astrocytaire des vecteurs lentiviraux chez la souris. Double marquage immunofluorescent striatum de souris (A et C : en rouge les neurones marqués avec neuN, B et D : les astrocytes marqués avec S100ß) après infection avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV (A et B) ou Mokola (C et D). Les cellules transduites expriment le transgène ß-galactosidase (en vert). Le promoteur EAAT1 (4, 5, 6) avec l'enveloppe VSV ne procure pas une spécificité astrocytaire, le tropisme reste majoritairement neuronal. Le promoteur EAAT1 (4, 5, 6) avec l'enveloppe Mokola ne procure pas une spécificité astrocytaire en comparaison avec le promoteur PGK (1, 2, 3) alors que le taux d'expression baisse de façon importante. Cette observation est confirmée par les quantifications du pourcentage de cellules LacZ-NeuN positives (E) qui ne diffère pas entre Mokola-EAAT1et Mokola-PGK (respectivement, 16±4% (74/468) et 18±4% (93/520); test U Mann-Whitney ; p=0,2164). Il en est de même pour le pourcentage de cellules LacZ-S100ß positives (72±4% (320/436) et 68±8% (282/416) ; test U Mann-Whitney ; p=0,1223).

2. Discussion sur les promoteurs

Dans cette partie, nous avons comparé l'efficacité et le tropisme des promoteurs PGK, CMV et EAAT1. Nous avons montré que le meilleur niveau d'expression est obtenu avec le promoteur PGK. Les promoteurs CMV et EAAT1 induisent un niveau d'expression faible du transgène. Nous avons également pu observer que ni le promoteur CMV ni le promoteur EAAT1 ne permettaient une expression spécifiquement astrocytaire du transgène. Nous en sommes venu à la conclusion que l'utilisation du promoteur PGK avec l'enveloppe Mokola, choisie pour son tropisme astrocytaire dans la partie précédente, était le meilleur outil afin d'obtenir un ciblage astrocytaire efficace et un niveau d'expression important.

Le promoteur PGK est un promoteur ubiquitaire de mammifères qui permet un niveau d'expression important dans de nombreux types cellulaires notamment les cellules du SNC (Deglon, Tseng et al. 2000; de Almeida, Zala et al. 2001; Kostic, Chiodini et al. 2003; Hong, Hwang et al. 2007). Nos résultats montrent que ce promoteur permet une expression élevée dans les astrocytes lorsqu'il est utilisé avec un pseudotypage Mokola. Nos résultats montrent une efficacité très réduite du promoteur CMV, ce qui est en contradiction avec de nombreuses études montrant que ce promoteur est un promoteur fort. Le promoteur CMV est issu du cytomégalovirus. Il est utilisé avec de nombreux types de vecteurs viraux pour induire une expression forte du transgène (Naldini, Blomer et al. 1996; Smith, Traul et al. 2000; Watson, Kobinger et al. 2002; Wong, Azzouz et al. 2004; Jakobsson and Lundberg 2006; Liu, Pernod et al. 2006; Greenberg, Geller et al. 2007; Kuroda, Kutner et al. 2008). L'enhancer de ce promoteur est même utilisé pour augmenter l'expression de transgènes avec un promoteur spécifique faible (Liu, Wang et al. 2004; Wang and Wang 2006; Gruh, Wunderlich et al. 2008 ; Iyer, Wu et al. 2001; de Leeuw, Su et al. 2006; Liu, Yang et al. 2006; Liu, Paton et al. 2008; Liu, Wang et al. 2008). Cependant, ce promoteur est un promoteur d'origine virale qui est régulé par plusieurs facteurs de transcription endogènes de la cellule transduite comme le facteur NFκB ou CREB (pour revue, Stinski and Isomura 2008)). De plus, son activité comme son tropisme peuvent être influencés par l'espèce animale, les cellules voisines, le type cellulaire (Voir introduction, Addison, Hitt et al. 1997; Sarkis, Serguera et al. 2000; Smith, Traul et al. 2000; Kugler, Meyn et al. 2001; Brooks, Harkins et al. 2004; Kasparov, Teschemacher et al. 2004; Li, Yang et al. 2005; Allen, Dosanjh et al. 2006; Jakobsson and Lundberg 2006). Ces différents facteurs peuvent influencer le niveau d'expression induit par ce promoteur et pourraient être une explication aux différences obtenues. Cependant, certaines études utilisant des AAV sont en accord avec nos résultats et montrent que ce promoteur viral

est moins efficace que des promoteurs internes de mammifères comme le promoteur NSE ou GFAP (Peel, Zolotukhin et al. 1997; Klein, Meyer et al. 1998; Xu, Janson et al. 2001). La construction du vecteur et notamment les séquences adjacentes au promoteur pourraient avoir une influence sur son activité. Il semblerait que de nombreux facteurs entrent en jeu dans la régulation de ce promoteur et qu'il soit plus sûr d'utiliser un promoteur interne comme PGK dont l'expression ne varie pas comme celle du CMV. Concernant le tropisme du promoteur CMV, variable selon les régions, nos résultats sont en accord avec le tropisme neuronal obtenu précédemment dans le striatum (Naldini, Blomer et al. 1996; Blomer, Naldini et al. 1997; Watson, Kobinger et al. 2002; Wong, Azzouz et al. 2004; Jakobsson and Lundberg 2006).

Le promoteur EAAT1 ne permet qu'un niveau d'expression faible et n'apporte pas de spécificité astrocytaire au vecteur. La faible expression du transgène est en accord avec le fait que lors de transfert de gène par vecteurs viraux l'expression induit par des promoteurs cellules-spécifiques est généralement faible (Morelli, Larregina et al. 1999; Iyer, Wu et al. 2001; Biglari, Bataille et al. 2004; Liu, Wang et al. 2004; Gruh, Wunderlich et al. 2008). Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer le manque de spécificité de ce promoteur spécifique des astrocytes dans nos vecteurs lentiviraux. L'utilisation d'un vecteur préférentiellement neuronal contenant un promoteur astrocytaire ne permet pas une expression astrocytaire à cause d'une transduction neuronale trop forte, comme c'est le cas pour VSV (Xu, Janson et al. 2001). L'influence du site d'intégration sur l'expression du transgène pourrait également être une explication (Lai, Han et al. 2002; Cucchiarini, Ren et al. 2003; Su, Hu et al. 2004). De plus, la grande spécificité astrocytaire du transporteur EAAT1 serait due non seulement à une régulation transcriptionnelle par son promoteur mais également à une régulation posttranscriptionelle (Kim, Choi et al. 2003). Ces données expliqueraient que l'utilisation du promoteur avec un transgène autre que le transporteur GLAST ne conduit pas à une expression spécifiquement astrocytaire. Il serait intéressant d'étudier la spécificité procurée par ce promoteur lorsqu'il exprime GLAST. D'autant plus que la surexpression de ce transporteur est une des applications analysées dans le cadre de ma thèse (voir chapitre VI).

Le nombre de promoteurs caractérisés reste limité mais une étude récente a permis d'identifier de nombreux gènes spécifiques des astrocytes dont les promoteurs pourraient être utilisés comme outil de transfert de gène dans le SNC (Cahoy, Emery et al. 2008).

D'autre part, diverses stratégies ont été proposées afin d'augmenter le niveau d'expression induit par des promoteurs spécifiques tout en gardant leur spécificité (Wang and Wang 2006 ;

de Leeuw, Su et al. 2006; Liu, Yang et al. 2006; Liu, Paton et al. 2008; Liu, Wang et al. 2008). Ces voies de recherche sont prometteuses et produisent des outils efficaces au ciblage astrocytaire.

En conclusion, l'association du promoteur PGK avec l'enveloppe Mokola permet d'obtenir une expression importante du transgène mais ne donne pas un gain de spécificité. L'utilisation d'un autre outil pour restreindre l'expression du transgène aux astrocytes doit être envisagée.

C. Incorporation d'une cible du miR124 pour restreindre l'expression du transgène dans les neurones

Les études précédentes ont montré les difficultés pour modifier le tropisme des vecteurs lentiviraux VIH-1. Afin de résoudre ce problème, nous avons mis au point une stratégie afin de diminuer l'expression du transgène uniquement dans les neurones afin d'améliorer indirectement le ciblage astrocytaire. Pour cela, nous avons incorporé dans la partie 3' non traduite du génome viral, la séquence d'une cible du microARN miR124 (miR124T). Le miR124 est un petit ARN exprimé exclusivement dans les neurones. Le miR124 permet en s'appariant à sa cible, contenue dans la partie 3' non traduite des ARNm, de diminuer l'expression de l'ARNm ciblé. Théoriquement, lorsque notre vecteur transduira un astrocyte, l'ARNm du transgène se produira normalement et la protéine également. Au contraire, lorsque notre vecteur transduira un neurone, l'ARNm du transgène s'appariera avec le miR124 endogène et inhibera l'expression du transgène spécifiquement dans les neurones (Figure 24). De nombreux logiciels déterminant les cibles potentielles d'un miR existent et sont basés sur des algorithmes différents (pour revue Rajewsky 2006) et donnent des résultats qui peuvent varier d'une base à l'autre. Il est difficile de les confirmer toutes expérimentalement. En ce qui concerne le miR124, plusieurs études montrent que l'ITG-β1 est une des cibles les plus réprimées par ce miR (Lim, Lau et al. 2005; Cao, Pfaff et al. 2007; Yu, Chung et al. 2008). Nous avons donc choisi d'utiliser cette cible, expérimentalement confirmée, et d'intégrer la séquence cible dans notre vecteur. Dans une première partie, nous avons choisi les constructions les plus efficaces *in vitro* puis nous avons étudié la spécificité et les mécanismes de régulation de cet outil. Par la suite, nous avons étudié l'efficacité *in vivo*. Dans cette partie, correspondant à la preuve de principe de ce moyen de régulation, nous avons utilisé des vecteurs pseudotypés avec VSV afin d'avoir une quantité importante de neurones infectés et donc de déterminer l'efficacité de notre méthode.

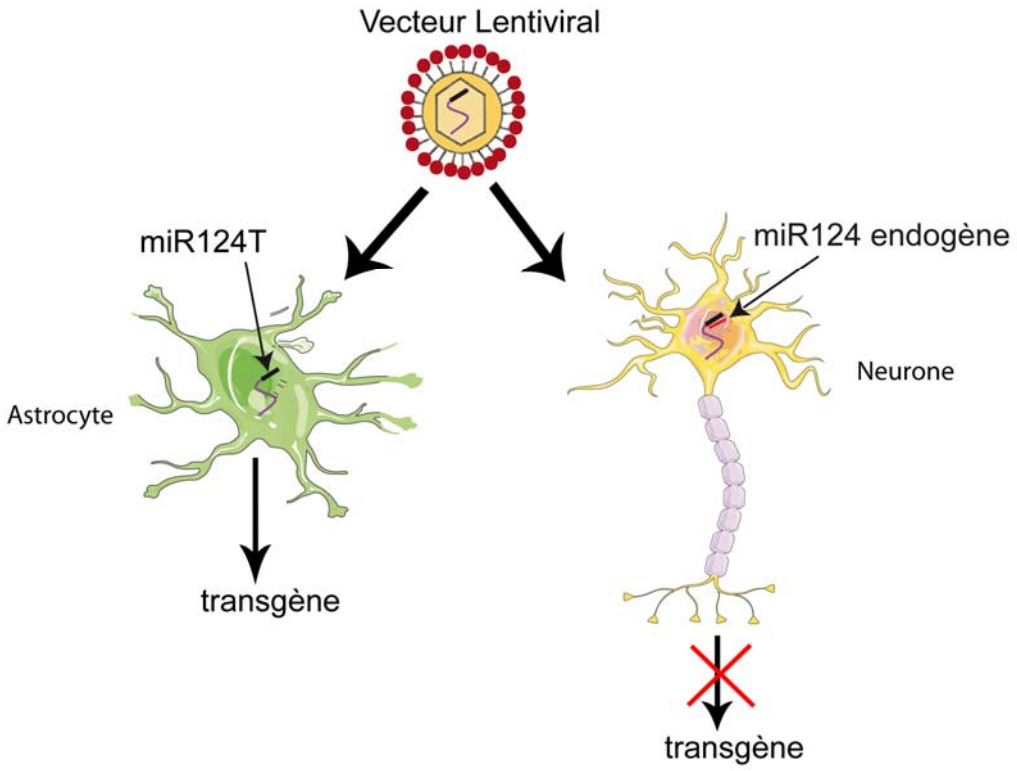


Figure 24: Utilisation de la cible du miR124 pour restreindre l'expression d'un transgène dans les astrocytes. Une cible du miR124 (miR124T) a été insérée dans la partie 3'non traduite du vecteur. Lorsque le vecteur transduit un astrocyte, il y a expression normale du transgène car l'astrocyte n'exprime pas le miR124. Au contraire, lorsque le vecteur transduit un neurone, l'ARNm du transgène s'apparie au miR124 endogène et l'expression du transgène est inhibée.

1. Résultats concernant l'insertion de la cible du miR124

a. Efficacité *in vitro* des différentes constructions

L'efficacité de répression contenant des cibles de miR augmente avec le nombre de copies de la cible. Nous avons construit plusieurs vecteurs contenant une, deux ou quatre copies de la cible du miR124, respectivement VSV-PGK-miR124T1, VSV-PGK-miR124T2, VSV-PGK-miR124T4. Nous avons construit également une cible modifiée contenant à l'extrémité 3' une adénosine. La présence d'une adénosine à l'extrémité 3' de la séquence cible, même si elle ne s'apparie pas au miR, semble augmenter l'effet répresseur du miR (Wu and Belasco 2005). Nous avons donc construit des vecteurs avec une, deux ou quatre copies de la cible du miR124 avec l'adénosine, respectivement VSV-PGK-miR124T(A)1, VSV-PGK-miR124T(A)2, VSV-PGK-miR124T(A)4. Des cocultures de

neurones et d'astrocytes de striatum de rats ont été infectées avec les différents vecteurs puis un double marquage immunofluorescent a été effectué.

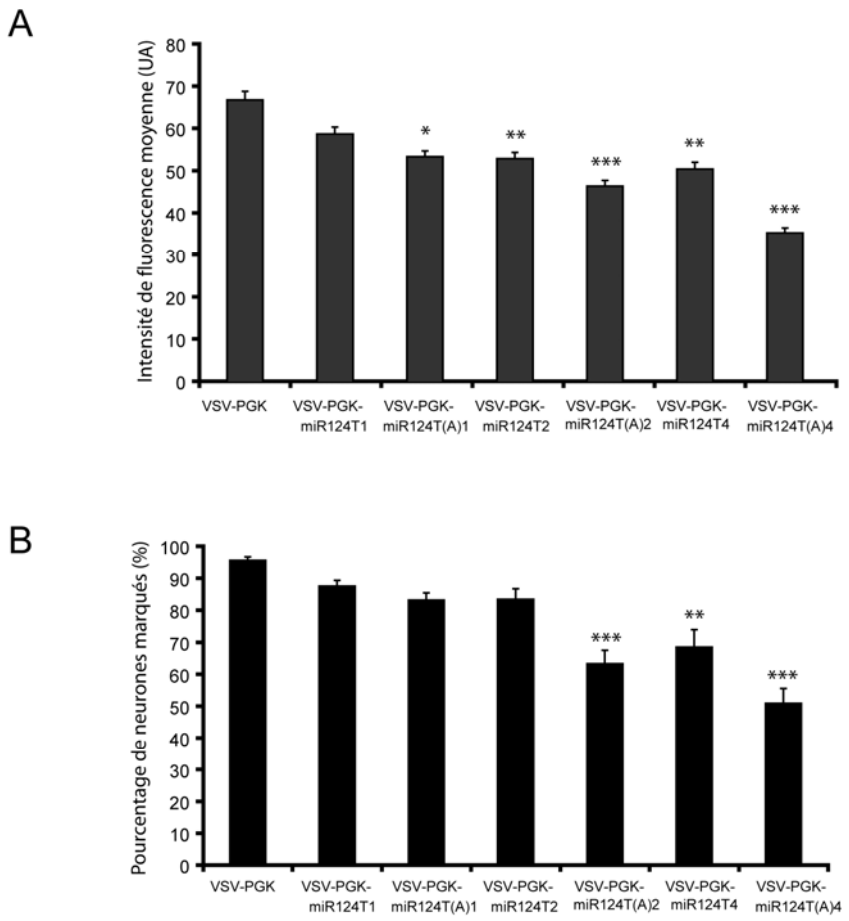


Figure 25: Efficacité des différentes constructions comprenant la cible du miR124 (miR124T). Des cocultures ont été infectées avec le vecteur contrôle VSV-PGK et les vecteurs contenant une, deux ou quatre copies de la cible du mir124 (miR124T1, miR124T2, miR124T4) ou contenant une, deux ou quatre copies de la cible modifiée avec une adénosine (miR124T(A)1, miR124T(A)2, miR124T(A)4). La quantification de l'intensité de fluorescence moyenne du transgène en A montre que la plus grande diminution est obtenue avec VSV-PGK-miR124T(A)4 avec 47% de diminution (ANOVA ; p=0,006 ; Test PLSD de Fisher en comparaison avec le groupe contrôle, miR124T1 : p= 0,109 ; miR124T(A)1 : p=0,014 ; miR124T2 : p=0,007 ; miR124T(A)2 : p=0,0007 ; miR124T4 : p=0,003 ; miR124T(A)4 :p<0,0001). Le pourcentage de neurones marqués diminue avec le nombre de copies et l'insertion d'une adénosine, jusqu'à atteindre 51% avec VSV-PGK-miR124T(A)4 (ANOVA ; p=0,0002 ; Test PLSD de Fisher en comparaison avec le groupe contrôle, miR124T1 : p=0,27 ; miR124T(A)1 : p=0,101 ; miR124T2 : p=0,106 ; miR124T(A)2 : p=0,0004 ; miR124T4 : p=0,0018 ; miR124T(A)4 :p<0,0001).

- Influence du nombre de copies et d'une adénosine dans l'efficacité de régulation du miR124T

Nous avons quantifié l'expression du transgène dans les neurones en mesurant d'une part l'intensité de fluorescence moyenne après immunomarquage fluorescent de la protéine β-galactosidase (Figure 25A) et, d'autre part, le pourcentage de neurones exprimant le transgène (Figure 25B). La diminution d'expression du transgène augmente avec le nombre de copies intégrées. L'insertion d'une adénosine à l'extrémité 3' diminue également l'expression du transgène. La construction contenant 4 copies de la cible modifiée avec l'adénosine (VSV-PGK-miR124T(A)4) permet la diminution la plus importante (47% de diminution par rapport à VSV-PGK). D'autre part, cette construction diminue significativement le pourcentage de neurones exprimant le transgène (51% de neurones marqués alors que le vecteur contrôle transduit 96% des cellules) (Figure 25B). .

Pour la suite de nos expériences nous avons donc utilisé le vecteur ayant la plus grande efficacité : VSV-PGK-miR124T(A)4. Pour plus de lisibilité, nous l'avons appelé miR124T.

-Spécificité de régulation du miR124T

Afin de vérifier que notre vecteur diminue l'expression du transgène seulement dans les neurones, nous avons comparé le niveau d'expression du transgène dans les neurones et dans les astrocytes après infections de cocultures avec le vecteur VSV-PGK et VSV-PGK-miR124T (Figure 26). Les doubles marquages immunofluorescents montrent une diminution du marquage LacZ uniquement dans les neurones NeuN positifs et pas dans les astrocytes S100β positifs (en A). L'intensité de fluorescence moyenne de LacZ est diminuée de 49% avec le vecteur VSV-PGK-miR124T (en C). Au contraire, l'intensité de fluorescence moyenne est similaire dans les cellules S100β positives. Les mêmes résultats ont été trouvés par l'analyse en cytométrie de flux de cocultures (en D). La courbe de fluorescence est déplacée à gauche avec le vecteur contenant les cibles du miR124 alors qu'elle ne change que très peu pour les astrocytes.

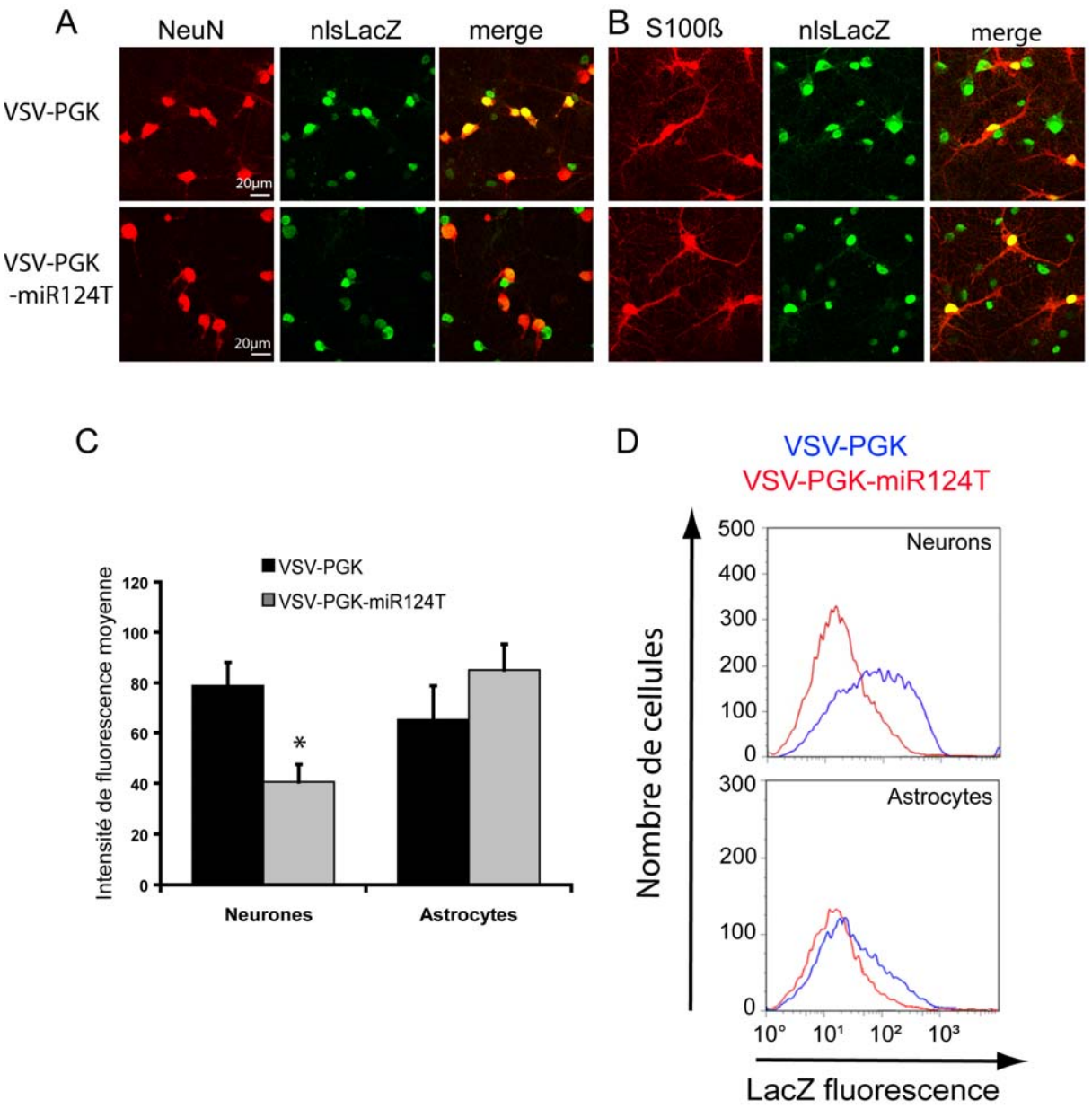


Figure 26: Efficacité et spécificité de l'insertion de la cible du miR124 *in vitro*. Les doubles marquages immunofluorescents de cocultures montrent une diminution du niveau d'expression du transgène (LacZ en vert) uniquement dans les neurones (NeuN positive en rouge en A) et non dans les astrocytes (S100ß positive en rouge en B) avec VSV-PGK-miR124T. La quantification du niveau de fluorescence moyen (en C) montre une diminution significative dans les neurones de 49% (79±9, n=448 contre 41±7, n=446; Test de Student, p=0.016) et aucun changement significatif dans les astrocytes (65±13, n=116 contre 85±10, n=122; test de Student, p=0.28). Ces résultats sont confirmés par les analyses en cytométrie de flux en D.

b. Caractérisation du mécanisme d'action

Afin de mieux comprendre comment se fait l'inhibition de l'expression du transgène par le miR124, nous avons infecté des cultures pures de neurones et d'astrocytes avec les vecteurs VSV-PGK et VSV-PGK-miR124T. Les ARNm de ces cultures ont été

purifiés et quantifiés par RT-PCR quantitative et le niveau relatif d'ARNm de la protéine β-galactosidase par rapport à un gène contrôle a été mesuré (Figure 27A). L'insertion des cibles du miR124 dans nos vecteurs conduit à une diminution significative de 51 % de la quantité d'ARNm β-galactosidase. Au contraire, l'insertion de la séquence miR124T ne modifie par l'expression du transgène dans les astrocytes. Cette diminution de la quantité d'ARNm correspond au 49 % de diminution de l'expression de la protéine. La régulation instaurée par notre outil serait ainsi très majoritairement post-transcriptionnelle.

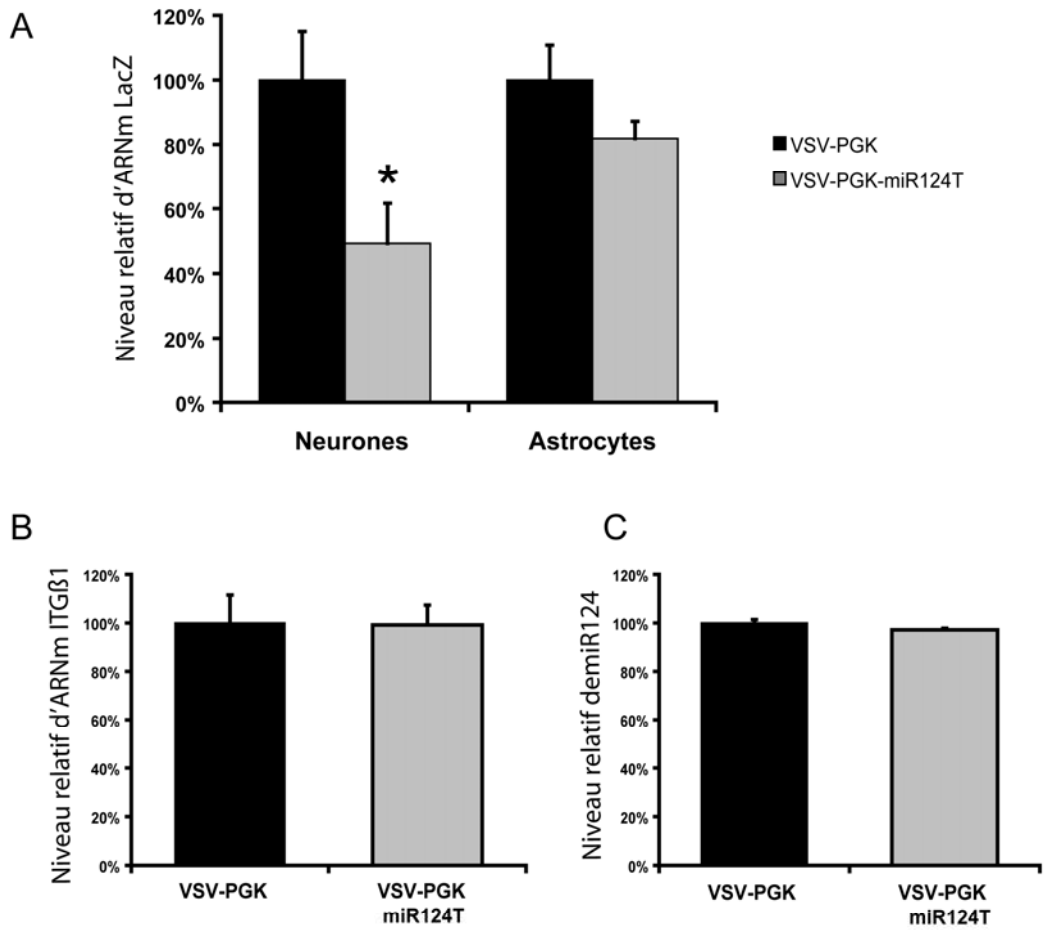


Figure 27: Mécanismes de régulation par la cible du miR124 *in vitro*. Des RT-PCR quantitatives sur des cultures pures de neurones et d'astrocytes après infections avec VSV-PGK et VSV-PGK-miR124T ont montré (en A) une diminution significative de 51% du niveau d'ARNm du transgène dans les neurones (49±11%, n=7 contre 100±15%, n=8, Mann Whitney, p=0.021) alors qu'aucune différence significative n'est observée dans les astrocytes (82±5%, n=5 contre 100±12%, n=4, Mann Whitney, p>0.05). L'utilisation d'une cible de miR124 ne change pas le niveau d'expression du microRNA miR124 (100±1%, n=5 pour VSV-PGK contre 97±1%, n=5 pour VSV-PGK-miR124T, Mann Whitney, p=0.072) (en C) ni d'une de ses cibles naturelles, l'integrine-ß1(100±11%, n=5 pour VSV-PGK contre 99±8%, n=5 pour VSV-PGK-miR124T, Mann Whitney, p=0.337) (en B).

Afin de savoir si notre vecteur perturbe la machinerie cellulaire, nous avons mesuré d'une part, par RT-PCR quantitative, le niveau de miR124 lui-même et, d'autre part, le niveau de sa cible endogène l'ITG-β1. Nous n'avons trouvé aucune différence significative concernant le niveau de miR124 (Figure 27C) ni concernant l'ITG-β1 (Figure 27B). Notre vecteur ne perturbe pas significativement la machinerie des microARN.

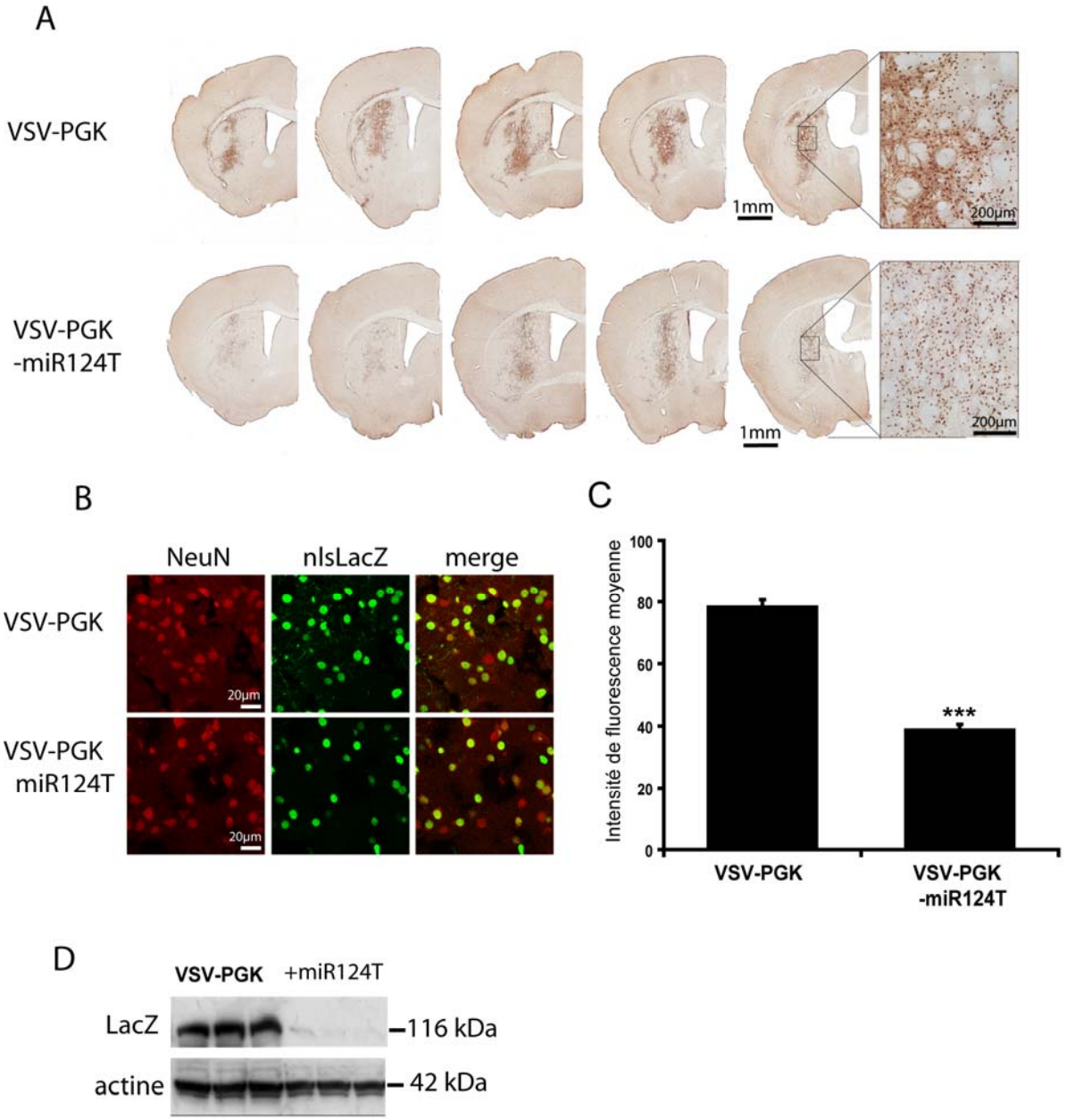


Figure 28: Efficacité du miR124T *in vivo*. Immunomarquage de la protéine ß-galactosidase après injection dans le striatum de souris des vecteurs VSV-PGK et VSV-PGK-miR124T montrant une forte diminution du niveau d'expression du transgène grâce à notre cible du miR124. Cette diminution est confirmée par western blot (D). Les doubles marquages immunofluorescents (B) indiquent une diminution de l'expression du transgène dans les cellules NeuN positives, ce qui est confirmé par la diminution de 50 % de l'intensité de fluorescence Lacz (78±2, n=858 contre 39±2, n=660; test de Student, $p<0.001$, en C).

c. Efficacité du miR124T *in vivo*

Dans cette partie, nous avons testé l'efficacité de notre méthode de régulation *in vivo*. Les vecteur et VSV-PGK-miR124T ont été injectés dans le striatum de souris et un marquage β-galactosidase a été effectué (Figure 28A). Nous avons utilisé la souris car c'est le modèle ou le ciblage astrocytaire est le plus efficace. L'utilisation des cibles du miR124 induit un marquage beaucoup plus faible que celui du vecteur contrôle (VSV-PGK), les prolongements des cellules ne sont pas marqués. Cette forte baisse de l'expression du transgène est confirmée par western blot (en D). Les doubles marquages immunofluorescents NeuN-LacZ (en B), montrent l'efficacité de cet outil dans les neurones. L'intensité de fluorescence moyenne dans les neurones est 50% plus faible avec VSV-PGK-miR124T qu'avec le vecteur contrôle (Figure 28C). Cette valeur correspond aux données observées *in vitro* et à la diminution de la quantité d'ARNm.

2. Discussion sur le ciblage astrocytaire grâce au microARN

a. Efficacité de répression et mécanismes de régulation

La répression du transgène est proportionnelle au nombre de copies du miR124T ce qui est en accord avec les études précédentes (Doench, Petersen et al. 2003; Wu and Belasco 2005; Brown, Gentner et al. 2007). Les cibles naturelles sont réprimées de 20-30% (Fazi, Rosa et al. 2005; Yu, Chung et al. 2008) ce qui est probablement due à la présence, pour la plupart des miR, d'un seul site de fixation sur les ARNm cibles. En augmentant le nombre de copies à 4, nous avons atteint 50% d'inhibition de l'expression. De plus, l'intégration d'une adénosine à l'extrémité 3' permet d'accroitre la répression ce qui confirme les données de Wu et Belasco en 2005. L'insertion de cette adénosine semble augmenter l'effet répresseur indépendamment du fait qu'elle s'apparie au miR124 ou non. De plus, cette adénosine se retrouve fréquemment à cette position dans les séquences cibles prédictives des vertébrés (Lewis, Burge et al. 2005). Ces données suggèrent que cette base aurait un site de fixation dans le complexe RISC. Ainsi, sa présence permettrait une meilleure reconnaissance de la cible par le complexe miR/RISC et donc une répression plus efficace.

La diminution de l'expression du transgène de l'ordre de 50% dans les neurones, *in vitro* et *in vivo*, est en accord avec les données de l'équipe de Naldini. Cette équipe avait inséré quatre copies d'une cible naturelle du miR223 exprimée dans les cellules

U937 et avait observé une diminution de l'expression du transgène d'environ 50% (Brown, Gentner et al. 2007). Cette même équipe a pu montrer que l'insertion de cibles parfaitement complémentaires permettait une augmentation significative de la répression allant jusqu'à 99% selon le miR ciblé (Brown, Venneri et al. 2006; Brown, Gentner et al. 2007). Selon la littérature concernant la régulation des miR, une complémentarité parfaite entre le miR et sa cible augmenterait le clivage des ARNm (Tang 2005; Brown, Gentner et al. 2007; Franco-Zorrilla, Valli et al. 2007; Wu and Belasco 2008). Tandis qu'une cible partiellement complémentaire au miR conduirait à une répression préférentiellement traductionnelle. Ainsi, il semblerait que la répression par clivage des ARNm soit plus efficace que la répression par inhibition de la traduction ou déadénylation, plus spécifique d'une complémentarité partielle. Ceci peut s'expliquer par le fait que le clivage via le complexe RISC a un turn-over rapide tandis que la régulation via l'inhibition de la traduction est plus lente (Haley and Zamore 2004). Les études précédentes sur l'identification de cibles du miR124 ont été menées par quantification du niveau de l'ARNm (Lim, Lau et al. 2005; Makeyev, Zhang et al. 2007; Visvanathan, Lee et al. 2007) et ont confirmé que pour de nombreuses cibles dont l'ITG-β1, le miR124 agissait via un mécanisme de dégradation de l'ARN, ce qui est en accord avec nos résultats. Cependant, notre cible est partiellement complémentaire, la régulation ne se fait pas par clivage directement par le complexe RISC. Le procédé impliqué dans la dégradation de l'ARNm serait une déadénylation médiée par le complexe miR/RISC. Les ARNm seraient alors plus instables et plus vulnérables aux exonucléases (Aleman, Doench et al. 2007; Karginov, Conaco et al. 2007). Ces exonucléases cliveraient l'ARNm et par conséquent diminueraient sa quantité dans la cellule. Il semble probable que d'autres facteurs que la complémentarité entrent en jeu dans ces mécanismes de régulation. Il peut s'agir de la nature de la cible, du miR ou du type cellulaire (Mishima, Giraldez et al. 2006; Kedde, Strasser et al. 2007; Eulalio, Huntzinger et al. 2008). La quantification des ARNm et des protéines cibles montre que la corrélation entre les deux est variable (Aleman, Doench et al. 2007; Karginov, Conaco et al. 2007). L'implication de la dégradation de l'ARNm par clivage et de l'inhibition de la traduction se ferait selon la composition des séquences, et plus particulièrement du centre de la cible (base 9-11).

Les mécanismes de régulation des ARNm incorporant des cibles parfaitement complémentaires semblent varier (Brown, Gentner et al. 2007). Ces différences pourraient être dues à l'intervention de différents complexes RISC (Tomari, Du et al. 2007) et par des interférences d'autres miR qui s'apparieraient à la région « seed », très importante pour la répression (Doench and Sharp 2004; Brennecke, Stark et al. 2005; Lewis, Burge et al. 2005).

Il y aurait donc intervention de mécanismes d'inhibition de la traduction via un autre miR. Si l'on souhaite utiliser des microARN pour réguler l'expression de transgène, il est donc important de choisir une cible d'un miR qui ne possède pas d'homologie avec d'autres cibles. C'est une des raisons qui fait que nous avons choisi le miR124 et sa région cible de l'ITG-β1. En effet, il existe d'autres miR spécifiques des neurones comme le miR128. Cependant, en étudiant ses séquences cibles via une base de données, nous avons observé que ce miR s'appariait avec une séquence qui interagissait avec d'autres miR non-spécifiques des neurones. Nous n'avons donc pas choisi ce miR afin d'éviter toute interférence.

Dans la continuité de ce travail, l'étude de l'effet de l'intégration de copies parfaitement complémentaires au miR124 dans un vecteur pseudotypé avec Mokola, afin d'augmenter la répression du transgène est en cours d'investigation.

b. Les conséquences de l'insertion des cibles du miR124 dans la cellule

Nous avons vérifié que l'intégration des séquences miR124T ne perturbait pas la régulation de ses cibles naturelles. Nos résultats montrent qu'il n'y pas de changement de la quantité d'ARNm de l'ITG-β1, et donc pas de perturbation au niveau post-transcriptionel. Les résultats de Brown et al. montrent qu'il n'y a pas de perturbation de l'expression de la protéine, cible naturelle du miR choisi pour la régulation du transgène, et ceci avec plusieurs miR et avec des cibles parfaitement complémentaires (Brown, Gentner et al. 2007). Pour des cibles partiellement complémentaires, il n'y a pas de perturbation pour un niveau d'infection usuel. Lorsque les infections sont effectuées avec un très grand nombre de particules infectieuses par cellule (> 25 copies de vecteurs par cellule), une augmentation de l'expression de la protéine cible du miR est observée. Tandis qu'aucune saturation n'est observée pour une cible parfaitement complémentaire. Ces données suggèrent, comme nous l'avons évoqué précédemment, que les mécanismes de régulation et les risques de saturation sont fonction de la complémentarité de la cible. En effet, il semblerait que le clivage par le complexe RISC ayant un fonctionnement rapide ne soit pas facilement saturable tandis que la régulation via l'inhibition de la traduction ou la déadénylation soit plus lente, car elle fait appel à d'autres enzymes, et est plus facilement saturable (Haley and Zamore 2004). D'après des données préliminaires, nos cellules présentent un nombre de copies inférieure à 5 donc la machinerie miR/RISC ne devrait pas être saturée, comme le confirme nos résultats. Pour confirmer cela, il serait utile de quantifier le niveau d'ITG-β1 et d'autres cibles naturelles comme les facteurs ayant des rôles plus globaux, comme la phosphatase associée au facteur

de transcription REST ou le facteur PTBP1 agissant sur l'épissage alternatif des ARNm (Makeyev, Zhang et al. 2007; Visvanathan, Lee et al. 2007; Yu, Chung et al. 2008) après infection par notre vecteur *in vivo*. En outre, notre vecteur ne perturbe pas l'expression endogène du miR124, ce qui est en accord avec les résultats précédents (Brown, Gentner et al. 2007). En effet, de nombreuses études ont montré l'existence de rétrocontrôle des miR. Les protéines cibles auraient selon les cas un effet activateur ou inhibiteur sur l'expression du miR dont elles sont les cibles (Fazi, Rosa et al. 2005; Kim 2005; Carthew 2006; Bracken, Gregory et al. 2008; Zhao, Kalota et al. 2008). Il semblerait donc que l'insertion d'une cible intégrée dans la partie 3'non traduite d'un gène d'intérêt ne suffit pas à l'initiation de ce rétrocontrôle. La protéine cible, qui est souvent un facteur de transcription, devrait être présente et interagir avec le promoteur du miR pour pouvoir le réguler. D'autre part, il est important que notre vecteur ne perturbe pas l'expression du miR124 car les conséquences d'une telle altération pourraient être délétères. En effet, une perturbation de l'expression de certains miR pourrait être impliquées dans de nombreuses maladies dont la maladie d'Alzheimer (Nelson, Wang et al. 2008; Wang, Rajeev et al. 2008; Wang, Tang et al. 2008; Wang, Liang et al. 2008).

Nous avons donc caractérisé ici, un nouveau mode indirect de ciblage cellulaire en induisant la répression du transgène spécifiquement dans les neurones.

D. Nouvel outil de ciblage astrocytaire : Combinaison Mokola et microARN

Nous avons ici combiné le pseudotypage Mokola et 4 copies d'une cible du miR124 (miR124T) pour créer le vecteur Mokola-PGK-miR124T, nouvel outil de ciblage astrocytaire *in vivo*. Nous avons testé cet outil chez le rat et chez la souris.

1. Résultats concernant la combinaison Mokola et miR124T

a. Ciblage des astrocytes chez le rat

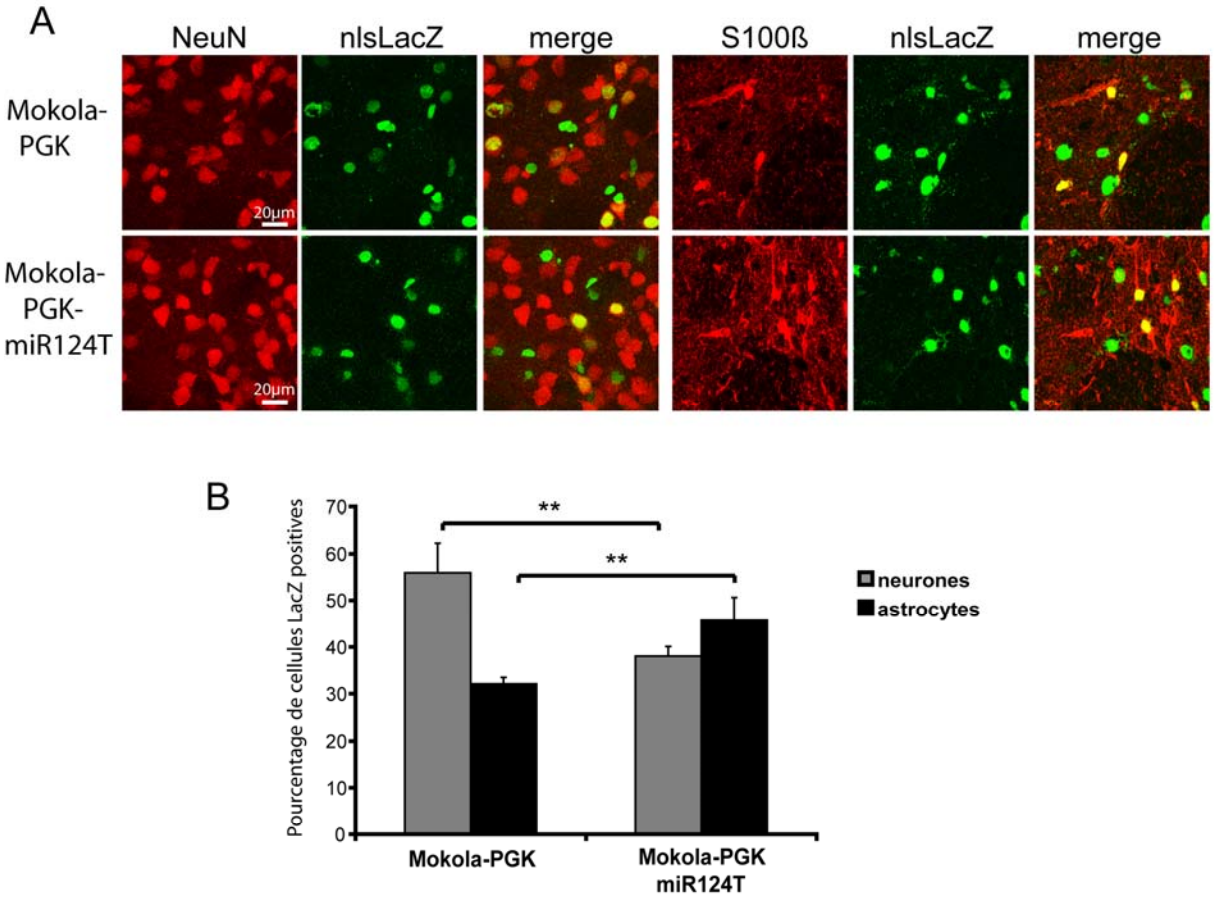


Figure 29: Le ciblage astrocytaire *in vivo* chez le rat. La combinaison de l'enveloppe Mokola avec des séquences cibles du miR124 a été utilisée pour cibler les astrocytes. Les doubles marquages immunofluorescents (en A) montrent que l'expression du transgène (LacZ en vert) dans les neurones (en rouge) est restreinte par Mokola-PGK-miR124T. Le pourcentage de cellules LacZ-NeuN positives a diminué significativement, passant de 56% à 38% (56±6% (282/500) contre 38±2% (187/496), Mann-Whitney U test, p= 0,0039) , tandis que le pourcentage de cellules LacZ-S100ß positives a augmenté significativement, passant de 32% à 46% (32±5% avec Mokola (210/657) contre 46%±2% (131/286)), Mann-Whitney U test, p= 0,0039), et ceci grâce à l'insertion de cible du miR124 dans notre vecteur pseudotypé avec Mokola (en B).

Nous avons injecté des rats avec les vecteurs Mokola-PGK et Mokola-PGK-miR124T. Trois semaines après, les animaux sont sacrifiés et des doubles marquages immunofluorescent ont été effectués pour marquer la protéine β-galactosidase et NeuN ou S100β (Figure 29A). Ils montrent que le tropisme a été légèrement changé, il est devenu plus astrocytaire. Les quantifications (en B) montrent que grâce à l'insertion du miR124T dans le vecteur Mokola-PGK, le pourcentage de cellules infectées qui sont NeuN positives passe de 56 % à 38 %. Tandis que le pourcentage de cellules infectées qui sont S100β positives passe de 32 % à 46 %. Nous avons réussi à créer un tropisme équilibré avec une préférence astrocytaire chez le rat.

b. Ciblage des astrocytes chez la souris

Nous avons quantifié le nombre total de cellules β-galactosidase positives ainsi que le volume d'infection (Figure 30A et D). Mokola-PGK-miR124T infecte 56600 cellules dans un volume de 4,29 mm^3. Quant au vecteur Mokola-PGK, il infecte significativement plus de cellules avec 74900 cellules dans le même volume. Sachant que 68 % des cellules infectées sont des astrocytes avec Mokola-PGK, il y a environ 50900 astrocytes exprimant le transgène. Pour notre vecteur Mokola-PGK-miR124T, nous obtenons 50430 astrocytes infectés, ce qui n'est pas différent significativement de ce qu'on obtient avec Mokola-PGK (Figure 30D). La différence du nombre de cellules infectées entre nos deux vecteurs correspond bien aux neurones qui n'expriment plus le transgène grâce à l'insertion du miR124T. De plus, selon Savchenko et al. en 2000, la densité d'astrocytes dans le striatum de rat est de 20000/mm^3. Notre vecteur infecte 11740 astrocytes/mm3. Nous pouvons en déduire qu'environ 60% des astrocytes sont infectés dans le volume d'infection.

Des doubles marquages immunofluorescents ont été effectués pour marquer la protéine β-galactosidase et NeuN ou S100β. Grâce à l'insertion du miR124T dans le vecteur Mokola-PGK, le pourcentage de cellules infectées qui sont NeuN positives diminue significativement de 18 % à 6 %. Tandis que le pourcentage de cellules infectées qui sont S100β positives augmente significativement de 68 % à 89 % (Figure 30B et C).

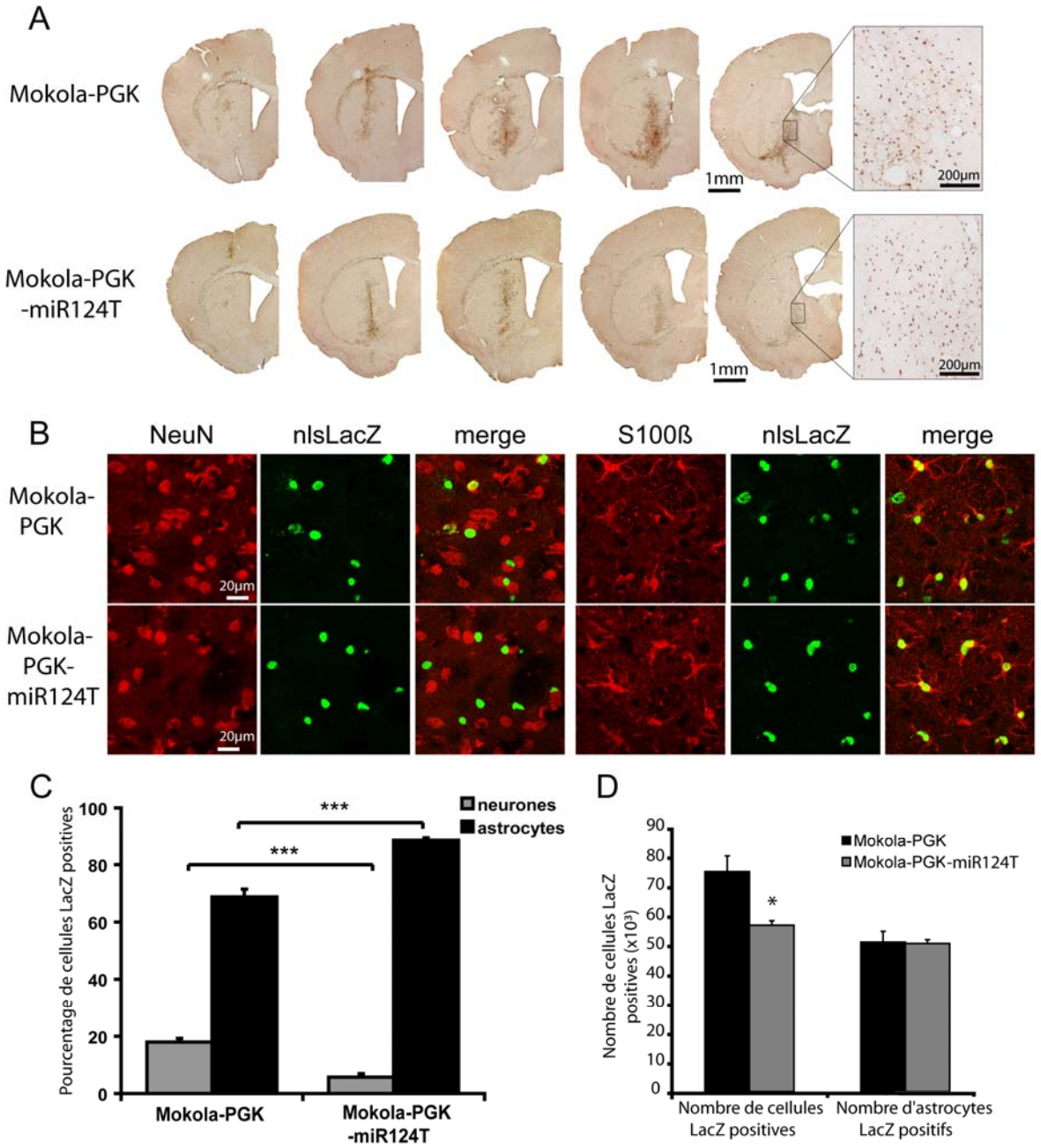


Figure 30: Le ciblage astrocytaire in vivo chez la souris. La combinaison de l'enveloppe Mokola avec des séquences cibles du miR124 a été utilisée pour cibler les astrocytes. En A, immunomarquage de la protéine ß-galactosidase après injection dans le striatum de souris des vecteurs Mokola-PGK et Mokola-PGK-miR124T. Les doubles marquages immunofluorescents (en B) montrent que l'expression du transgène (LacZ en vert) dans les neurones (en rouge) est restreinte par Mokola-PGK-miR124T. Le pourcentage de cellules LacZ-NeuN positives a diminué significativement, passant de18±4% à 6±4% (93/520 contre 26/435, Mann-Whitney U test, $p<0.001$), tandis que le pourcentage de cellules LacZ-S100ß positives a augmenté significativement, passant de de 68±8% à 89±3% (282/416 contre 294/331, Mann-Whitney U test, $p<0.001$), et ceci grâce à l'insertion de cible du miR124 dans notre vecteur pseudotypé avec Mokola (en C). Le nombre de cellules LacZ positives est plus élevé avec Mokola-PGK qu'avec Mokola-PGK-miR124T (74900±5200 cellules contre 56600±1500 cellules dans un volume de 4.29±0.71 mm3 (n=4); Test de Student, p= 0,027) mais le nombre d'astrocytes correspondants est équivalent (50900 cellules pour Mokola-PGK et 50430 cellules pour Mokola-PGK-miR124T ; Test de Student, p=0,91; en D).

c. Absence de toxicité de notre vecteur

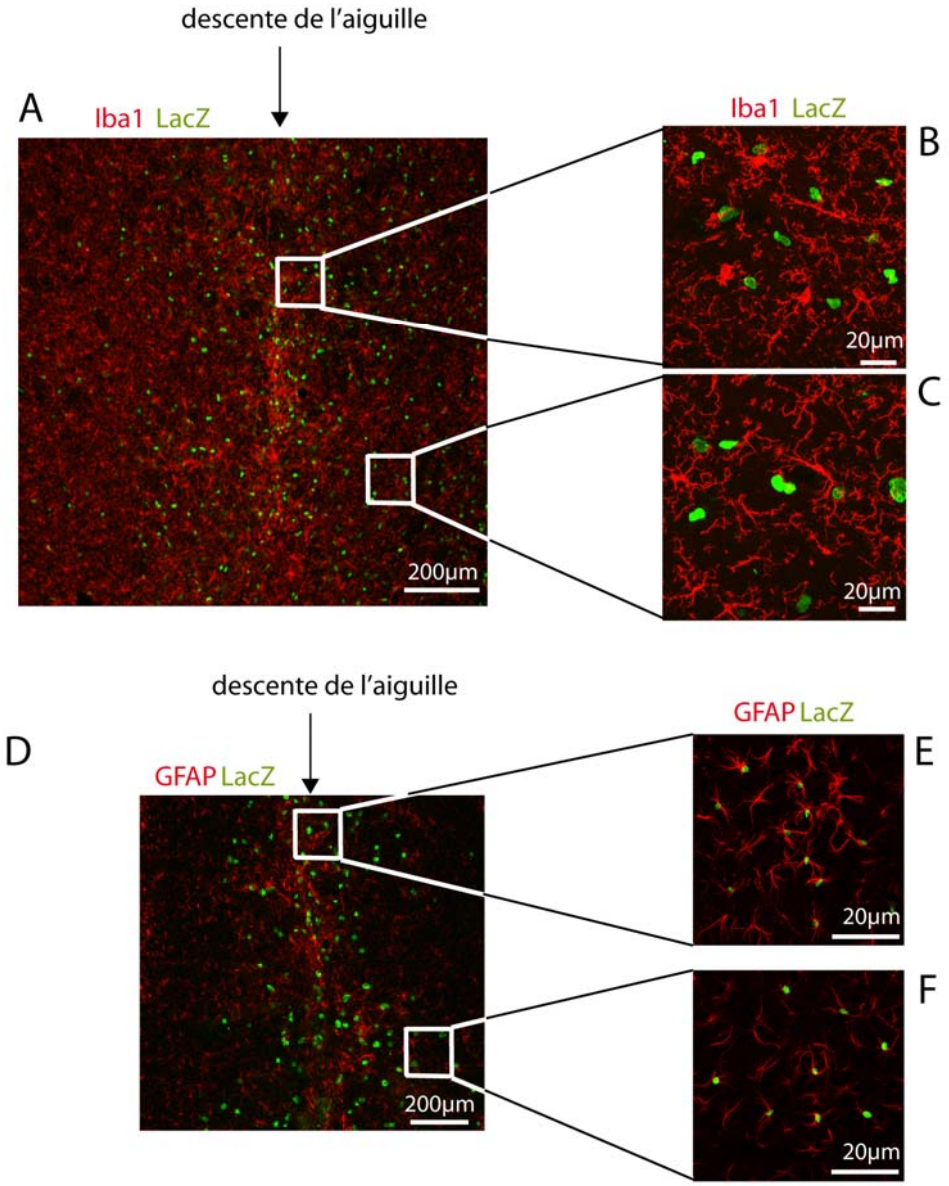


Figure 31: Linjection de Mokola-PGK-nlsLacZ-miR(A)4 n'induit pas d'inflamation dans la zone d'infection *in vivo*. Doubles marquages immunofluorescents de la protéine ß-galactosidase en vert et de Iba1 en rouge, marquant la microglie (A, B, C). La microglie présente un phénotype d'activation seulement au niveau de la descente de l'aiguille (A et B). A distance , il n'y a pas d'activation (C). Les doubles marquages immunofluorescents de la protéine ß-galactosidase en vert et de GFAP en rouge, marquant les astrocytes (D,E, F) montrent une activation astrocytaire (E) seulement au niveau de la descente de l'aiguille.

Afin de vérifier que l'injection du vecteur Mokola-PGK-miR124T n'induisait pas de réaction inflammatoire ou une activation astrocytaire, nous avons réalisé une étude de dose. Des quantités croissantes de vecteur ont été injectées dans le striatum de souris : 200, 400 et

600 ng de p24. Des marquages de la protéine astrocytaire GFAP, permettant de distinguer les astrocytes activés, nous ont permis de choisir la dose de vecteur adéquate à injecter qui est de 400 ng de p24. Avec cette dose, il n'y a pas d'activation astrocytaire en dehors de la descente de l'aiguille (Figure 31 D, E, F). De même, il n'y a pas d'activation microgliale observée avec le marqueur Iba1, sauf dans la zone de descente de l'aiguille (en A, B, C). De plus, les doubles marquages de la microglie et des cellules infectées montrent que notre vecteur n'induit pas d'expression du transgène dans la microglie.

d. Ciblage astrocytaire dans l'hippocampe et le cervelet

Afin de savoir si le tropisme de notre vecteur est spécifique du striatum ou valable dans diverses zones du cerveau, nous avons testé ce vecteur dans d'autres régions du cerveau de la souris. En effet, les régions qui peuvent être atteintes dans les maladies neurodégénératives sont diverses. Le striatum pour la maladie de Huntington, la substance noire pour la maladie de Parkinson ou encore le cervelet pour l'ataxie cérébelleuse. Il est donc important d'arriver à un ciblage astrocytaire quelle que soit l'organisation de la région ciblée et quelque soit le type d'astrocytes présents. Nous avons donc testé notre vecteur dans le cervelet et l'hippocampe (Figure 32). Dans l'hippocampe, les astrocytes S100β positifs sont marqués (C, D) tandis que les neurones pyramidaux NeuN positifs ne le sont pas (A, B). Nous pouvons observer quelques cellules au niveau de la couche des neurones pyramidaux qui expriment faiblement le transgène. Cette zone du gyrus denté est connue pour être une région de neurogénèse. Un marquage de la doublecortine, marquant les neurones en cours de différenciation, permet de nous montrer que cette expression se fait dans les cellules doublecortine positives (Figure 32, E, F). Notre vecteur permet donc une expression du transgène dans les neurones en cours de différentiation où l'expression du miR124 est plus faible que dans les neurones matures.

Dans le cervelet, les cellules de Purkinje exprimant la calbindine n'expriment pas le transgène (Figure 32G). L'expression de la protéine β-galactosidase est restreinte à la glie de Bergman et aux astrocytes de la couche granulaire du cervelet (H et I). Notre vecteur permet l'expression spécifique du transgène aussi bien dans les astrocytes de régions homogènes comme le striatum que dans les astrocytes de régions plus structurées comme l'hippocampe et le cervelet.

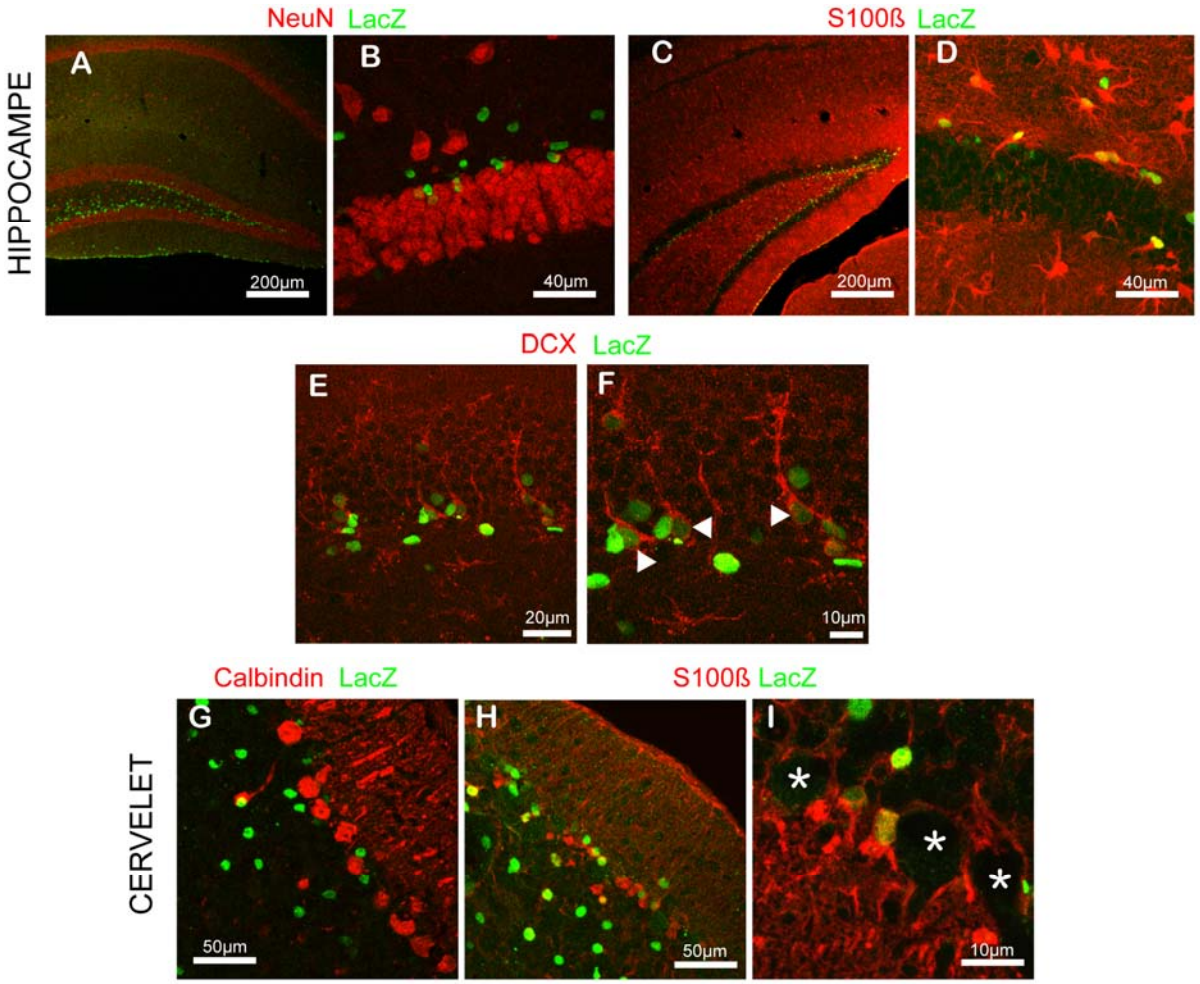


Figure 32: Ciblage astrocytaire dans l'hippocampe et le cervelet. Dans l'hippocampe, le vecteur Mokola-PGK-miR124T induit l'expression du transgène ß-galactosidase(en vert) dans les astrocytes S100ß positifs (en rouge) (C, D) mais pas dans les cellules pyramidales NeuN positives (en rouge A, B). Certaines cellules S100ß négatives exprimant le transgène faiblement sont doublecortine (DCX) positives (E, F indiquées par les flèches). Dans le cervelet, la glie de Bergmann S100ß positive de la couche moléculaire ainsi que les astrocytes de la couche granulaire (H et I) expriment le transgène mais les cellules de Purkinje calbindine positives ne l'expriment pas (en rouge) (en G et indiquées par des étoiles blanches en I).

2. Discussion sur ce nouvel outil de ciblage astrocytaire *in vivo*

Grâce à l'association d'un vecteur lentiviral pseudotypé avec l'enveloppe Mokola et de plusieurs copies d'une cible d'un miR spécifiquement neuronal, il est possible d'obtenir une expression d'un transgène spécifiquement astrocytaire. Chez la souris, le vecteur lentiviral de référence pseudotypé avec VSV permet d'obtenir un ratio neurones/astrocytes de 93/9. Nous avons réussi à inverser ce ratio en obtenant 6/89.

a. Un outil particulièrement flexible et efficace

La littérature compte de nombreux vecteurs viraux capables de transduire les astrocytes avec une efficacité et une spécificité variables. Notre vecteur permet d'allier efficacité et spécificité. Nous avons montré qu'après injection de notre vecteur dans le striatum de souris, il n'y a pas d'activation astrocytaire significative ni d'activation microgliale hormis au niveau de la descente de la canule ce qui est en accord avec les données de la littérature (Blomer, Naldini et al. 1997; Consiglio, Quattrini et al. 2001; Azzouz, Kingsman et al. 2004; Abordo-Adesida, Follenzi et al. 2005). D'autre part, cet outil permet un ciblage astrocytaire de différents types d'astrocytes dans différentes régions du cerveau (striatum, cervelet, hippocampe), contrairement à certains outils dont la spécificité peut varier selon les régions (Pezet, Krzyzanowska et al. 2006; Meunier, Mauborgne et al. 2008). Cet outil peut être utilisé avec un grand nombre de transgènes dont GLAST et GLT-1, comme nous l'avons décrit dans la partie suivante.

b. Un outil à améliorer

La spécificité de notre vecteur est optimale chez la souris et non chez le rat. Des études préliminaires de notre laboratoire montrent que la spécificité de l'enveloppe Mokola chez la souris se retrouve également chez le primate ce qui confirme l'intérêt de cette approche. Plusieurs améliorations sont à envisager. Tout d'abord, il est important d'améliorer l'efficacité de transduction. Bien que nous obtenions environ 60000 astrocytes LacZ-positifs dans le striatum de souris, cette efficacité peut être améliorée. Le pseudotypage avec l'enveloppe Mokola entraine une baisse des titres des vecteurs. La fusion entre le domaine transmembranaire de VSV et le domaine ectopique de Mokola pourrait améliorer l'efficacité sans changement du tropisme de Mokola.

Nous n'avons pas fait de marquage spécifique d'oligodendrocytes. Certaines études montrent que S100β serait exprimé dans les oligodendrocytes, un marquage de ces cellules serait indispensable afin de caractériser au mieux notre outil (Vives, Alonso et al. 2003; Deloulme, Raponi et al. 2004). Il n'y a pas de marqueur astrocytaire idéal pour la quantification, chacun marque des sous-populations d'astrocytes qui ne se recoupent pas toujours (Voir Chapitre VI).

D'autre part, afin de pouvoir cibler les astrocytes chez le rat, une amélioration de la spécificité doit être faite. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, le

développement d'une cible de miR124 parfaitement complémentaire est en court. L'insertion de plusieurs types de cibles permettrait d'améliorer la spécificité de notre outil. Notamment, il serait possible d'insérer des cibles de miR exprimés spécifiquement dans les oligodendrocytes ou les cellules endothéliales, comme le miR126 (Wang, Wilfred et al. 2008). Nous avons montré que notre vecteur permettait une expression du transgène faible dans les neurones en cours de différentiation (double-cortine positifs), l'expression du miR124 étant faible et augmente pendant cette phase (Krichevsky, King et al. 2003; Deo, Yu et al. 2006; Yu, Chung et al. 2008). Afin d'éviter cette expression, il serait possible d'insérer une cible d'un miR exprimé dans les cellules non différentiées, par exemple le miR292-3'(Krichevsky, Sonntag et al. 2006).

Récemment, le développement d'une nouvelle voie de recherche prometteuse alliant une protéine fusogénique et un anticorps ciblant une protéine spécifique d'un type cellulaire a été développé. Une éventuelle utilisation d'un anticorps spécifique d'un protéine membranaire astrocytaire pourrait permettre de cibler cette population, comme c'est déjà le cas pour d'autres populations cellulaires (Morizono, Bristol et al. 2001; Aires da Silva, Costa et al. 2005; Yang, Bailey et al. 2006; Joo and Wang 2008).

L'utilisation de vecteurs intégratifs comme les vecteurs lentiviraux peut perturber la spécificité d'un promoteur spécifique des astrocytes et peut également entrainer des risques de génotoxicité. Le développement de vecteurs lentiviraux non-intégratifs est un des points essentiels dans le domaine de la thérapie génique (Nightingale, Hollis et al. 2006; Philippe, Sarkis et al. 2006; Yanez-Munoz, Balaggan et al. 2006). L'utilisation d'un vecteur non intégratif, (mutation dans l'intégrase), serait une avancé importante du point de vue biosécurité et également en terme de bénéfice de spécificité par rapport au promoteur éventuellement utilisé.

Notre nouvel outil combinant l'enveloppe Mokola et les cibles de microARN spécifique des neurones permet un ciblage astrocytaire spécifique et efficace. Nous allons maintenant utiliser cet outil pour l'étude des astrocytes *in vivo*.

VI. Applications du vecteur à l'étude des astrocytes

A. Visualisation de la morphologie des astrocytes *in vivo*

L'étude de la morphologie et des domaines astrocytaires est un point très intéressant et qui fait objet de nombreuses publications (voir Introduction). En utilisant un transgène exprimé dans le cytoplasme des astrocytes jusqu'à dans leurs plus fins prolongements, nous pouvons visualiser la morphologie des astrocytes. L'utilisation du transgène GFP permet de montrer (Figure 33) des astrocytes de différentes catégories : étoilés avec des prolongements épais ou bien un corps cellulaire rond et des prolongements très fins allant contacter des vaisseaux sanguins.

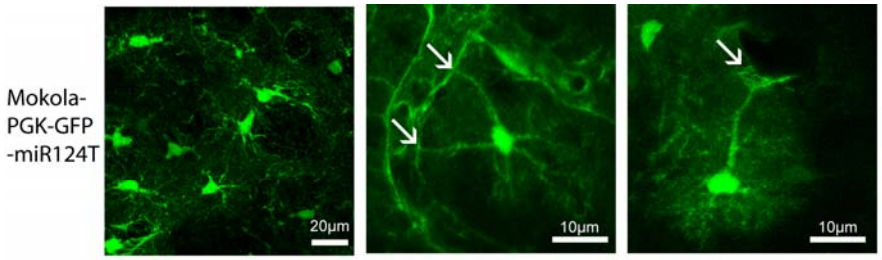


Figure 33: Visualisation de la morphologie des astrocytes. Après l'injection du vecteur Mokola-PGK-GFP-miR124T, il est possible de visualiser la morphologie des astrocytes exprimant la GFP. Les pieds astrocytaires entrent en contact avec les vaisseaux sanguins indiqués par les flèches.

B. Surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1 et effets en condition excitotoxique

Dans de nombreuses maladies neurodégénératives, il y a une diminution de l'expression des transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1. Cette diminution pourrait avoir un impact important sur la composante excitotoxique impliquée dans la mort neuronal. Nous avons voulu étudier ici le potentiel neuroprotecteur que peut avoir la surexpression de ces transporteurs dans des conditions excitotoxiques. Dans cette partie, nous avons utilisé notre vecteur afin de surexprimer les transporteurs GLAST et GLT-1 dans les astrocytes du striatum.

1. Mise au point de vecteurs exprimant les transporteurs GLAST et GLT-1

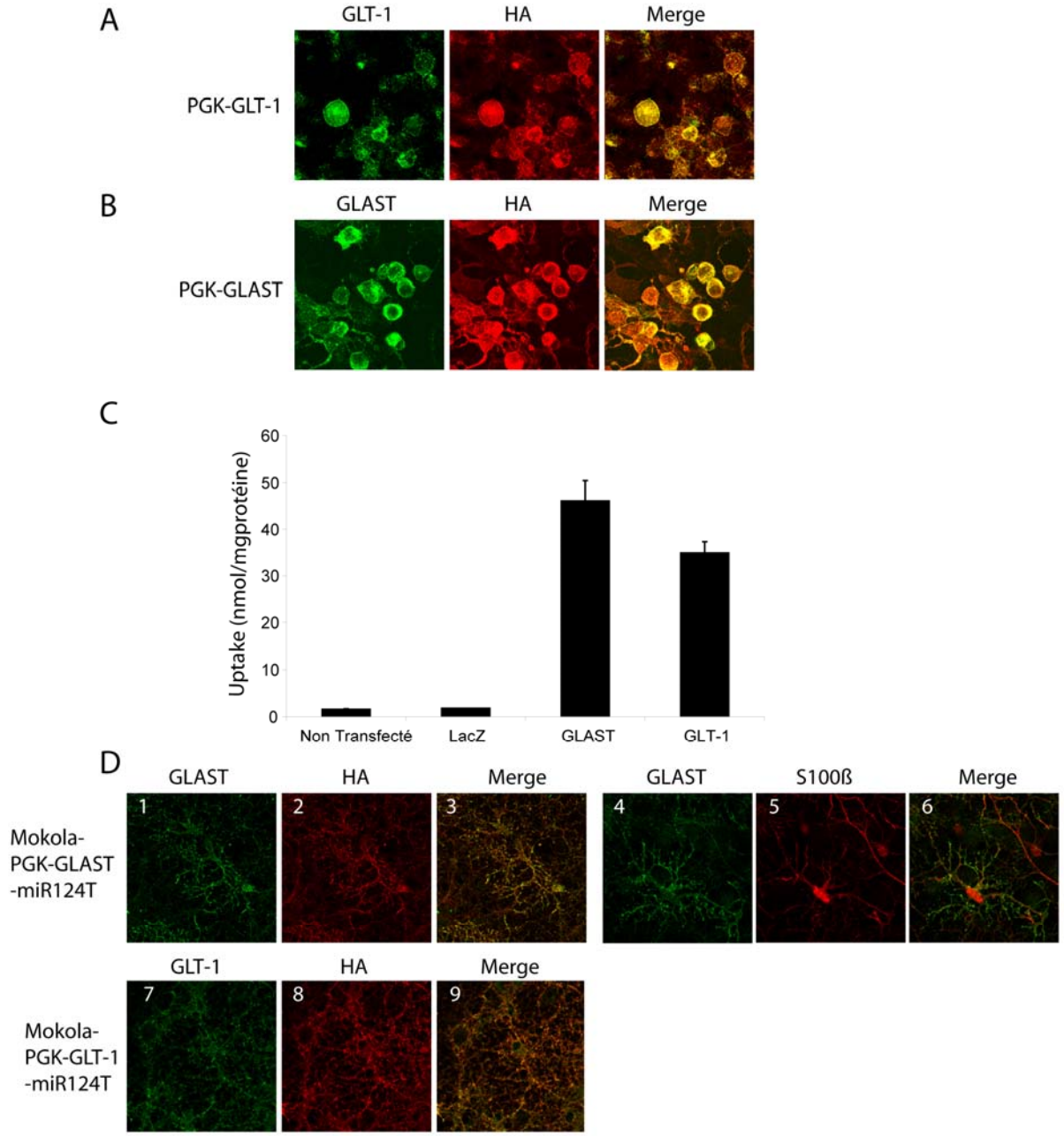


Figure 34: Validation des vecteurs permettant l'expression des transporteurs GLAST et GLT-1. Après transfection de cellules 293T, les immunomarquages de GLAST (en vert, A) et de HA (en rouge) ou de GLT-1 (en vert, B) et HA (en rouge, B) confirment l'expression du transgène à la membrane des cellules et le bon fonctionnement du tag HA. Les expériences d'uptake d'aspartate montrent que les quantités d'aspartate recaptées par les cellules transfectées par PGK-GLAST (46,092±4,381 nmol/mg de protéine) et GLT-1(34,913±2,406 nmol/mg de protéine) sont significativement plus élevées que celle recaptée par les cellules controles (1,761±0,003 nmol/mg de protéine ; ANOVA : $p<0,0001$; Test PLSD de Fisher : $p<0,0001$; en C). Ceci montre la fonctionnalité de nos transporteurs. L'infection de cocultures avec le vecteur Mokola-PGK-GLAST-miR124T montre l'expression du transgène à la membrane d'un astrocyte S100ß positif (D4, 5, 6) et sa colocalisation avec le marquage HA (1, 2, 3), comme avec le vecteur Mokola-PGK-GLT1-miR124T (D7, 8, 9).

Nous avons inséré le gène du transporteur GLAST et celui de GLT-1 dans des vecteurs de transfert contenant le promoteur PGK. Nous avons inséré un Tag HA à l'extrémité Terminal des transporteurs afin de pouvoir visualiser l'expression de ces protéines et de les différencier de la protéine endogène. Ces plasmides PGK-GLAST et PGK-GLT-1 ont été transfectés transitoirement dans des cellules 293T. Nous avons pu ainsi confirmer la localisation membranaire de nos transporteurs (Figure 34 A, B) et la colocalisation des transporteurs et du Tag HA. Puis nous avons mesuré la quantité d'aspartate recapté par ces cellules. La quantité d'aspartate recaptée par les cellules transfectées avec PGK-GLAST et PGK-GLT-1 est significativement plus élevée que celle recaptée par les cellules contrôles (Figure 34C). Ceci permet de confirmer la fonctionnalité de nos transporteurs.

Nous avons ensuite produit les vecteurs Mokola-PGK-GLAST-miR124T et Mokola-PGK-GLT-1-miR124T. Ces vecteurs ont été utilisés pour transduire des cocultures (Figure 34D). L'expression de nos transporteurs à la membrane des astrocytes a pu être confirmée.

Pour plus de lisibilité, dans la suite des résultats nous avons nommé nos vecteurs par la protéine qu'ils permettent d'exprimer (Mokola-PGK-GLAST-miR124T sera le vecteur GLAST et Mokola-PGK-GLT-1-miR124T sera le vecteur GLT-1).

2. Surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1 *in vivo* et effets en condition excitotoxique.

Après la validation de nos vecteurs exprimant les transporteurs, nous les avons injectés dans le striatum de souris. L'étendue de l'infection peut être visualisée par un marquage HA (Figure 35 A). La quantification par Western Blot montre une surexpression de 29% pour GLAST et de 35% pour GLT-1 (C). L'expression des transporteurs permet de visualiser le neuropile avec les corps cellulaires des neurones non infectés (D, E1), ce qui est caractéristique d'un marquage des transporteurs au glutamate. A la limite de la zone d'infection, l'expression du transporteur GLAST à la membrane des astrocytes permet de visualiser leur structure en buisson (E2, 3).

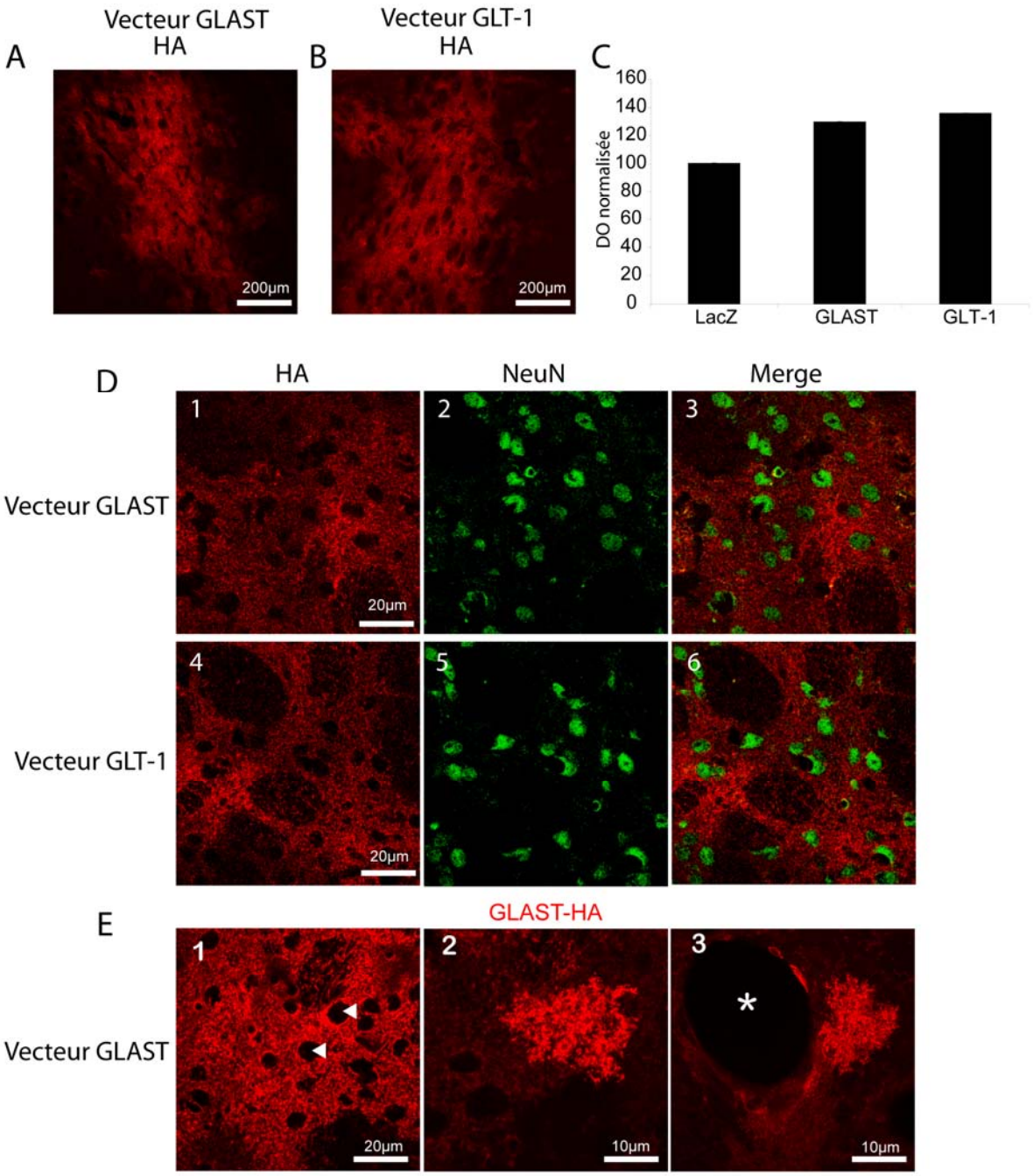


Figure 35: Surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1 *in vivo*. L'injection des vecteurs GLAST et GLT-1 est visualisée par le marquage HA dans le striatum de souris (A et B). La quantification par western blot (C) montre une surexpression de 29% avec le vecteur GLAST (Test de Student; p=0,16 ; n=3) et 35% avec le vecteur GLT-1 (Test de Student; p=0,054 ; n=3). L'expression de ces transporteurs est astrocytaire et correspond à un marquage du neuropile (D), les corps cellulaires des neurones apparaissent en noir (indiqués par les flèches en E1). La localisation menbranaire du marquage HA permet de visualiser la structure spécifique des astrocytes particulièrement au bord de la zone d'infection (E2, 3).

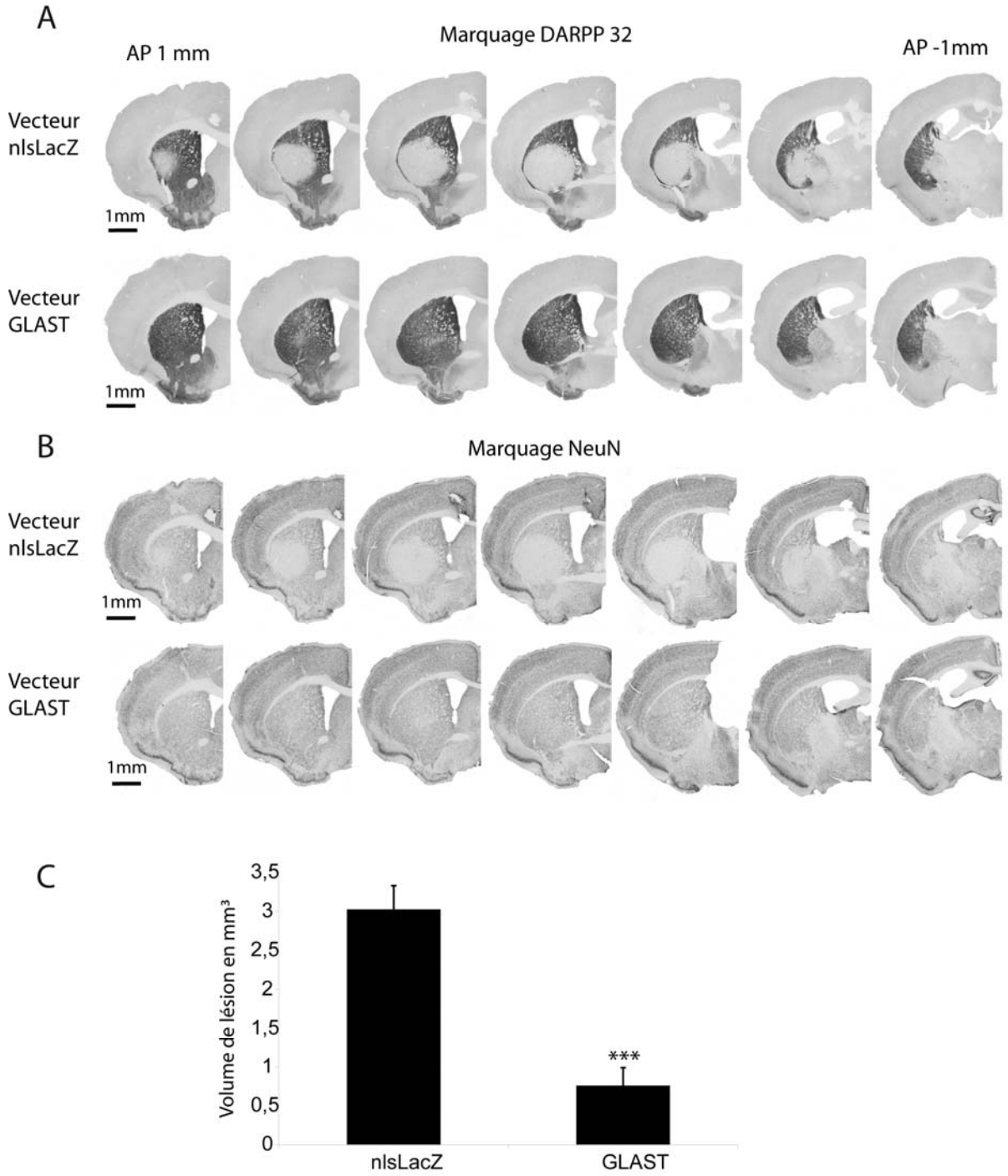


Figure 36: Effet protecteur de la surexpression de GLAST in vivo en condition excitotoxique. Après injection de quinolinate, une lésion se créé avec le vecteur contrôle nlsLacZ alors que l'injection du vecteur GLAST a un effet protecteur. Cet effet protecteur se retrouve avec un marquage DARPP32 (A) ainsi qu'un marquage des neurones NeuN (B). La quantification du volume de lésion montre une diminution significative de 3,0±0,3 mm³ (n=5) à 0,7±0,2 mm³ (n=7) (Test de Student, p=0,0003 ; en C) soit une diminution d'environ 76%.

Une fois la surexpression des transporteurs GLAST et GLT-1 confirmée, nous avons testé l'effet de cette surexpression sur la survie neuronale. Nous avons injecté du quinolinate, un agoniste du glutamate induisant une libération massive de glutamate et provoquant des lésions excitotoxiques, au niveau de la zone d'infection. Puis, des marquages DARPP 32 et NeuN ont été pratiqués. Nous avons mesuré le volume de la zone où une perte ou une diminution du marquage DARPP 32 est observée. Une perte importante du marquage DARPP32 est observée avec le vecteur contrôle exprimant le transgène LacZ. La surexpression de GLAST permet une diminution significative d'environ 76% de la lésion induite par le quinolinate, passant de 3,0 mm^3 à 0,7 mm^3 (Figure 36C). La perte de marquage DARPP32 est corrélée avec la perte neuronale correspondant à une perte du marquage NeuN (Figure 36B). La surexpression du transporteur GLAST permet une neuroprotection importante vis-à-vis de l'excitotoxicité du quinolinate en permettant une recapture accrue du glutamate par les astrocytes.

Par manque de reproductibilité de la lésion du quinolinate du côté contrôle, nous ne pouvons pas présenter les résultats obtenus après surexpression du transporteur GLT-1. De nouvelles expériences doivent être faites.

C. Inhibition de l'expression des transporteurs GLAST et GLT-1 *in vivo* par ARN interférence

Les transporteurs au glutamate ont un rôle important dans le couplage neurométabolique. Nous voulons ici étudier les effets d'une inhibition de ces transporteurs *in vivo*. Dans cette partie, nous avons utilisé notre vecteur afin d'inhiber l'expression des transporteurs GLAST et GLT-1 par ARN interférence. Pour cela, nous avons inséré dans les vecteurs des siARN. L'expression du siGLAST permet l'inhibition de la protéine GLAST en s'appariant avec son ARNm et en le dégradant. Il en est de même pour le siGLT-1. Afin de visualiser les cellules infectées, nos vecteurs expriment également le transgène nlsLacZ. Dans un premier temps, nous avons validé la fonctionnalité de nos vecteurs *in vitro*. Puis, nous avons injecté les vecteurs Mokola-PGK-nlsLacZ-miR124T-siGLAST (nommé vecteur siGLAST) et Mokola-PGK-nlsLacZ-miR124T-siGLT-1 (nommé vecteur siGLT-1) dans le striatum de souris. Un marquage des transporteurs a été fait pour visualiser leur inhibition. Nous avons également étudié la consommation de glucose dans la zone d'infection en condition basale afin de voir si la diminution des transporteurs a un effet sur le métabolisme.

1. Validation de la fonctionnalité des siARN

Les cellules 293T n'exprimant pas les transporteurs au glutamate, nous avons co-transfecté les cellules 293T avec les plasmides PGK-GLAST et PGK-GLT-1 et les plasmides PGK-nlsLacZ-siGLAST et PGK-nlsLacZ- siGLT-1. Nous avons ensuite effectué des RT-PCR pour quantifier les niveaux d'ARNm des transporteurs (Figure 37A, C). Les niveaux relatifs d'ARNm montrent une diminution significative de 73% pour le siGLT-1 et de 77% pour le siGLAST. Pour vérifier l'action des siARN au niveau de l'expression de la protéine, nous avons effectué des Western Blot sur les cellules 293T cotransfectées (Figure 37B, D). Nous pouvons voir que l'expression du transporteur GLAST et du transporteur GLT-1 est significativement diminuée après cotransfection des siARN, ce qui confirme la fonctionnalité des plasmides contenant nos siARN.

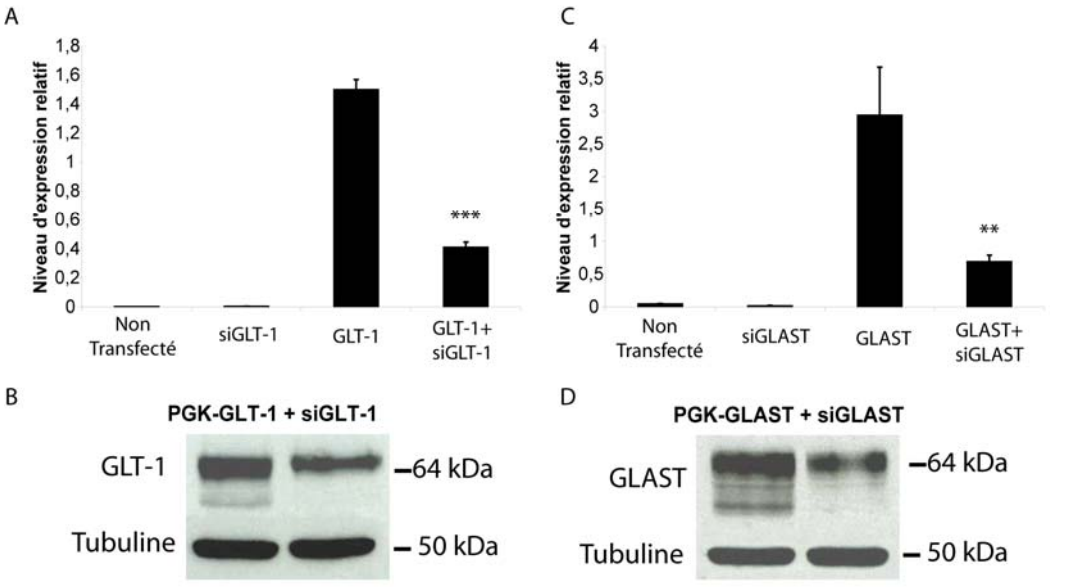


Figure 37: Validation de l'efficacité des siGLT-1 et siGLAST *in vitro*. Après transfection de cellules 293T, les RT-PCR montrent une forte diminution de l'expression des ARNm des transporteurs GLT-1 (1,50±0,07 pour le plasmide GLT-1 contre 0,41±0,03 avec siGLT-1; (n=5) Test de Student, p<0,001A) et GLAST (2,94±0,74 pour le plasmide GLAST contre 0,69±0,10 avec le siGLAST ;(n=5) Test de Student, p=0,01; C). Les Western Blot des transporteurs GLT-1 (B) et GLAST (D) montrent la diminution de l'expression des transporteurs après transfection des vecteurs contenant les siARN.

2. Inhibition de l'expression des transporteurs *in vivo*

Nous avons injecté les vecteurs Mokola-PGK-nlsLacZ-miR124T-siGLAST et Mokola-PGK-nlsLacZ-miR124T-siGLT-1 au niveau du striatum des souris. Puis un double marquage immunofluorescent pour le transgène LacZ et pour les transporteurs GLAST ou GLT-1 a été réalisé. L'injection du vecteur contrôle exprimant le siGFP ne provoque pas de diminution de l'expression des transporteurs colocalisée avec la zone d'infection, mais seulement très localisée au niveau de la descente de l'aiguille (Figure 39A). Au contraire, l'injection des siGLAST et siGLT-1 induit une diminution importante du marquage de GLAST et GLT-1, respectivement (Figure 38A). Cette diminution est colocalisée avec le marquage β-galactosidase. A plus fort grossissement, la frontière des membranes plasmiques entre les cellules infectées et les cellules non infectées est clairement visible grâce à la différence de niveau d'expression des transporteurs (Figure 38C, D, E, F). La quantification par Western Blot montre une diminution de 22% avec le vecteur siGLAST et de 47% avec le siGLT-1 (Figure 38B). Afin de tester la sélectivité de nos siARN, un marquage du transporteur non ciblé a été effectué (Figure 39B). L'injection de siGLAST ne provoque pas

de diminution de l'expression de GLT-1 et inversement. Nous avons donc réussi a diminué sélectivement l'expression des transporteurs au glutamate GLAST ou GLT-1 dans le striatum de la souris.

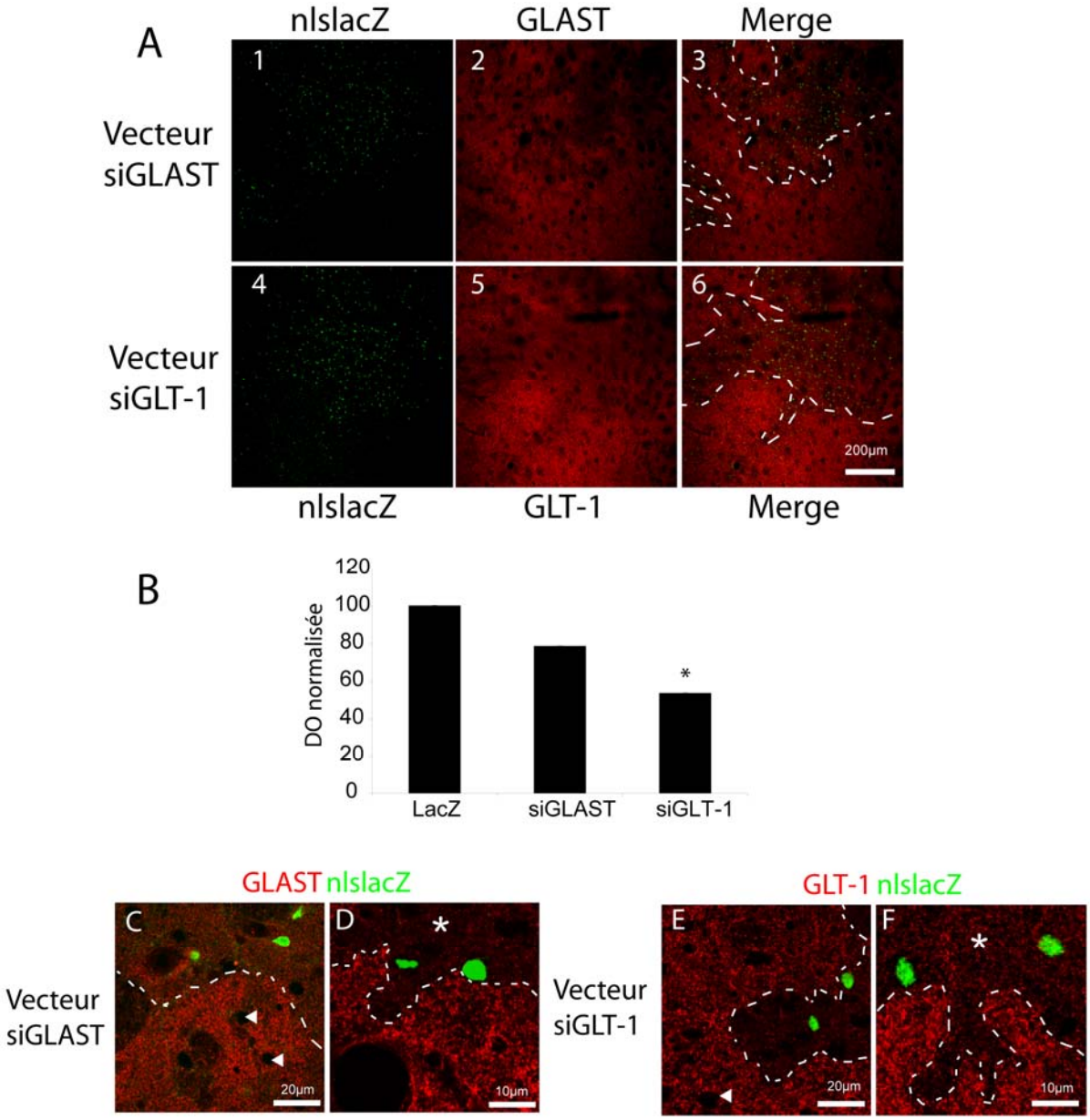


Figure 38: Inhibition de l'expression des transporteurs GLAST et GLT-1 *in vivo*. L'injection des vecteurs Mokola-PGK-miR124T-siGLAST et Mokola-PGK-miR124T-siGLT-1 provoque une diminution du marquage GLAST (A1, 2, 3) ou GLT-1 (A4, 5, 6) dans la zone d'infection exprimant le transgène LacZ(en vert). Cette diminution a été quantifiée par western blot (E) et est de l'ordre de 22% (Test de Student, p=0,25 ; n=3) pour le vecteur siGLAST et 47% pour siGLT-1 (Test de Student, p=0,03 ; n=3). Le marquage GLAST et GLT-1 révèle le corps cellulaire des neurones non marqués (flèche en C et E) et les astrocytes exprimant nlsLacZ sont plus faiblement marqués (indiqués par une étoile en D et F) que ceux qui les entourent.

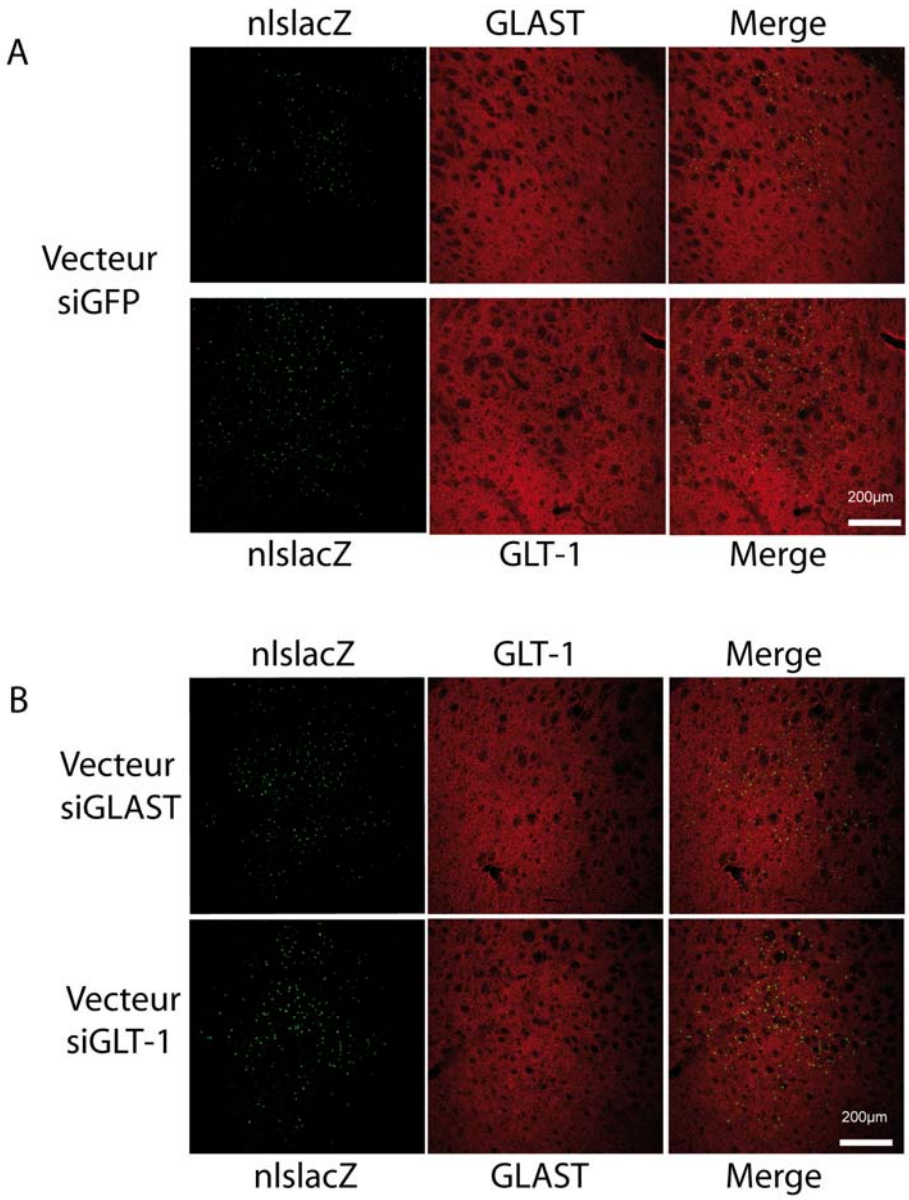


Figure 39 : Spécificité de l'inhibition des transporteurs GLAST et GLT-1 par les siARN. L'injection du vecteur contrôle Mokola-PGK-miR124T-siGFP (A) ne provoque pas de baisse du marquage GLAST ou GLT-1. La diminution du marquage observée figure 38 est spécifique puisque Mokola-PGK-miR124T-siGLAST ne provoque pas de diminution du marquage de GLT-1 (B) et inversement.

3. Effet sur la consommation de glucose

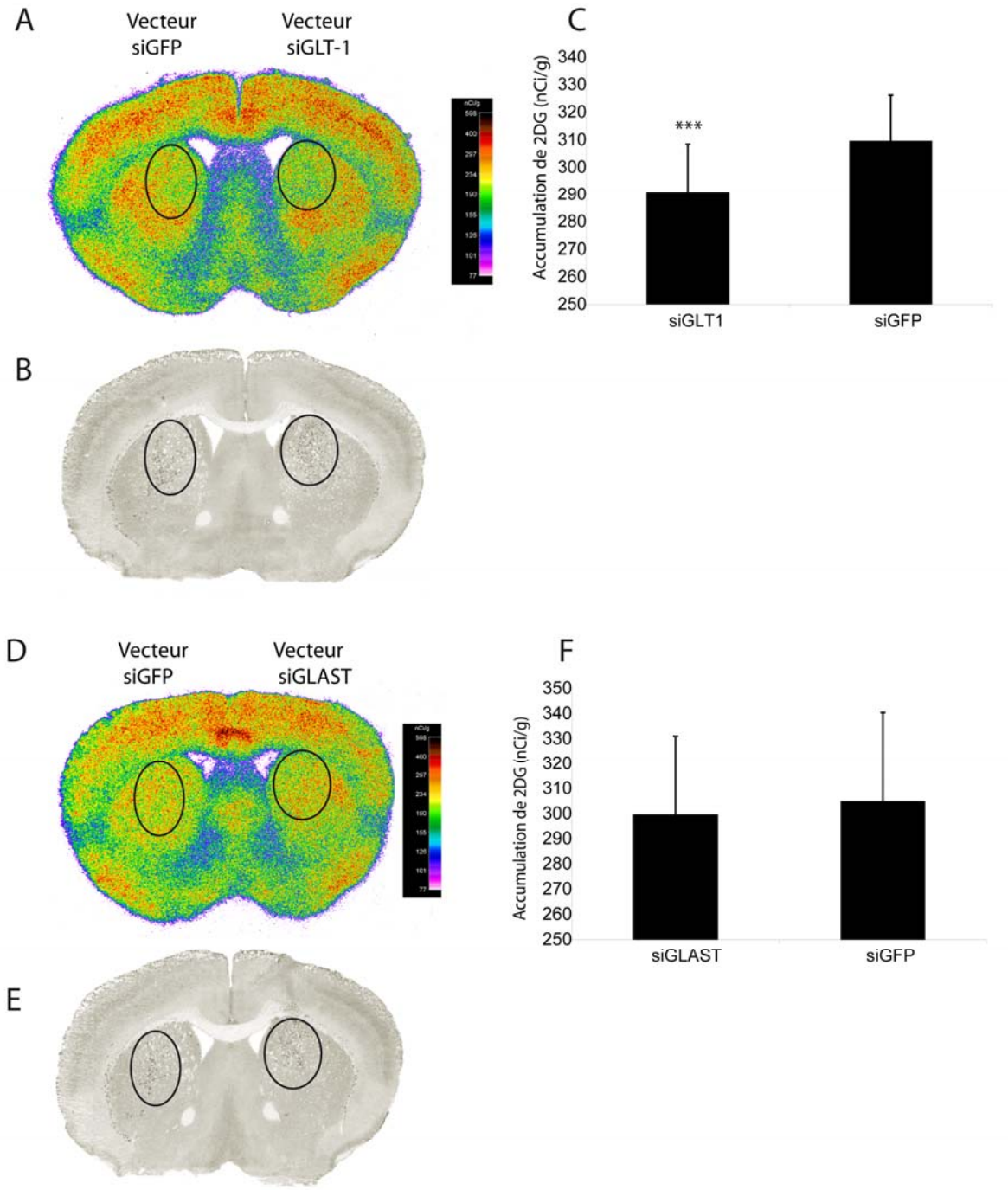


Figure 40: Effet de l'inhibition des transporteurs GLAST et GLT-1 sur la consommation basale de glucose. L'injection du vecteur Mokola-PGK-nlsLacZ-miR124T-siGLT-1 diminue l'accumulation du 2DG comme le montre le film autoradiographique en A. Cette diminution est colocalisée avec l'expression du transgène LacZ (en B). Bien que cette diminution soit faible (environ 6,2%) , elle est très significative (290±18 contre 309±16 nCi/g, n=6; Test de Student apparié, p=0,0008 ; en C). Au contraire, l'analyse des films autoradiographiques en correspondance avec les marquages LacZ n'a montré aucune différence entre l'injection du vecteur Mokola-PGK-nlsLacZ-miR124T-siGLT-1 et le vecteur contrôle Mokola-PGK-nlsLacZ-miR124T-siGFP (299±31 contre 304±35 nCi/g, n=6; Test de Student apparié, p=0,32 ; D, E, F).

Une fois l'inhibition des transporteurs confirmée, nous avons testé l'effet de cette diminution sur la consommation de glucose cérébrale. Des souris ayant été injectées avec nos siARN, ont reçu du 2-déoxy-D-[14C]glucose (2DG) en injection intrapéritonéale, puis 45 minutes plus tard, les cerveaux ont été congelés et coupés au cryostat. Une série de coupes a été exposée sur un film autoradiographique et une autre série a été utilisée pour effectuer un marquage LacZ pour visualiser la zone d'infection. L'accumulation de 2DG dans la cellule est proportionnelle à la consommation de glucose, nous avons donc pu visualiser de façon indirecte la consommation de glucose au niveau cérébral (Figure 40). Après injection du vecteur exprimant le siGLAST, l'analyse des films autoradiographiques ne montre pas de changement d'accumulation de 2DG en comparaison au côté contrôle (Figure 40D, E, F). Au contraire, le siGLT-1 provoque une diminution faible, de l'ordre de 6%, mais très significative de cette accumulation (Figure 40A, B, C). Cette diminution est colocalisée avec le marquage des cellules infectées LacZ et reflète une diminution de la consommation de glucose.

D. Discussion

1. Morphologie des astrocytes

En utilisant un transgène GFP qui permet de marquer les plus fins prolongements, nous avons pu visualiser la morphologie complète des astrocytes transduits. Les marquages immunohistochimiques ne permettent pas une visualisation optimale de la morphologie des astrocytes. En effet, un marquage GFAP permet seulement de visualiser les prolongements épais mais pas les plus fins (Simard, Arcuino et al. 2003). Un marquage S100β ou GS permet de visualiser de façon plus complète ces prolongements mais ne permet pas de distinguer l'ensemble du volume occupé par la cellule de façon distincte de celui des cellules voisines. De plus, ces marqueurs identifient des sous-populations de cellules qui ne se recoupent pas toujours (Emsley and Macklis 2006; Raponi, Agenes et al. 2007). La GFAP n'est exprimée que dans une sous-population de cellules et de façon très variable (Gotz and Steindler 2003). Cette protéine est également exprimée dans des précurseurs neuronaux ou dans les oligodendrocytes (Nolte, Matyash et al. 2001; Emsley and Macklis 2006; Ganat, Silbereis et al. 2006). S100β est quant à lui exprimé dans une partie des oligodendrocytes (Vives, Alonso et al. 2003; Deloulme, Raponi et al. 2004; Buffo, Vosko et al. 2005; Steiner, Bernstein et al. 2007). Récemment, des souris transgéniques permettant une expression du transgène GFP

dans des sous-populations d'astrocytes représentent une avancée considérable dans l'étude de la morphologie et de la fonction de astrocytes (Mori, Tanaka et al. 2006; Slezak, Goritz et al. 2007; Pascual, Casper et al. 2005; Hirrlinger, Hulsmann et al. 2004). A côté des souris transgéniques qui demandent un investissement important, les vecteurs lentiviraux représentent une alternative plus versatile à l'étude des astrocytes. La visualisation individuelle, surtout à la limite de la zone d'infection, des astrocytes du striatum, du cervelet (glie de Bergmann ou granulaire) et de l'hippocampe indique que notre outil permet la transduction de sous-populations diverses d'astrocytes. L'utilisation de deux transgènes différents comme la GFP et la dsRed pourrait permettre l'étude des domaines astrocytaires et de leurs recouvrements. En effet, l'étude de la morphologie des astrocytes est un sujet de recherche très intéressant (Kimelberg 2004). Les données sur les domaines astrocytaires sont différentes selon les méthodes de marquage ou d'analyse (Bushong, Martone et al. 2002; Ogata and Kosaka 2002; Chvatal, Anderova et al. 2007; Halassa, Fellin et al. 2007; Oberheim, Tian et al. 2008). L'utilisation d'un outil qui permet une visualisation des cellules sans perturber la membrane cellulaire par des injections de fluorochrome ou de marquages diolistiques peut permettre une avancée dans ce domaine. Ainsi, Halassa et al., en utilisant un marquage qui ne perturbe pas la membrane, arrivent à une estimation plus faible du volume astrocytaire que les autres études. Dans cette optique, la construction récente de souris transgéniques Brainbow permettant une expression dans les astrocytes de marqueurs fluorescents de couleurs variées permettra une étude très intéressante de la morphologie du volume et des domaines astrocytaires dans des conditions idéales (Livet, Weissman et al. 2007).

2. Conséquences d'une inhibition des transporteurs au glutamate

Nos résultats concernant les siARN montrent qu'une inhibition du transporteur majoritaire GLT-1 a plus d'impact sur le métabolisme énergétique de base qu'une inhibition de GLAST. Dans le striatum, GLT-1 est fortement exprimé et est responsable de la grande majorité du transport de glutamate (Rothstein, Dykes-Hoberg et al. 1996; Furuta, Rothstein et al. 1997; Tanaka, Watase et al. 1997; Watase, Hashimoto et al. 1998). D'autre part, l'efficacité de notre inhibition par les siARN n'est que partielle et elle est plus faible avec le siGLAST (-22%) qu'avec le siGLT-1 (-47%).

Nos résultats préliminaires indiquent une consommation de glucose plus faible d'environ 6% après inhibition du transporteur GLT-1. Cependant, une étude plus complète

doit être réalisée pour confirmer cet effet. Les expériences portant sur les effets fonctionnels d'une inhibition transitoire du transporteur GLT-1 par une approche antisens, montrent qu'une perte d'expression de 58% induit une diminution du transport de l'ordre de 60% et une augmentation de 32 fois du taux de glutamate extracellulaire (Rothstein, Dykes-Hoberg et al. 1996). L'étude de la morphologie des neurones montre une vacuolisation importante et un grossissement du volume cellulaire. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de l'expression de GLT-1 peut avoir des effets neurotoxiques. Cependant, les marquages NeuN et DARPP32 réalisés dans nos souris trois semaines après l'injection des siARN n'ont montré aucune différence entre les groupes (résultats non présentés). Il serait nécessaire de suivre l'évolution des marquages NeuN et DARPP32 à des temps plus tardifs. Etant donnée la perturbation du métabolisme observée à quatre semaines post-injection, d'autres perturbations pourraient apparaitre avec le temps. En effet, une baisse de l'expression de GLT-1 de 47% pourrait avoir un impact significatif sur le transport et le niveau de glutamate extracellulaire et donc entrainer un état d'hyperexcitabilité (Campbell and Hablitz 2004) pouvant conduire à la mort neuronale par excitotoxicité. Son inhibition pourrait induire, selon les synapses, une augmentation de la durée des PPSE et une diminution du seuil de déclenchement d'une activité épileptique (Barbour, Keller et al. 1994; Takahashi, Kovalchuk et al. 1995; Campbell and Hablitz 2004; Campbell and Hablitz 2008) de façon NMDA dépendante. La diminution du transport du glutamate augmente également le spillover du glutamate et peut perturber les signaux synaptiques en activant les récepteurs extrasynaptiques (Huang and Bergles 2004; Huang, Sinha et al. 2004; Volterra and Meldolesi 2005; Zheng, Scimemi et al. 2008).

Les mécanismes complexes d'interactions entre glutamate, transporteurs et récepteurs ont un rôle important et méritent d'être étudiés plus précisément. Notre modèle pourra être une base de recherche utile.

Des expériences de microdialyse sur nos souris injectées avec les siARN en condition de repos et en condition d'excitotoxicité (injection de Quinolinate) sont en cours. Ces expériences vont permettre de confirmer la perturbation probable du transport et du taux de glutamate extracellulaire. De plus, dans des conditions excitotoxiques, après perfusion de quinolinate, ces expériences vont nous permettent de suivre la gestion du glutamate en condition d'activation. Il serait également intéressant d'étudier la réponse métabolique en condition d'activation, après injection de quinolinate. En effet, l'hypothèse du couplage neurométabolique (Pellerin, Bouzier-Sore et al. 2007) soutient que l'utilisation de glucose par les astrocytes est couplée au transport de glutamate lors d'une activation fonctionnelle. Ainsi, chez les souris KO pour les transporteurs GLAST et GLT-1, l'augmentation de glucose

observée pendant une stimulation est diminuée (Voutsinos-Porche, Bonvento et al. 2003; Herard, Dubois et al. 2005). La visualisation du couplage métabolique s'est toujours fait en condition d'activation (Cholet, Pellerin et al. 2001; Voutsinos-Porche, Bonvento et al. 2003; Herard, Dubois et al. 2005).

Les études précédentes ont été réalisées à l'aide de modèles d'inhibition chronique des transporteurs (souris KO) ou aigüe (inhibiteurs ou oligonucléotides antisens). Chez les souris KO, l'inhibition des transporteurs se fait pendant le développement et peut provoquer des mécanismes de compensation. De plus, le phénotype des souris adultes KO GLT-1 est létal. Les inhibiteurs des transporteurs au glutamate threo-β-hydroxyaspartate, acide trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic ou DLthreo-β-benzyloxyaspartate (TBOA) sont des inhibiteurs sans spécificité envers un sous-type particulier. Le dihydrokainate (DHK) est un inhibiteur sélectif de GLT-1. Cependant, une étude récente suggère que cet inhibiteur aurait d'autres cibles (Bernardinelli and Chatton 2008). L'inhibiteur WAY-855 semble plus spécifique (Selkirk, Nottebaum et al. 2005). Cependant leur utilisation ne permet pas une étude chronique de l'inhibition. Notre modèle permettra l'étude des conséquences d'une inhibition locale et spécifique des transporteurs de façon chronique et est dans ce sens très prometteur.

Ces expériences montrent qu'il est possible de provoquer des altérations métaboliques et d'induire des conditions potentiellement toxiques pour les neurones en manipulant uniquement les transporteurs astrocytaires au glutamate. Ces données sont intéressantes en regard de nombreuses pathologies neurodégénératives où sont observées des perturbations du transport de glutamate (pour revue, Beart and O'Shea 2007). Une question encore ouverte est celle de savoir si le début de la neurodégénérescence précède ou suit l'altération des transporteurs dans ces maladies. Ce nouvel outil permettra, dans cette optique, de mieux caractériser les effets d'une diminution du transport *in vivo* et de mieux comprendre les mécanismes qui peuvent provoquer une perte neuronale.

3. Une surexpression modérée des transporteurs pour un effet neuroprotecteur important

Une surexpression modérée du transporteur GLAST pourrait néanmoins avoir un effet neuroprotecteur significatif. Ces résultats suggèrent que ce transporteur est fonctionnel et qu'il permet une augmentation du transport de glutamate. Après injection du vecteur codant pour les transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1, la quantification par Western Blot

d'une partie du tissu cérébral prélevé par punch a montré une augmentation limitée de l'expression des protéines correspondantes. Une quantification plus précise utilisant des techniques de microdissection laser afin de doser les ARNm serait à envisager. La surexpression des transporteurs pourrait également être limitée par des mécanismes de régulation dans la cellule cible. En effet, comme nous l'avons décrit en introduction, de nombreux facteurs peuvent réguler la transcription, l'activité ou le trafic intracellulaire des transporteurs au glutamate (Danbolt 2001; Robinson 2002). Etant donné le rôle majeur des transporteurs dans la transmission glutamatergique et donc les conséquences potentielles d'une dérégulation, il est possible que ce genre de mécanismes puisse restreindre l'efficacité de notre surexpression. Des expériences plus poussées pour connaitre les interactions qu'il peut y avoir et les conséquences d'une surexpression des transporteurs sont proposées dans la partie suivante.

De nombreuses expériences *in vivo* montrent que la recapture du glutamate peut être augmentée après surexpression de GLT-1 grâce à l'application de substances activatrices ou à la surexpression de GLT-1 par des vecteurs (Schlag, Vondrasek et al. 1998; Shimada, Shiga et al. 1999; Figiel and Engele 2000; Guo, Lai et al. 2003; Rothstein, Patel et al. 2005; Ganel, Ho et al. 2006; O'Shea, Lau et al. 2006; Koeberle and Bahr 2008; Miller, Dorner et al. 2008; Weller, Stone et al. 2008). L'augmentation de l'expression des transporteurs peut aller de 20% à 160% selon les cas. L'uptake, quant à lui, ne subit pas forcément une augmentation du même ordre. Ainsi, le LPS augmente l'expression de GLT-1 de 46% et l'uptake de 30% (O'Shea, Lau et al. 2006) tandis que le ceftriaxone augmente l'expression de 150 % et l'uptake de 25% (Miller, Dorner et al. 2008). Les régulations post-traductionnelles sont également à prendre en compte. Des études de microdialyse afin de quantifier l'augmentation de l'uptake induit par notre surexpression me semblent indispensables pour une meilleure interprétation des résultats.

Le quinolinate est un agoniste des récepteurs NMDA qui induit également la libération massive de glutamate. Ce glutamate libéré active ses récepteurs ionotropiques et induit un influx d'ions Ca^{2+} et Na^{+}. Ces ions induisent un gonflement des cellules et la dérégulation de l'homéostasie calcique entrainant la mort des neurones (Sattler and Tymianski 2001; Arundine and Tymianski 2003). Le fait que la lésion engendrée par le quinolinate soit réduite par la surexpression du transporteur GLAST suggère qu'une recapture accrue du glutamate permettrait de diminuer l'activation des récepteurs au glutamate responsables de la mort neuronale par excitotoxicité.

Plusieurs études ont montré l'effet neuroprotecteur de substances qui permettent une augmentation de l'expression ou de l'activité des transporteurs GLAST ou GLT-1 (Guo, Lai et al. 2003; Rothstein, Patel et al. 2005; Ganel, Ho et al. 2006; Lipski, Wan et al. 2007; Koeberle and Bahr 2008; Miller, Dorner et al. 2008). Ces substances (antibiotiques de type b-lactame, facteurs de croissance, ligands des récepteurs neuroimmunophilines, drogues comme le MS-153) ont pour effet d'améliorer la recapture de glutamate mais leur spécificité n'a pas été prouvée et leurs effets peuvent être divers. Seules quelques études très récentes ont spécifiquement manipulé les transporteurs. Weller et al ont montré que l'augmentation de l'expression du transporteur GLT-1 grâce à un vecteur viral permet une augmentation de la recapture de glutamate et a un effet neuroprotecteur en condition ischémique modérée sur des tranches d'hippocampe (Weller, Stone et al. 2008). Guo et al., ont montré que la surexpression de GLAST par des souris transgéniques augmentait la neuroprotection et retardait la mort neuronale chez les souris modèles de la SLA (Guo, Lai et al. 2003).

En conclusion, notre modèle de surexpression permet une modulation spécifique des transporteurs *in vivo* au stade adulte et restreinte localement. Pour une meilleure connaissance des astrocytes, notre outil pourrait représenter une avancée significative.

4. La surexpression des transporteurs dans les maladies neurodégénératives

La SLA est une maladie neurodégénérative qui présente, entre autre, un déficit du transporteur au glutamate GLT-1 (Boston-Howes, Gibb et al. 2006 ; Rothstein, Van Kammen et al. 1995; Alexander, Deitch et al. 2000; Howland, Liu et al. 2002; Dunlop, Beal McIlvain et al. 2003). La maladie de Huntington est associée à une perturbation du système glutamatergique du point de vue de l'exocytose du glutamate (Nicniocaill, Haraldsson et al. 2001 ; Li, Wyman et al. 2003), de l'activation des récepteurs NMDA (Sun, Savanenin et al. 2001) et des transporteurs au glutamate (Arzberger, Krampfl et al. 1997 ; Lievens, Woodman et al. 2001; Hassel, Tessler et al. 2008 ; Behrens, Franz et al. 2002; Shin, Fang et al. 2005). L'implication de GLT-1 dans la pathogénèse de ces maladies reste encore à déterminer, de nombreux autres facteurs sont impliqués. Cependant, l'utilisation de la surexpression des transporteurs pour diminuer la neurodégénérescence, et dans certains cas le phénotype pathologique, est efficace dans différents modèles animaux (Umemura, Gemba et al. 1996; Guo, Lai et al. 2003; Rothstein, Patel et al. 2005; Ganel, Ho et al. 2006; Koeberle and Bahr 2008; Miller, Dorner et al. 2008). Ces expériences confirment l'importance du rôle de ces

transporteurs dans ces maladies et leur intérêt thérapeutique. En dehors de la diminution de l'excitotoxicité, l'augmentation des transporteurs pourrait avoir des effets bénéfiques au niveau du métabolisme. En effet, le couplage neurométabolique neurones-astrocytes pourrait entrainer une augmentation de l'apport énergétique aux neurones (Pellerin, Bouzier-Sore et al. 2007). Ceci créerait un environnement neuroprotecteur avec l'accumulation de réserve d'énergie pour le neurone. De plus, la maladie de Huntington est associée à des déficits du métabolisme astrocytaire (Powers, Videen et al. 2007).

La surexpression des transporteurs créerait ainsi un climat neuroprotecteur du point de vue excitotoxique et métabolique. Cependant, il faut également considérer que le fonctionnement des transporteurs au glutamate s'inverse lorsque le gradient de Na^+/K^+ s'effondre à cause d'un manque d'énergie. Ils libèrent alors le glutamate dans la fente synaptique (Longuemare and Swanson 1995; Phillis, Ren et al. 2000; Campiani, Fattorusso et al. 2003) jouant un rôle important en exacerbant les phénomènes d'excitotoxicité. Il semblerait ainsi que le bénéfice apporté par plus de transporteurs se transforme en désavantage (Mitani and Tanaka 2003). Récemment, un composé permettant d'inhiber spécifiquement le transport inverse des transporteurs a été découvert (Colleoni, Jensen et al. 2008). De plus amples recherches doivent être entreprises pour mieux considérer les conséquences d'une surexpression des transporteurs.

5. Perspectives

Comme nos résultats l'ont montré, les transporteurs peuvent influencer la consommation de glucose. Selon l'hypothèse du couplage métabolique neurones-astrocytes, une augmentation du transport permettrait une augmentation du métabolisme glycolytique astrocytaire. Le lactate produit serait relargué de façon accrue afin qu'il soit utilisé par le neurone (Pellerin, Bouzier-Sore et al. 2007). Il a été montré que chez les souris transgéniques surexprimant GLT-1, la composition des sous-unités de la pompe Na+/K+ ATPase est modifiée et son fonctionnement activée (Guo, Lai et al. 2003). De tels changements seraient à étudier dans nos conditions expérimentales. Il serait également intéressant de doser la glutamine synthétase. Cette enzyme permet le recyclage du glutamate capté en glutamine qui est transféré aux neurones pour reconstruire le pool de glutamate. In vitro, le PACAP ou le glutamate qui permet une augmentation du transport induit également une surexpression de la glutamine synthétase (Figiel and Engele 2000 ; Fonseca 2005). Afin de mieux comprendre les processus d'adaptation à une recapture de glutamate élevée, il serait intéressant d'étudier la

consommation de glucose en condition d'activation, l'expression des transporteurs au monocarboxylate MCT1 et MCT2 et la concentration de lactate extracellulaire grâce à notre modèle.

La gestion du glutamate extracellulaire est un mécanisme très complexe mettant en jeu de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Etant donné le rôle majeur des transporteurs dans la transmission glutamatergique, il est possible que de nombreux mécanismes se mettent en place suite à une surexpression. Des mécanismes de régulation des récepteurs impliquant des boucles de rétrocontrôle négatif seraient dépendantes de l'activité et du glutamate extracellulaire (Thiagarajan, Lindskog et al. 2007; Turrigiano 2007). De nombreux mécanismes de plasticité existent au niveau présynaptique mais également post-synaptique. L'adaptation des neurones à une diminution de l'activité synaptique peut se refléter par une augmentation du relarguage du glutamate ou une augmentation des récepteurs AMPA ou NMDA. D'autre part, une augmentation du glutamate extracellulaire peut entrainer via les récepteurs métabotropiques présynaptiques une diminution du relarguage de glutamate (Oliet, Piet et al. 2001). Etant donné la complexité des synapses et leur hétérogénéité, une modulation du glutamate extracellulaire peut avoir des effets variés. Des études électrophysiologiques mesurant les courants NMDA et AMPA (Tzingounis and Wadiche 2007) pourraient être menées grâce à nos modèles de surexpression et d'inhibition des transporteurs afin de mieux connaitre les interactions neurones-astrocytes au niveau de la synapse et les conséquences sur les taux de glutamate extracellulaire. Dans ce contexte, il serait utile également d'étudier le niveau de l'expression des différents récepteurs au glutamate.

En conclusion, la surexpression des transporteurs comme approche thérapeutique dans les maladies neurodégénératives, bien que très préliminaire, semble intéressant sur de nombreux points. Cette surexpression pourrait permettre de produire un environnement neuroprotecteur d'un point de vue métabolique, glutamatergique et oxydatif. Cependant, les transporteurs au glutamate ayant des rôles divers et très importants, il reste encore de nombreux points à étudier afin de permettre le maintien des différentes voies impliquées en un équilibre fonctionnel bénéfique.

VII. Conclusion

Nous avons réussi à développer un outil de ciblage astrocytaire performant qui permettra la modulation des gènes astrocytaires in vivo. Ce vecteur lentiviral novateur associe une enveloppe Mokola à une cible du microARN miR124, spécifique des neurones, permettant ainsi une expression du transgène spécifiquement dans les astrocytes. La fonctionnalité de cet outil a été validée par les résultats préliminaires obtenus par surexpression ou inhibition des transporteurs astrocytaires au glutamate. La surexpression du transporteur GLAST permet une neuroprotection importante en condition excitotoxique tandis que l'inhibition de GLT-1 induit une diminution du métabolisme cérébral. Ces premiers résultats confirment le rôle central des astrocytes dans le système nerveux central. Ce travail a permis de créer un nouveau moyen d'exploration utile à une meilleure compréhension du fonctionnement des astrocytes *in vivo*.

Références bibliographiques

Abbas-Terki, T., W. Blanco-Bose, et al. (2002). "Lentiviral-Mediated RNA Interference." Hum Gene Ther 13(18): 2197-2201.
Abordo-Adesida, E., A. Follenzi, et al. (2005). "Stability of lentiviral vector-mediated transgene expression in the brain in the presence of systemic antivector immune responses." Hum Gene Ther 16(6): 741-51.
Addison, C. L., M. Hitt, et al. (1997). "Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors." J Gen Virol 78 (Pt 7): 1653-61.
Agulhon, C., J. Petravicz, et al. (2008). "What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology?" Neuron 59(6): 932-46.
Aiken, C. (1997). "Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A." J Virol 71(8): 5871-7.
Aires da Silva, F., M. J. Costa, et al. (2005). "Cell type-specific targeting with sindbis pseudotyped lentiviral vectors displaying anti-CCR5 single-chain antibodies." Hum Gene Ther 16(2): 223-34.
Alba, R., A. Bosch, et al. (2005). "Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy." Gene Ther 12 Suppl 1: S18-27.
Aleman, L. M., J. Doench, et al. (2007). "Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects." Rna 13(3): 385-95.
Alexander, G. M., J. S. Deitch, et al. (2000). "Elevated cortical extracellular fluid glutamate in transgenic mice expressing human mutant (G93A) Cu/Zn superoxide dismutase." J Neurochem 74(4): 1666-73.
Allen, A. M., J. Dosanjh, et al. (2006). "Baroreceptor reflex stimulation does not induce cytomegalovirus promoter-driven transgene expression in the ventrolateral medulla in vivo." Auton Neurosci 126-127: 150-5.
Alves, S., I. Nascimento-Ferreira, et al. (2008). "Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease." PLoS ONE 3(10): e3341.
Amateau, S. K. and M. M. McCarthy (2002). "Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area." J Neuroendocrinol 14(11): 904-10.
Anderson, C. M., R. J. Bridges, et al. (2001). "Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal." J Neurochem 79(6): 1207-16.
Aoyama, K., S. W. Suh, et al. (2006). "Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse." Nat Neurosci 9(1): 119-26.
Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, et al. (2007). "HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore." Embo J 26(12): 3025-37.
Arundine, M. and M. Tymianski (2003). "Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity." Cell Calcium 34(4-5): 325-37.
Arzberger, T., K. Krampfl, et al. (1997). "Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study." J Neuropathol Exp Neurol 56(4): 440-54.
Attwell, D. and A. Gibb (2005). "Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses." Nat Rev Neurosci 6(11): 841-9.
Attwell, D. and S. B. Laughlin (2001). "An energy budget for signaling in the grey matter of the brain." J Cereb Blood Flow Metab 21(10): 1133-45.
Azzouz, M., S. M. Kingsman, et al. (2004). "Lentiviral vectors for treating and modeling human CNS disorders." J Gene Med 6(9): 951-62.
Bagga, S., J. Bracht, et al. (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." Cell 122(4): 553-63.
Balaggan, K. S., K. Binley, et al. (2006). "Stable and efficient intraocular gene transfer using pseudotyped EIAV lentiviral vectors." J Gene Med 8(3): 275-85.
Barbour, B., B. U. Keller, et al. (1994). "Prolonged presence of glutamate during excitatory synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells." Neuron 12(6): 1331-43.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-97.
Bartosch, B. and F. L. Cosset (2004). "Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses." Curr Gene Ther 4(4): 427-43.
Bartz, S. R. and M. A. Vodicka (1997). "Production of high-titer human immunodeficiency virus type 1 pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein." Methods 12(4): 337-42.
Beart, P. M. and R. D. O'Shea (2007). "Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement." Br J Pharmacol 150(1): 5-17.
Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, et al. (2006). "MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 71: 523-30.
Behrens, P. F., P. Franz, et al. (2002). "Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation." Brain 125(Pt 8): 1908-22.
Bemelmans, A. P., S. Bonnel, et al. (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(10): 1367-74.
Benarroch, E. E. (2005). "Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system." Mayo Clin Proc 80(10): 1326-38.
Bendotti, C., M. Tortarolo, et al. (2001). "Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels." J Neurochem 79(4): 737-46.
Bennett, M. V., L. C. Barrio, et al. (1991). "Gap junctions: new tools, new answers, new questions." Neuron 6(3): 305-20.
Berezikov, E., F. Thuemmler, et al. (2006). "Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain." Nat Genet 38(12): 1375-7.
Berger, U. V., T. M. DeSilva, et al. (2005). "Cellular and subcellular mRNA localization of glutamate transporter isoforms GLT1a and GLT1b in rat brain by in situ hybridization." J Comp Neurol 492(1): 78-89.
Berger, U. V. and M. A. Hediger (1998). "Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization." Anat Embryol (Berl) 198(1): 13-30.
Bernardinelli, Y. and J. Y. Chatton (2008). "Differential effects of glutamate transporter inhibitors on the global electrophysiological response of astrocytes to neuronal stimulation." Brain Res.
Berry, C., S. Hannenhalli, et al. (2006). "Selection of target sites for mobile DNA integration in the human genome." PLoS Comput Biol 2(11): e157.
Biglari, A., D. Bataille, et al. (2004). "Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model." Cancer Gene Ther 11(11): 721-32.
Bloch, J., A. C. Bachoud-Levi, et al. (2004). "Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study." Hum Gene Ther 15(10): 968-75.
Blomer, U., L. Naldini, et al. (1997). "Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector." J Virol 71(9): 6641-9.
Boado, R. J., Y. Zhang, et al. (2007). "Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and abeta fibril disaggregation." Bioconjug Chem 18(2): 447-55.
Bonde, C., J. Noraberg, et al. (2005). "Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures." Neuroscience 136(3): 779-94.
Bonde, C., A. Sarup, et al. (2003). "Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions." Neurochem Int 43(4-5): 371-80.
Borrell-Pages, M., D. Zala, et al. (2006). "Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies." Cell Mol Life Sci 63(22): 2642-60.
Boston-Howes, W., S. L. Gibb, et al. (2006). "Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2." J Biol Chem 281(20): 14076-84.

Bouzier-Sore, A. K., P. Voisin, et al. (2006). "Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study." Eur J Neurosci 24(6): 1687-94.

Bouzier-Sore, A. K., P. Voisin, et al. (2003). "Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture." J Cereb Blood Flow Metab 23(11): 1298-306.

Bowers, W. J., J. A. Olschowka, et al. (2003). "Immune responses to replication-defective HSV-1 type vectors within the CNS: implications for gene therapy." Gene Ther 10(11): 941-5.

Boyd, S. D. (2008). "Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask." Lab Invest 88(6): 569-78.

Bracken, C. P., P. A. Gregory, et al. (2008). "A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition." Cancer Res 68(19): 7846-54.

Brennecke, J., A. Stark, et al. (2005). "Principles of microRNA-target recognition." PLoS Biol 3(3): e85.

Brenner, M., W. C. Kisseberth, et al. (1994). "GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in tansgenic mice." J.Neurosci. 14: 1030-1037.

Broekman, M. L., L. A. Comer, et al. (2006). "Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV-1 or -2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain." Neuroscience 138(2): 501-10.

Brooks, A. R., R. N. Harkins, et al. (2004). "Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle." J Gene Med 6(4): 395-404.

Brown, B. D., B. Gentner, et al. (2007). "Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state." Nat Biotechnol 25(12): 1457-67.

Brown, B. D., M. A. Venneri, et al. (2006). "Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer." Nat Med 12(5): 585-91.

Browne, S. E. and M. F. Beal (2004). "The energetics of Huntington's disease." Neurochem Res 29(3): 531-46.

Browne, S. E. and M. F. Beal (2006). "Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis." Antioxid Redox Signal 8(11-12): 2061-73.

Bruijn, L. I., M. W. Becher, et al. (1997). "ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions." Neuron 18(2): 327-38.

Brummelkamp, T. R., R. Bernards, et al. (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science 296(5567): 550-3.

Buchschacher, G. L., Jr. and F. Wong-Staal (2000). "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases." Blood 95(8): 2499-504.

Buffo, A., M. R. Vosko, et al. (2005). "Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair." Proc Natl Acad Sci U S A 102(50): 18183-8.

Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1993). "Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection." Proc Natl Acad Sci U S A 90(13): 6125-9.

Burger, C., O. S. Gorbatyuk, et al. (2004). "Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system." Mol Ther 10(2): 302-17.

Burger, C., K. Nash, et al. (2005). "Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system." Hum Gene Ther 16(7): 781-91.

Burns, J. C., T. Friedmann, et al. (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(17): 8033-7.

Bushong, E. A., M. E. Martone, et al. (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." J Neurosci 22(1): 183-92.

Butchbach, M. E., G. Tian, et al. (2004). "Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function." J Biol Chem 279(33): 34388-96.
Cahoy, J. D., B. Emery, et al. (2008). "A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function." J Neurosci 28(1): 264-78.
Campbell, S. L. and J. J. Hablitz (2004). "Glutamate transporters regulate excitability in local networks in rat neocortex." Neuroscience 127(3): 625-35.
Campbell, S. L. and J. J. Hablitz (2008). "Decreased glutamate transport enhances excitability in a rat model of cortical dysplasia." Neurobiol Dis 32(2): 254-61.
Campiani, G., C. Fattorusso, et al. (2003). "Neuronal high-affinity sodium-dependent glutamate transporters (EAATs): targets for the development of novel therapeutics against neurodegenerative diseases." Curr Pharm Des 9(8): 599-625.
Canolle, B., F. Masmejean, et al. (2004). "Glial soluble factors regulate the activity and expression of the neuronal glutamate transporter EAAC1: implication of cholesterol." J Neurochem 88(6): 1521-32.
Cao, X., S. L. Pfaff, et al. (2007). "A functional study of miR-124 in the developing neural tube." Genes Dev 21(5): 531-6.
Carneiro, F. A., P. A. Lapido-Loureiro, et al. (2006). "Probing the interaction between vesicular stomatitis virus and phosphatidylserine." Eur Biophys J 35(2): 145-54.
Carthew, R. W. (2006). "Gene regulation by microRNAs." Curr Opin Genet Dev 16(2): 203-8.
Castro, M., A. Hurtado-Lorenzo, et al. (2001). "Regulatable and cell-type specific transgene expression in glial cells: prospects for gene therapy for neurological disorders." Prog Brain Res 132: 655-81.
Cearley, C. N., L. H. Vandenberghe, et al. (2008). "Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain." Mol Ther 16(10): 1710-8.
Cearley, C. N. and J. H. Wolfe (2006). "Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain." Mol Ther 13(3): 528-37.
Chaudhry, F. A., K. P. Lehre, et al. (1995). "Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry." Neuron 15(3): 711-720.
Chen, J., T. Bezdek, et al. (1998). "A glial-specific, repressible, adenovirus vector for brain tumor gene therapy." Cancer Res 58(16): 3504-7.
Chen, W., V. Mahadomrongkul, et al. (2004). "The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons." J Neurosci 24(5): 1136-48.
Cholet, N., L. Pellerin, et al. (2001). "Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation." J Cereb Blood Flow Metab 21(4): 404-12.
Chowdhury, S., K. A. Chester, et al. (2004). "Efficient retroviral vector targeting of carcinoembryonic antigen-positive tumors." Mol Ther 9(1): 85-92.
Chvatal, A., M. Anderova, et al. (2007). "Three-dimensional confocal morphometry reveals structural changes in astrocyte morphology in situ." J Neurosci Res 85(2): 260-71.
Coffin, J. M. (1996). "HIV viral dynamics." Aids 10 Suppl 3: S75-84.
Coggeshall, R. E. (1992). "A consideration of neural counting methods." Trends Neurosci 15(1): 9-13.
Cogoni, C. and G. Macino (2000). "Post-transcriptional gene silencing across kingdoms." Curr Opin Genet Dev 10(6): 638-43.
Coil, D. A. and A. D. Miller (2004). "Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus." J Virol 78(20): 10920-6.
Colleoni, S., A. A. Jensen, et al. (2008). "Neuroprotective effects of the novel glutamate transporter inhibitor (-)-3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]-isoxazole-4-carboxyli c acid, which preferentially inhibits reverse transport (glutamate release) compared with glutamate reuptake." J Pharmacol Exp Ther 326(2): 646-56.
Colodner, K. J., R. A. Montana, et al. (2005). "Proliferative potential of human astrocytes." J Neuropathol Exp Neurol 64(2): 163-9.

Conaco, C., S. Otto, et al. (2006). "Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity." Proc Natl Acad Sci U S A 103(7): 2422-7.
Consiglio, A., A. Quattrini, et al. (2001). "In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice." Nat Med 7(3): 310-6.
Cucchiarini, M., X. L. Ren, et al. (2003). "Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors." Gene Ther 10(8): 657-67.
D'Ambrosio, R., J. Wenzel, et al. (1998). "Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes." J Neurosci 18(12): 4425-38.
Da Poian, A. T., F. A. Carneiro, et al. (2005). "Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins?" Braz J Med Biol Res 38(6): 813-23.
Daikhin, Y. and M. Yudkoff (2000). "Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia." Journal of Nutrition 130(4): 1026S-1031S.
Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol 65(1): 1-105.
Danbolt, N. C., J. Storm-Mathisen, et al. (1992). "An [Na+ + K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes." Neuroscience 51(2): 295-310.
Darnell, D. K., S. Kaur, et al. (2006). "MicroRNA expression during chick embryo development." Dev Dyn 235(11): 3156-65.
Davidson, B. L. and X. O. Breakefield (2003). "Viral vectors for gene delivery to the nervous system." Nat Rev Neurosci 4(5): 353-64.
Davis, K. E., D. J. Straff, et al. (1998). "Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma." J Neurosci 18(7): 2475-85.
de Almeida, L. P., D. Zala, et al. (2001). "Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease." Neurobiol Dis 8(3): 433-46.
de Almeida, P. L., D. Zala, et al. (2001). "Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease." Neurobiol Dis 8(3): 433-46.
de Leeuw, B., M. Su, et al. (2006). "Increased glia-specific transgene expression with glial fibrillary acidic protein promoters containing multiple enhancer elements." J Neurosci Res 83(5): 744-53.
Deglon, N. and P. Aebischer (2002). "Lentiviruses as vectors for CNS diseases." Curr Top Microbiol Immunol 261: 191-209.
Deglon, N., J. L. Tseng, et al. (2000). "Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease." Hum Gene Ther 11(1): 179-90.
Deloulme, J. C., E. Raponi, et al. (2004). "Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation." Mol Cell Neurosci 27(4): 453-65.
Denis-Donini, S., J. Glowinski, et al. (1984). "Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones." Nature 307(5952): 641-3.
Deo, M., J. Y. Yu, et al. (2006). "Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides." Dev Dyn 235(9): 2538-48.
Derouiche, A. and T. Rauen (1995). "Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance." J Neurosci Res 42(1): 131-43.
Desmaris, N., A. Bosch, et al. (2001). "Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins." Mol Ther 4(2): 149-56.
Do Thi, N. A., P. Saillour, et al. (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(9): 746-56.
Doble, A. (1999). "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy." Pharmacol Ther 81(3): 163-221.
Doench, J. G., C. P. Petersen, et al. (2003). "siRNAs can function as miRNAs." Genes Dev 17(4): 438-42.

Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev 18(5): 504-11.
Dugan, L. L., V. M. Bruno, et al. (1995). "Glia modulate the response of murine cortical neurons to excitotoxicity: glia exacerbate AMPA neurotoxicity." J Neurosci 15(6): 4545-55.
Duisit, G., H. Conrath, et al. (2002). "Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat." Mol Ther 6(4): 446-54.
Dunlop, J., H. Beal McIlvain, et al. (2003). "Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis." J Neurosci 23(5): 1688-96.
Emerich, D. F. and C. G. Thanos (2006). "Intracompartmental delivery of CNTF as therapy for Huntington's disease and retinitis pigmentosa." Curr Gene Ther 6(1): 147-59.
Emery, D. W., E. Yannaki, et al. (2000). "A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects." Proc Natl Acad Sci U S A 97(16): 9150-5.
Emsley, J. G. and J. D. Macklis (2006). "Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS." Neuron Glia Biol 2(3): 175-186.
Escarpe, P., N. Zayek, et al. (2003). "Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations." Mol Ther 8(2): 332-41.
Escartin, C., E. Brouillet, et al. (2006). "Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo." J Neurosci 26(22): 5978-89.
Estrada Sanchez, A. M., J. Mejia-Toiber, et al. (2008). "Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease." Arch Med Res 39(3): 265-76.
Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing." Mol Cell Biol 27(11): 3970-81.
Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." Cell 132(1): 9-14.
Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay." Nat Struct Mol Biol 15(4): 346-53.
Eulalio, A., J. Rehwinkel, et al. (2007). "Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing." Genes Dev 21(20): 2558-70.
Fagg, G. E. and A. C. Foster (1983). "Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system." Neuroscience 9(4): 701-19.
Farh, K. K., A. Grimson, et al. (2005). "The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution." Science 310(5755): 1817-21.
Fassati, A. and S. P. Goff (2001). "Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1." J Virol 75(8): 3626-35.
Fazi, F., A. Rosa, et al. (2005). "A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis." Cell 123(5): 819-31.
Feng, X., F. F. Eide, et al. (2004). "Adeno-associated viral vector-mediated ApoE expression in Alzheimer's disease mice: low CNS immune response, long-term expression, and astrocyte specificity." Front Biosci 9: 1540-6.
Figiel, M., C. Allritz, et al. (2007). "Gap junctional control of glial glutamate transporter expression." Mol Cell Neurosci 35(1): 130-7.
Figiel, M. and J. Engele (2000). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron- derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism." 20(10): 3596-3605.
Figiel, M., T. Maucher, et al. (2003). "Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors." Exp Neurol 183(1): 124-35.
Franco-Zorrilla, J. M., A. Valli, et al. (2007). "Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity." Nat Genet 39(8): 1033-7.
Fukamachi, S., A. Furuta, et al. (2001). "Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia." Brain Res Dev Brain Res 132(2): 131-9.

Furness, D. N., Y. Dehnes, et al. (2008). "A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: New insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2)." Neuroscience.

Furuta, A., J. D. Rothstein, et al. (1997). "Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development." J Neurosci 17(21): 8363-75.

Ganat, Y. M., J. Silbereis, et al. (2006). "Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo." J Neurosci 26(33): 8609-21.

Ganel, R., T. Ho, et al. (2006). "Selective up-regulation of the glial Na+-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection." Neurobiol Dis 21(3): 556-67.

Gegelashvili, G., G. Civenni, et al. (1996). "Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes." Neuroreport 8(1): 261-5.

Gegelashvili, G., N. C. Danbolt, et al. (1997). "Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia." J Neurochem 69(6): 2612-5.

Genoud, C., G. W. Knott, et al. (2004). "Altered synapse formation in the adult somatosensory cortex of brain-derived neurotrophic factor heterozygote mice." J Neurosci 24(10): 2394-400.

Genoud, C., C. Quairiaux, et al. (2006). "Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex." PLoS Biol 4(11): e343.

Gensert, J. M. and J. E. Goldman (2001). "Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter." J Neurobiol 48(2): 75-86.

Giaume, C. and K. D. McCarthy (1996). "Control of gap-junctional communication in astrocytic networks." Trends Neurosci 19(8): 319-25.

Giraldez, A. J., Y. Mishima, et al. (2006). "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs." Science 312(5770): 75-9.

Goff, S. P. (2007). "Host factors exploited by retroviruses." Nat Rev Microbiol 5(4): 253-63.

Goldschmidt, V. and R. Marquet (2004). "Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs)." Int J Biochem Cell Biol 36(9): 1687-705.

Gonzalez, M. I., P. G. Bannerman, et al. (2003). "Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase Calpha and the neuronal glutamate transporter EAAC1." J Neurosci 23(13): 5589-93.

Gonzalez, M. I., M. G. Kazanietz, et al. (2002). "Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes." Mol Pharmacol 62(4): 901-10.

Gotz, M. and D. Steindler (2003). "To be glial or not-how glial are the precursors of neurons in development and adulthood?" Glia 43(1): 1-3.

Greenberg, K. P., S. F. Geller, et al. (2007). "Targeted transgene expression in muller glia of normal and diseased retinas using lentiviral vectors." Invest Ophthalmol Vis Sci 48(4): 1844-52.

Greene, J. G. and J. T. Greenamyre (1995). "Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate." J Neurochem 64(1): 430-6.

Greene, J. G. and J. T. Greenamyre (1996). "Bioenergetics and glutamate excitotoxicity." Prog Neurobiol 48(6): 613-34.

Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, et al. (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." Nucleic Acids Res 34(Database issue): D140-4.

Grimson, A., K. K. Farh, et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." Mol Cell 27(1): 91-105.

Grishok, A., A. E. Pasquinelli, et al. (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing." Cell 106(1): 23-34.

Gruh, I., S. Wunderlich, et al. (2008). "Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors." J Gene Med 10(1): 21-32.

Gu, X., V. M. Andre, et al. (2007). "Pathological cell-cell interactions are necessary for striatal pathogenesis in a conditional mouse model of Huntington's disease." Mol Neurodegener 2: 8.

Gu, X., C. Li, et al. (2005). "Pathological cell-cell interactions elicited by a neuropathogenic form of mutant Huntingtin contribute to cortical pathogenesis in HD mice." Neuron 46(3): 433-44.

Guillet, B. A., L. J. Velly, et al. (2005). "Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures." Neurochem Int 46(4): 337-46.

Guiramand, J., A. Martin, et al. (2005). "Gliotoxicity in hippocampal cultures is induced by transportable, but not by nontransportable, glutamate uptake inhibitors." J Neurosci Res 81(2): 199-207.

Guo, H., L. Lai, et al. (2003). "Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice." Hum Mol Genet 12(19): 2519-32.

Had-Aissouni, L., D. B. Re, et al. (2002). "Importance of astrocytic inactivation of synaptically released glutamate for cell survival in the central nervous system--are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations?" J Physiol Paris 96(3-4): 317-22.

Halassa, M. M., T. Fellin, et al. (2007). "Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte." J Neurosci 27(24): 6473-7.

Haley, B. and P. D. Zamore (2004). "Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex." Nat Struct Mol Biol 11(7): 599-606.

Hamann, M., D. J. Rossi, et al. (2002). "Knocking out the glial glutamate transporter GLT-1 reduces glutamate uptake but does not affect hippocampal glutamate dynamics in early simulated ischaemia." Eur J Neurosci 15(2): 308-14.

Harrop, J. S., D. J. Poulsen, et al. (2004). "Effect of altering titer, serotype, and promoter in recombinant adenoassociate virus gene therapy expression of spinal cord neurons and astrocytes." Spine 29(24): 2787-92.

Hassel, B., S. Tessler, et al. (2008). "Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease." Neurochem Res 33(2): 232-7.

Hatziioannou, T., S. Cowan, et al. (2004). "Capsid-dependent and -independent postentry restriction of primate lentivirus tropism in rodent cells." J Virol 78(2): 1006-11.

Hatziioannou, T., S. Cowan, et al. (2004). "Species-specific tropism determinants in the human immunodeficiency virus type 1 capsid." J Virol 78(11): 6005-12.

Hatziioannou, T., D. Perez-Caballero, et al. (2004). "Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha." Proc Natl Acad Sci U S A 101(29): 10774-9.

Haugeto, O., K. Ullensvang, et al. (1996). "Brain glutamate transporter proteins form homomultimers." J Biol Chem 271(44): 27715-22.

Heath, P. R. and P. J. Shaw (2002). "Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis." Muscle Nerve 26(4): 438-58.

Herard, A. S., A. Dubois, et al. (2005). "Decreased metabolic response to visual stimulation in the superior colliculus of mice lacking the glial glutamate transporter GLT-1." Eur J Neurosci 22(7): 1807-11.

Herman, M. A. and C. E. Jahr (2007). "Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice." J Neurosci 27(36): 9736-41.

Hirko, A., F. Tang, et al. (2003). "Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery." Curr Med Chem 10(14): 1185-93.

Hirrlinger, J., S. Hulsmann, et al. (2004). "Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ." Eur J Neurosci 20(8): 2235-9.

Hoggan, M. D., N. R. Blacklow, et al. (1966). "Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A 55(6): 1467-74.

Hong, S., D. Y. Hwang, et al. (2007). "Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells." Mol Ther 15(9): 1630-9.

Hottinger, A. F., M. Azzouz, et al. (2000). "Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus." J Neurosci 20(15): 5587-93.

Howland, D. S., J. Liu, et al. (2002). "Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." Proc Natl Acad Sci U S A 99(3): 1604-9.

Hu, Y. and G. S. Wilson (1997). "A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor." J Neurochem 69(4): 1484-90.
Huang, B. and S. Kochanek (2005). "Adenovirus-mediated silencing of huntingtin expression by shRNA." Hum Gene Ther 16(5): 618-26.
Huang, Y. H. and D. E. Bergles (2004). "Glutamate transporters bring competition to the synapse." Curr Opin Neurobiol 14(3): 346-52.
Huang, Y. H., S. R. Sinha, et al. (2004). "Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons." J Neurosci 24(19): 4551-9.
Hughes, E. G., J. L. Maguire, et al. (2004). "Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking." Brain Res Mol Brain Res 124(2): 114-23.
Humbert, S. and F. Saudou (2001). Neuronal death in Huntington's disease: multiple pathways for one issue? Neuronal death by accident or by design. H. G. M. Christen. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
Hutvagner, G., J. McLachlan, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science 293(5531): 834-8.
Itoh, Y., T. Esaki, et al. (2003). "Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 100(8): 4879-84.
Iyer, M., L. Wu, et al. (2001). "Two-step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters." Proc Natl Acad Sci U S A 98(25): 14595-600.
Jackson, M., W. Song, et al. (2001). "Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins." Nature 410(6824): 89-93.
Jacquard, C., Y. Trioulier, et al. (2006). "Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca2+] rise and neurodegeneration but not Ca2+ entry during NMDA receptor activation." Faseb J 20(7): 1021-3.
Jakobsson, J., C. Ericson, et al. (2003). "Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors." J Neurosci Res 73(6): 876-85.
Jakobsson, J., B. Georgievska, et al. (2004). "Lesion-dependent regulation of transgene expression in the rat brain using a human glial fibrillary acidic protein-lentiviral vector." Eur J Neurosci 19(3): 761-5.
Jakobsson, J. and C. Lundberg (2006). "Lentiviral vectors for use in the central nervous system." Mol Ther 13(3): 484-93.
Jakobsson, J., T. T. Nielsen, et al. (2006). "Efficient transduction of neurons using Ross River glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors." Gene Ther 13(12): 966-73.
Jakymiw, A., K. M. Pauley, et al. (2007). "The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing." J Cell Sci 120(Pt 8): 1317-23.
Janson, C. G., S. W. McPhee, et al. (2001). "Viral-based gene transfer to the mammalian CNS for functional genomic studies." Trends Neurosci 24(12): 706-12.
Joo, K. I. and P. Wang (2008). "Visualization of targeted transduction by engineered lentiviral vectors." Gene Ther 15(20): 1384-96.
Kacem, K., P. Lacombe, et al. (1998). "Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study." Glia 23(1): 1-10.
Kahl, C. A., P. M. Cannon, et al. (2008). "Tissue-specific restriction of cyclophilin A-independent HIV-1- and SIV-derived lentiviral vectors." Gene Ther 15(15): 1079-89.
Kajiwara, K., A. P. Byrnes, et al. (1997). "Immune responses to adenoviral vectors during gene transfer in the brain." Hum Gene Ther 8(3): 253-65.
Kajiwara, K., A. P. Byrnes, et al. (2000). "Humoral immune responses to adenovirus vectors in the brain." J Neuroimmunol 103(1): 8-15.

Kalandadze, A., Y. Wu, et al. (2004). "Identification of motifs involved in endoplasmic reticulum retention-forward trafficking of the GLT-1 subtype of glutamate transporter." J Neurosci 24(22): 5183-92.

Kalandadze, A., Y. Wu, et al. (2002). "Protein Kinase C Activation Decreases Cell Surface Expression of the GLT-1 Subtype of Glutamate Transporter. REQUIREMENT OF A CARBOXYL-TERMINAL DOMAIN AND PARTIAL DEPENDENCE ON SERINE 486." J Biol Chem 277(48): 45741-50.

Kaneko, R. and N. Sueoka (1993). "Tissue-specific versus cell type-specific expression of the glial fibrillary acidic protein." Proc Natl Acad Sci U S A 90(10): 4698-702.

Kang, Y., C. S. Stein, et al. (2002). "In vivo gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins." J Virol 76(18): 9378-88.

Karginov, F. V., C. Conaco, et al. (2007). "A biochemical approach to identifying microRNA targets." Proc Natl Acad Sci U S A 104(49): 19291-6.

Kasischke, K. A., H. D. Vishwasrao, et al. (2004). "Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis." Science 305(5680): 99-103.

Kasparov, S., A. G. Teschemacher, et al. (2004). "Viral vectors as tools for studies of central cardiovascular control." Prog Biophys Mol Biol 84(2-3): 251-77.

Katagiri, H., K. Tanaka, et al. (2001). "Requirement of appropriate glutamate concentrations in the synaptic cleft for hippocampal LTP induction." Eur J Neurosci 14(3): 547-53.

Kato, S., K. Inoue, et al. (2007). "Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains using a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein." Hum Gene Ther 18(11): 1141-51.

Katsumori, H., R. A. Baldwin, et al. (1999). "Reverse transport of glutamate during depolarization in immature hippocampal slices." Brain Res 819(1-2): 160-4.

Kay, M. A., J. C. Glorioso, et al. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med 7(1): 33-40.

Kedde, M., M. J. Strasser, et al. (2007). "RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA." Cell 131(7): 1273-86.

Kerkerian, L., N. Dusticier, et al. (1987). "Modulatory effect of dopamine on high-affinity glutamate uptake in the rat striatum." J Neurochem 48(4): 1301-6.

Ketting, R. F., S. E. Fischer, et al. (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans." Genes Dev 15(20): 2654-9.

Kim, D. and J. Rossi (2008). "RNAi mechanisms and applications." Biotechniques 44(5): 613-6.

Kim, E. J., Y. G. Park, et al. (2005). "Dehydroascorbic acid prevents oxidative cell death through a glutathione pathway in primary astrocytes." J Neurosci Res 79(5): 670-9.

Kim, S. Y., S. Y. Choi, et al. (2003). "Transcriptional regulation of human excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1): cloning of the EAAT1 promoter and characterization of its basal and inducible activity in human astrocytes." J Neurochem 87(6): 1485-98.

Kim, V. N. (2005). "Small RNAs: classification, biogenesis, and function." Mol Cells 19(1): 1-15.

Kitagawa, R., S. Miyachi, et al. (2007). "Differential characteristics of HIV-based versus SIV-based lentiviral vector systems: Gene delivery to neurons and axonal transport of expressed gene." Neurosci Res 57(4): 550-8.

Klein, M. E., S. Impey, et al. (2005). "Role reversal: the regulation of neuronal gene expression by microRNAs." Curr Opin Neurobiol 15(5): 507-13.

Klein, R. L., R. D. Dayton, et al. (2008). "AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method." Mol Ther 16(1): 89-96.

Klein, R. L., E. M. Meyer, et al. (1998). "Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors." Exp Neurol 150(2): 183-94.

Kloosterman, W. P. and R. H. Plasterk (2006). "The diverse functions of microRNAs in animal development and disease." Dev Cell 11(4): 441-50.

Knott, A. B., G. Perkins, et al. (2008). "Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration." Nat Rev Neurosci 9(7): 505-18.

Koeberle, P. D. and M. Bahr (2008). "The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS." Cell Death Differ 15(3): 471-83.

Kofler, P., B. Wiesenhofer, et al. (1998). "Liposome-mediated gene transfer into established CNS cell lines, primary glial cells, and in vivo." Cell Transplant 7(2): 175-85.
Kordower, J. H., J. Bloch, et al. (1999). "Lentiviral gene transfer to the nonhuman primate brain." Exp Neurol 160(1): 1-16.
Kosik, K. S. and A. M. Krichevsky (2005). "The Elegance of the MicroRNAs: A Neuronal Perspective." Neuron 47(6): 779-82.
Kostic, C., F. Chiodini, et al. (2003). "Activity analysis of housekeeping promoters using self-inactivating lentiviral vector delivery into the mouse retina." Gene Ther 10(9): 818-21.
Kratovac, Z., C. A. Virgen, et al. (2008). "Primate lentivirus capsid sensitivity to TRIM5 proteins." J Virol 82(13): 6772-7.
Krek, A., D. Grun, et al. (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." Nat Genet 37(5): 495-500.
Krichevsky, A. M., K. S. King, et al. (2003). "A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development." Rna 9(10): 1274-81.
Krichevsky, A. M., K. C. Sonntag, et al. (2006). "Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis." Stem Cells 24(4): 857-64.
Kugler, S., L. Meyn, et al. (2001). "Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors." Mol Cell Neurosci 17(1): 78-96.
Kuroda, H., R. H. Kutner, et al. (2008). "A comparative analysis of constitutive and cell-specific promoters in the adult mouse hippocampus using lentivirus vector-mediated gene transfer." J Gene Med.
Kuwert, T., H. W. Lange, et al. (1990). "Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease." Brain 113 (Pt 5): 1405-23.
Labrador, M. and V. G. Corces (2002). "Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization." Cell 111(2): 151-4.
Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science 294(5543): 853-8.
Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol 12(9): 735-9.
Lai, Z. and R. O. Brady (2002). "Gene transfer into the central nervous system in vivo using a recombinanat lentivirus vector." J Neurosci Res 67(3): 363-71.
Lai, Z., I. Han, et al. (2002). "Design of an HIV-1 lentiviral-based gene-trap vector to detect developmentally regulated genes in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(6): 3651-6.
Landgraf, P., M. Rusu, et al. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." Cell 129(7): 1401-14.
Lau, N. C., L. P. Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans." Science 294(5543): 858-62.
Lauriat, T. L., E. Richler, et al. (2007). "A quantitative regional expression profile of EAAT2 known and novel splice variants reopens the question of aberrant EAAT2 splicing in disease." Neurochem Int 50(1): 271-80.
Le Gal La Salle, G., J. J. Robert, et al. (1993). "An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain." Science 259(5097): 988-90.
Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans." Science 294(5543): 862-4.
Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." Cell 75(5): 843-54.
Lee, S. G., Z. Z. Su, et al. (2008). "Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes." J Biol Chem 283(19): 13116-23.
Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo J 23(20): 4051-60.
Lee, Y., A. Messing, et al. (2008). "GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression." Glia 56(5): 481-93.

Lehre, K. P. and N. C. Danbolt (1998). "The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain." J Neurosci 18(21): 8751-7.
Lehre, K. P., S. Davanger, et al. (1997). "Localization of the glutamate transporter protein glast in rat retina." Brain Res 744(1): 129-137.
Lehre, K. P., L. M. Levy, et al. (1995). "Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations." J Neurosci 15(3): 1835-1853.
Lentz, T. L., R. J. Benson, et al. (1986). "Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor." Brain Res 387(3): 211-9.
Levy, L. M., K. P. Lehre, et al. (1993). "A monoclonal antibody raised against an [Na(+)+K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization." FEBS Lett 317(1-2): 79-84.
Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell 120(1): 15-20.
Li, H., T. Wyman, et al. (2003). "Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release." Hum Mol Genet 12(16): 2021-30.
Li, Y., Y. Yang, et al. (2005). "Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neurone-specific promoter." Exp Physiol 90(1): 39-44.
Liehl, B., J. Hlavaty, et al. (2007). "Simian immunodeficiency virus vector pseudotypes differ in transduction efficiency and target cell specificity in brain." Gene Ther 14(18): 1330-43.
Lievens, J. C., B. Woodman, et al. (2001). "Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice." Neurobiol Dis 8(5): 807-21.
Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature 433(7027): 769-73.
Lipski, J., C. K. Wan, et al. (2007). "Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke." Neuroscience 146(2): 617-29.
Liu, B., J. F. Paton, et al. (2008). "Viral vectors based on bidirectional cell-specific mammalian promoters and transcriptional amplification strategy for use in vitro and in vivo." BMC Biotechnol 8: 49.
Liu, B., S. Wang, et al. (2008). "Enhancement of cell-specific transgene expression from a Tet-Off regulatory system using a transcriptional amplification strategy in the rat brain." J Gene Med 10(5): 583-92.
Liu, B. H., X. Wang, et al. (2004). "CMV enhancer/human PDGF-beta promoter for neuron-specific transgene expression." Gene Ther 11(1): 52-60.
Liu, B. H., Y. Yang, et al. (2006). "GAL4-NF-kappaB fusion protein augments transgene expression from neuronal promoters in the rat brain." Mol Ther 14(6): 872-82.
Liu, J. (2008). "Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs." Curr Opin Cell Biol 20(2): 214-21.
Liu, J. W., G. Pernod, et al. (2006). "Promoter dependence of transgene expression by lentivirus-transduced human blood-derived endothelial progenitor cells." Stem Cells 24(1): 199-208.
Livet, J., T. A. Weissman, et al. (2007). "Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system." Nature 450(7166): 56-62.
Loaiza, A., O. H. Porras, et al. (2003). "Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy." J Neurosci 23(19): 7337-42.
Lobsiger, C. S. and D. W. Cleveland (2007). "Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease." Nat Neurosci 10(11): 1355-60.
Logan, A. C., S. J. Nightingale, et al. (2004). "Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors." Hum Gene Ther 15(10): 976-88.
Longuemare, M. C. and R. A. Swanson (1995). "Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake." J Neurosci Res 40(3): 379-86.
Magistretti, P. J., L. Pellerin, et al. (1999). "Energy on demand." Science 283(5401): 496-7.
Makeyev, E. V., J. Zhang, et al. (2007). "The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing." Mol Cell 27(3): 435-48.
Mammette (2002). Virologie Médicale: Presse Universitaire de Lyon.

Mangia, S., G. Garreffa, et al. (2003). "The aerobic brain: lactate decrease at the onset of neural activity." Neuroscience 118(1): 7-10.
Mansfield, J. H., B. D. Harfe, et al. (2004). "MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression." Nat Genet 36(10): 1079-83.
Maragakis, N. J., J. Dietrich, et al. (2004). "Glutamate transporter expression and function in human glial progenitors." Glia 45(2): 133-43.
Maragakis, N. J. and J. D. Rothstein (2004). "Glutamate transporters: animal models to neurologic disease." Neurobiol Dis 15(3): 461-73.
Marcaggi, P. and D. Attwell (2004). "Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics." Glia 47(3): 217-25.
Marie, H., D. Billups, et al. (2002). "The amino terminus of the glial glutamate transporter GLT-1 interacts with the LIM protein Ajuba." Mol Cell Neurosci 19(2): 152-64.
Maroney, P. A., Y. Yu, et al. (2006). "MicroRNAs, mRNAs, and translation." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 71: 531-5.
Massieu, L., P. Del Rio, et al. (2001). "Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates." Neuroscience 106(4): 669-77.
Massieu, L., N. Gomez-Roman, et al. (2000). "In vivo potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate." Exp Neurol 165(2): 257-67.
Maurice, M., E. Verhoeyen, et al. (2002). "Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide." Blood 99(7): 2342-50.
Mazarakis, N. D., M. Azzouz, et al. (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(19): 2109-21.
McCown, T. J., X. Xiao, et al. (1996). "Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector." Brain Res 713(1-2): 99-107.
Meister, G. (2007). "miRNAs get an early start on translational silencing." Cell 131(1): 25-8.
Meunier, A., A. Mauborgne, et al. (2008). "Lentiviral-mediated targeted transgene expression in dorsal spinal cord glia: tool for the study of glial cell implication in mechanisms underlying chronic pain development." J Neurosci Methods 167(2): 148-59.
Miller, B. R., J. L. Dorner, et al. (2008). "Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse." Neuroscience 153(1): 329-37.
Mishima, T., Y. Mizuguchi, et al. (2007). "RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS." Brain Res 1131(1): 37-43.
Mishima, Y., A. J. Giraldez, et al. (2006). "Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430." Curr Biol 16(21): 2135-42.
Miska, E. A., E. Alvarez-Saavedra, et al. (2004). "Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain." Genome Biol 5(9): R68.
Mitani, A. and K. Tanaka (2003). "Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1." J Neurosci 23(18): 7176-82.
Mitani, K., F. L. Graham, et al. (1995). "Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector." Proc Natl Acad Sci U S A 92(9): 3854-8.
Mitrophanous, K., S. Yoon, et al. (1999). "Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector." Gene Ther 6(11): 1808-18.
Mittoux, V., S. Ouary, et al. (2002). "Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration." J Neurosci 22(11): 4478-86.
Miura, M., T. Tamura, et al. (1990). "Cell-specific expression of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: identification of the cis- and trans-acting promoter elements for astrocyte-specific expression." J Neurochem 55(4): 1180-8.

Mochizuki, H., J. P. Schwartz, et al. (1998). "High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells." J Virol 72(11): 8873-83.
Morelli, A. E., A. T. Larregina, et al. (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): 571-83.
Mori, T., K. Tanaka, et al. (2006). "Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis." Glia 54(1): 21-34.
Morizono, K., G. Bristol, et al. (2001). "Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens." J Virol 75(17): 8016-20.
Nagai, M., D. B. Re, et al. (2007). "Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons." Nat Neurosci 10(5): 615-22.
Nakagawa, T., Y. Otsubo, et al. (2008). "Mechanisms of substrate transport-induced clustering of a glial glutamate transporter GLT-1 in astroglial–neuronal cultures." Eur J Neurosci 28: 1719.
Nakajima, K., S. Yamamoto, et al. (2008). "Neuronal stimulation leading to upregulation of glutamate transporter-1 (GLT-1) in rat microglia in vitro." Neurosci Lett 436(3): 331-4.
Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "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(21): 11382-8.
Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science 272(5259): 263-7.
Nedergaard, M., T. Takano, et al. (2002). "Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter." Nat Rev Neurosci 3(9): 748-55.
Nelson, P. T., D. A. Baldwin, et al. (2006). "RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain." Rna 12(2): 187-91.
Nelson, P. T., W. X. Wang, et al. (2008). "MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases." Brain Pathol 18(1): 130-8.
Nettelbeck, D. M., V. Jerome, et al. (1998). "A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters." Gene Ther 5(12): 1656-64.
Nicniocaill, B., B. Haraldsson, et al. (2001). "Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice." Eur J Neurosci 13(1): 206-10.
Nieoullon, A., L. Kerkerian, et al. (1983). "Presynaptic dopaminergic control of high affinity glutamate uptake in the striatum." Neurosci Lett 43(2-3): 191-6.
Nightingale, S. J., R. P. Hollis, et al. (2006). "Transient gene expression by nonintegrating lentiviral vectors." Mol Ther 13(6): 1121-32.
Nilsen, T. W. (2007). "Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells." Trends Genet 23(5): 243-9.
Nisole, S. and A. Saib (2004). "Early steps of retrovirus replicative cycle." Retrovirology 1: 9.
Nolte, C., M. Matyash, et al. (2001). "GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue." Glia 33(1): 72-86.
Nottrott, S., M. J. Simard, et al. (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." Nat Struct Mol Biol 13(12): 1108-14.
Noureddini, S. C. and D. T. Curiel (2005). "Genetic targeting strategies for adenovirus." Mol Pharm 2(5): 341-7.
O'Shea, R. D., C. L. Lau, et al. (2006). "Effects of lipopolysaccharide on glial phenotype and activity of glutamate transporters: Evidence for delayed up-regulation and redistribution of GLT-1." Neurochem Int 48(6-7): 604-10.
Oberheim, N. A., G. F. Tian, et al. (2008). "Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain." J Neurosci 28(13): 3264-76.
Ogata, K. and T. Kosaka (2002). "Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus." Neuroscience 113(1): 221-33.
Oliet, S. H., R. Piet, et al. (2001). "Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons." Science 292(5518): 923-6.

Panov, A. V., C. A. Gutekunst, et al. (2002). "Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines." Nat Neurosci 5(8): 731-6.
Pardridge, W. M. (2002). "Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier." Arch Neurol 59(1): 35-40.
Pardridge, W. M. (2005). "Tyrosine hydroxylase replacement in experimental Parkinson's disease with transvascular gene therapy." NeuroRx 2(1): 129-38.
Pascual, O., K. B. Casper, et al. (2005). "Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks." Science 310(5745): 113-6.
Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature 408(6808): 86-9.
Paterna, J. C., J. Feldon, et al. (2004). "Transduction profiles of recombinant adeno-associated virus vectors derived from serotypes 2 and 5 in the nigrostriatal system of rats." J Virol 78(13): 6808-17.
Peel, A. L. and R. L. Klein (2000). "Adeno-associated virus vectors: activity and applications in the CNS." J Neurosci Methods 98(2): 95-104.
Peel, A. L., S. Zolotukhin, et al. (1997). "Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters." Gene Ther 4(1): 16-24.
Pellerin, L., A. K. Bouzier-Sore, et al. (2007). "Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update." Glia 55(12): 1251-62.
Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91(22): 10625-10629.
Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1997). "Glutamate uptake stimulates Na+,K+-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain." J Neurochem 69(5): 2132-7.
Pertusa, M., S. Garcia-Matas, et al. (2008). "Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats." Neurobiol Aging 29(9): 1366-79.
Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, et al. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Mol Cell 21(4): 533-42.
Petzold, G. C., D. F. Albeanu, et al. (2008). "Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways." Neuron 58(6): 897-910.
Pezet, S., A. Krzyzanowska, et al. (2006). "Reversal of neurochemical changes and pain-related behavior in a model of neuropathic pain using modified lentiviral vectors expressing GDNF." Mol Ther 13(6): 1101-9.
Philippe, S., C. Sarkis, et al. (2006). "Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 103(47): 17684-9.
Phillis, J. W., J. Ren, et al. (2000). "Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate." Brain Res 880(1-2): 224.
Pillai, R. S. (2005). "MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?" Rna 11(12): 1753-61.
Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al. (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" Trends Cell Biol 17(3): 118-26.
Pope, S., J. M. Land, et al. (2008). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target?" Biochim Biophys Acta 1777(7-8): 794-9.
Porras, O. H., A. Loaiza, et al. (2004). "Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons." J Neurosci 24(43): 9669-73.
Potashkin, J. A. and G. E. Meredith (2006). "The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease." Antioxid Redox Signal 8(1-2): 144-51.
Pow, D. V., T. Naidoo, et al. (2004). "Loss of glial glutamate transporters and induction of neuronal expression of GLT-1B in the hypoxic neonatal pig brain." Brain Res Dev Brain Res 153(1): 1-11.

Powers, W. J., T. O. Videen, et al. (2007). "Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum." Proc Natl Acad Sci U S A 104(8): 2945-9.
Quinonez, R. and R. E. Sutton (2002). "Lentiviral vectors for gene delivery into cells." DNA Cell Biol 21(12): 937-51.
Rae, C., M. L. Lawrance, et al. (2000). "Strategies for studies of neurotoxic mechanisms involving deficient transport of L-glutamate: antisense knockout in rat brain in vivo and changes in the neurotransmitter metabolism following inhibition of glutamate transport in guinea pig brain slices." Brain Res Bull 53(4): 373-81.
Rajewsky, N. (2006). "microRNA target predictions in animals." Nat Genet 38 Suppl: S8-13.
Ransom, B., T. Behar, et al. (2003). "New roles for astrocytes (stars at last)." Trends Neurosci 26(10): 520-2.
Raponi, E., F. Agenes, et al. (2007). "S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage." Glia 55(2): 165-77.
Rash, J. E., T. Yasumura, et al. (2001). "Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord." Cell Commun Adhes 8(4-6): 315-20.
Rash, J. E., T. Yasumura, et al. (2001). "Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons." J Neurosci 21(6): 1983-2000.
Rash, J. E., T. Yasumura, et al. (1998). "Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord." Proc Natl Acad Sci U S A 95(20): 11981-6.
Rauen, T. (2000). "Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina [In Process Citation]." 19(1): 53-62.
Re, D. B., J. Boucraut, et al. (2003). "Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents." J Neurochem 85(5): 1159-70.
Rebec, G. V., S. J. Barton, et al. (2002). "Dysregulation of ascorbate release in the striatum of behaving mice expressing the Huntington's disease gene." J Neurosci 22(2): RC202.
Rebec, G. V., S. J. Barton, et al. (2003). "Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice." Neuroreport 14(9): 1263-5.
Rebec, G. V., S. K. Conroy, et al. (2006). "Hyperactive striatal neurons in symptomatic Huntington R6/2 mice: variations with behavioral state and repeated ascorbate treatment." Neuroscience 137(1): 327-36.
Regan, M. R., Y. H. Huang, et al. (2007). "Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS." J Neurosci 27(25): 6607-19.
Regulier, E., D. Zala, et al. (2004). "Lentiviral-mediated gene transfer to model triplet repeat disorders." Methods Mol Biol 277: 199-213.
Reye, P., R. Sullivan, et al. (2002). "Distribution of two splice variants of the glutamate transporter GLT1 in the retinas of humans, monkeys, rabbits, rats, cats, and chickens." J Comp Neurol 445(1): 1-12.
Robinson, M. B. (2002). "Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies." J Neurochem 80(1): 1-11.
Robinson, M. B., S. Djali, et al. (1993). "Inhibition of glutamate uptake with L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate potentiates glutamate toxicity in primary hippocampal cultures." J Neurochem 61(6): 2099-103.
Roemer, K., P. A. Johnson, et al. (1995). "Transduction of foreign regulatory sequences by a replication-defective herpes simplex virus type 1: the rat neuron-specific enolase promoter." Virus Res 35(1): 81-9.
Rolls, M. M., P. Webster, et al. (1994). "Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA." Cell 79(3): 497-506.
Ross, C. A. and L. M. Thompson (2006). "Transcription meets metabolism in neurodegeneration." Nat Med 12(11): 1239-41.

Rossi, D. J., T. Oshima, et al. (2000). "Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake." Nature 403(6767): 316-21.
Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, et al. (1996). "Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate." Neuron 16(3): 675-86.
Rothstein, J. D., L. Martin, et al. (1994). "Localization of neuronal and glial glutamate transporters." Neuron 13(3): 713-25.
Rothstein, J. D., S. Patel, et al. (2005). "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression." Nature 433(7021): 73-7.
Rothstein, J. D., M. Van Kammen, et al. (1995). "Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol 38(1): 73-84.
Rouach, N. and C. Giaume (2001). "Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction." Prog Brain Res 132: 203-14.
Roze, E., F. Saudou, et al. (2008). "Pathophysiology of Huntington's disease: from huntingtin functions to potential treatments." Curr Opin Neurol 21(4): 497-503.
Sarkar, S. and N. J. Cowan (1991). "Regulation of expression of glial filament acidic protein." J Cell Sci Suppl 15: 97-102.
Sarkis, C., C. Serguera, et al. (2000). "Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector." Proc Natl Acad Sci U S A 97(26): 14638-43.
Sas, K., H. Robotka, et al. (2007). "Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders." J Neurol Sci 257(1-2): 221-39.
Sastry, L., T. Johnson, et al. (2002). "Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods." Gene Ther 9(17): 1155-62.
Sato, Y., Y. Shiraishi, et al. (2004). "Cell specificity and efficiency of the Semliki forest virus vector- and adenovirus vector-mediated gene expression in mouse cerebellum." J Neurosci Methods 137(1): 111-21.
Sattler, R. and M. Tymianski (2001). "Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death." Mol Neurobiol 24(1-3): 107-29.
Savchenko, V. L., J. A. McKanna, et al. (2000). "Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity." Neuroscience 96(1): 195-203.
Scherr, M., K. Battmer, et al. (2001). "Quantitative determination of lentiviral vector particle numbers by real-time PCR." Biotechniques 31(3): 520, 522, 524, passim.
Schinder, A. F., E. C. Olson, et al. (1996). "Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity." J Neurosci 16(19): 6125-33.
Schlag, B. D., J. R. Vondrasek, et al. (1998). "Regulation of the glial Na+-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons." Mol Pharmacol 53(3): 355-369.
Schlegel, R., T. S. Tralka, et al. (1983). "Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site?" Cell 32(2): 639-46.
Schmitt, A., E. Asan, et al. (2002). "A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system." Neuroscience 109(1): 45-61.
Schmitt, A., E. Asan, et al. (1996). "Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry." Neuroscience 71(4): 989-1004.
Schmitz, C., D. Marchant, et al. (2004). "Lv2, a novel postentry restriction, is mediated by both capsid and envelope." J Virol 78(4): 2006-16.
Scott, H. L., D. V. Pow, et al. (2002). "Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease." J Neurosci 22(3): RC206.
Selkirk, J. V., L. M. Nottebaum, et al. (2005). "Role of the GLT-1 subtype of glutamate transporter in glutamate homeostasis: the GLT-1-preferring inhibitor WAY-855 produces marginal neurotoxicity in the rat hippocampus." Eur J Neurosci 21(12): 3217-28.
Selkirk, J. V., T. H. Stiefel, et al. (2005). "Over-expression of the human EAAT2 glutamate transporter within neurons of mouse organotypic hippocampal slice cultures leads to increased vulnerability of CA1 pyramidal cells." Eur J Neurosci 21(8): 2291-6.

Sena-Esteves, M., J. C. Tebbets, et al. (2004). "Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes." J Virol Methods 122(2): 131-9.
Sharma, S., A. Miyanohara, et al. (2000). "Separable mechanisms of attachment and cell uptake during retrovirus infection." J Virol 74(22): 10790-5.
Sheldon, A. L., M. I. Gonzalez, et al. (2008). "Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1." Neurochem Int.
Sheldon, A. L., M. I. Gonzalez, et al. (2006). "A carboxyl-terminal determinant of the neuronal glutamate transporter, EAAC1, is required for platelet-derived growth factor-dependent trafficking." J Biol Chem 281(8): 4876-86.
Sheldon, A. L. and M. B. Robinson (2007). "The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention." Neurochem Int 51(6-7): 333-55.
Sherman, M. P. and W. C. Greene (2002). "Slipping through the door: HIV entry into the nucleus." Microbes Infect 4(1): 67-73.
Shibata, T., K. Yamada, et al. (1997). "Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord." J Neurosci 17(23): 9212-9.
Shigeri, Y., R. P. Seal, et al. (2004). "Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs." Brain Res Brain Res Rev 45(3): 250-65.
Shimada, F., Y. Shiga, et al. (1999). "The neuroprotective agent MS-153 stimulates glutamate uptake." Eur J Pharmacol 386(2-3): 263-70.
Shin, J. Y., Z. H. Fang, et al. (2005). "Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity." J Cell Biol 171(6): 1001-12.
Simard, M., G. Arcuino, et al. (2003). "Signaling at the gliovascular interface." J Neurosci 23(27): 9254-62.
Sitcheran, R., P. Gupta, et al. (2005). "Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression." Embo J 24(3): 510-20.
Slezak, M., C. Goritz, et al. (2007). "Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells." Glia 55(15): 1565-76.
Smirnova, L., A. Grafe, et al. (2005). "Regulation of miRNA expression during neural cell specification." Eur J Neurosci 21(6): 1469-77.
Smith-Arica, J. R., A. E. Morelli, et al. (2000). "Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression." Mol Ther 2(6): 579-87.
Smith, R. L., D. L. Traul, et al. (2000). "Characterization of promoter function and cell-type-specific expression from viral vectors in the nervous system." J Virol 74(23): 11254-61.
Sokoloff, L., M. Reivich, et al. (1977). "The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat." J. Neurochem. 28(5): 897-916.
Somjen, G. G. (1988). "Nervenkitt: notes on the history of the concept of neuroglia." Glia 1(1): 2-9.
Sonnewald, U., N. Westergaard, et al. (1993). "Metabolism of [U-13C]glutamate in astrocytes studied by 13C NMR spectroscopy: incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic acid cycle." J Neurochem 61(3): 1179-82.
Spacek, J. (1985). "Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses. A serial section study." Anat Embryol (Berl) 173(1): 129-35.
Standart, N. and R. J. Jackson (2007). "MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation." Genes Dev 21(16): 1975-82.
Steiner, J., H. G. Bernstein, et al. (2007). "Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain." BMC Neurosci 8: 2.
Stinski, M. F. and H. Isomura (2008). "Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency." Med Microbiol Immunol 197(2): 223-31.
Stout, A. K., H. M. Raphael, et al. (1998). "Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake." Nat Neurosci 1(5): 366-73.

Stremlau, M., M. Perron, et al. (2005). "Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction." J Virol 79(5): 3139-45.
Su, M., H. Hu, et al. (2004). "Expression specificity of GFAP transgenes." Neurochem Res 29(11): 2075-93.
Sullivan, S. M., A. Lee, et al. (2007). "Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP." J Biol Chem 282(40): 29414-23.
Sun, X., V. K. Yau, et al. (2005). "Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells." Virology 338(1): 53-60.
Sun, Y., A. Savanenin, et al. (2001). "Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95." J Biol Chem 276(27): 24713-8.
Swanson, R. A., J. Liu, et al. (1997). "Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes." J Neurosci 17(3): 932-40.
Takahashi, M., Y. Kovalchuk, et al. (1995). "Pre- and postsynaptic determinants of EPSC waveform at cerebellar climbing fiber and parallel fiber to Purkinje cell synapses." J Neurosci 15(8): 5693-702.
Takano, T., G. F. Tian, et al. (2006). "Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow." Nat Neurosci 9(2): 260-7.
Tanaka, K., K. Watase, et al. (1997). "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1." Science 276(5319): 1699-1702.
Tanaka, K., K. Watase, et al. (1997). "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1." Science 276(5319): 1699-702.
Tang, G. (2005). "siRNA and miRNA: an insight into RISCs." Trends Biochem Sci 30(2): 106-14.
Taymans, J. M., L. H. Vandenberghe, et al. (2007). "Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain." Hum Gene Ther 18(3): 195-206.
Theodosis, D. T., D. A. Poulain, et al. (2008). "Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions." Physiol Rev 88(3): 983-1008.
Thiagarajan, T. C., M. Lindskog, et al. (2007). "LTP and adaptation to inactivity: overlapping mechanisms and implications for metaplasticity." Neuropharmacology 52(1): 156-75.
Thomas, C. E., G. Schiedner, et al. (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(13): 7482-7.
Thorlin, T., R. S. Roginski, et al. (1998). "Regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 by glutamate and d-opioid receptor stimulation." FEBS Lett 425(3): 453-459.
Thoulouze, M. I., M. Lafage, et al. (1998). "The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus." J Virol 72(9): 7181-90.
Tian, G., L. Lai, et al. (2007). "Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression." J Biol Chem 282(3): 1727-37.
Tomari, Y., T. Du, et al. (2007). "Sorting of Drosophila small silencing RNAs." Cell 130(2): 299-308.
Torp, R., N. C. Danbolt, et al. (1994). "Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study." Eur J Neurosci 6(6): 936-942.
Tortarolo, M., A. J. Crossthwaite, et al. (2004). "Expression of SOD1 G93A or wild-type SOD1 in primary cultures of astrocytes down-regulates the glutamate transporter GLT-1: lack of involvement of oxidative stress." J Neurochem 88(2): 481-93.
Trotti, D., N. C. Danbolt, et al. (1998). "Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?" Trends Pharmacol Sci 19(8): 328-334.
Tsvetkov, E., R. M. Shin, et al. (2004). "Glutamate uptake determines pathway specificity of long-term potentiation in the neural circuitry of fear conditioning." Neuron 41(1): 139-51.
Tuffereau, C., J. Benejean, et al. (1998). "Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus." Embo J 17(24): 7250-9.
Turner, B. J. and K. Talbot (2008). "Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS." Prog Neurobiol 85(1): 94-134.

Turrigiano, G. (2007). "Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback." Curr Opin Neurobiol 17(3): 318-24.
Tzingounis, A. V. and J. I. Wadiche (2007). "Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission." Nat Rev Neurosci 8(12): 935-47.
Umemura, K., T. Gemba, et al. (1996). "Inhibitory effect of MS-153 on elevated brain glutamate level induced by rat middle cerebral artery occlusion." Stroke 27(9): 1624-8.
Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, et al. (2006). "Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs." Genes Dev 20(5): 515-24.
Visvanathan, J., S. Lee, et al. (2007). "The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development." Genes Dev 21(7): 744-9.
Vives, V., G. Alonso, et al. (2003). "Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice." J Comp Neurol 457(4): 404-19.
Volterra, A. and J. Meldolesi (2005). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." Nat Rev Neurosci 6(8): 626-40.
Voutsinos-Porche, B., G. Bonvento, et al. (2003). "Glial Glutamate Transporters Mediate a Functional Metabolic Crosstalk between Neurons and Astrocytes in the Mouse Developing Cortex." Neuron 37(2): 275-86.
Waagepetersen, H. S., U. Sonnewald, et al. (2001). "Multiple compartments with different metabolic characteristics are involved in biosynthesis of intracellular and released glutamine and citrate in astrocytes." Glia 35(3): 246-52.
Wadiche, J. I., J. L. Arriza, et al. (1995). "Kinetics of a human glutamate transporter." Neuron 14(5): 1019-27.
Waehler, R., S. J. Russell, et al. (2007). "Engineering targeted viral vectors for gene therapy." Nat Rev Genet 8(8): 573-87.
Walton, H. S. and P. R. Dodd (2007). "Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease." Neurochem Int 50(7-8): 1052-66.
Wang, C. Y. and S. Wang (2006). "Astrocytic expression of transgene in the rat brain mediated by baculovirus vectors containing an astrocyte-specific promoter." Gene Ther 13(20): 1447-56.
Wang, W. X., B. W. Rajeev, et al. (2008). "The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1." J Neurosci 28(5): 1213-23.
Wang, W. X., B. R. Wilfred, et al. (2008). "Focus on RNA isolation: Obtaining RNA for microRNA (miRNA) expression profiling analyses of neural tissue." Biochim Biophys Acta.
Wang, X., S. Tang, et al. (2008). "Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth." PLoS ONE 3(7): e2557.
Wang, Y., Y. Liang, et al. (2008). "MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases." Clin Genet 74(4): 307-15.
Watase, K., K. Hashimoto, et al. (1998). "Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice." Eur J Neurosci 10(3): 976-988.
Watson, D. J., G. P. Kobinger, et al. (2002). "Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins." Mol Ther 5(5 Pt 1): 528-37.
Weller, M. L., I. M. Stone, et al. (2008). "Selective overexpression of excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) in astrocytes enhances neuroprotection from moderate but not severe hypoxia-ischemia." Neuroscience 155(4): 1204-11.
Wightman, B., I. Ha, et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans." Cell 75(5): 855-62.
Wong, L. F., M. Azzouz, et al. (2004). "Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system." Mol Ther 9(1): 101-11.
Wong, L. F., L. Goodhead, et al. (2006). "Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications." Hum Gene Ther 17(1): 1-9.
Wood, M. J., A. P. Byrnes, et al. (1994). "Inflammatory effects of gene transfer into the CNS with defective HSV-1 vectors." Gene Ther 1(5): 283-91.
Wood, M. J., H. M. Charlton, et al. (1996). "Immune responses to adenovirus vectors in the nervous system." Trends Neurosci 19(11): 497-501.

Wu, L. and J. G. Belasco (2005). "Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells." Mol Cell Biol 25(21): 9198-208.
Wu, L. and J. G. Belasco (2008). "Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs." Mol Cell 29(1): 1-7.
Wu, L., J. Fan, et al. (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A 103(11): 4034-9.
Xia, H., Q. Mao, et al. (2002). "siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo." Nat Biotechnol 20(10): 1006-10.
Xiao, X., J. Li, et al. (1997). "Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system." Exp Neurol 144(1): 113-24.
Xu, R., C. G. Janson, et al. (2001). "Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes." Gene Ther. 8(17): 1323-32.
Yanez-Munoz, R. J., K. S. Balaggan, et al. (2006). "Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors." Nat Med 12(3): 348-53.
Yang, L., L. Bailey, et al. (2006). "Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 103(31): 11479-84.
Yee, J. K., T. Friedmann, et al. (1994). "Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range." Methods Cell Biol 43 Pt A: 99-112.
Yu, J. Y., K. H. Chung, et al. (2008). "MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation." Exp Cell Res 314(14): 2618-33.
Zagami, C. J., R. D. O'Shea, et al. (2005). "Regulation of glutamate transporters in astrocytes: evidence for a relationship between transporter expression and astrocytic phenotype." Neurotox Res 7(1-2): 143-9.
Zala, D., J. C. Bensadoun, et al. (2004). "Long-term lentiviral-mediated expression of ciliary neurotrophic factor in the striatum of Huntington's disease transgenic mice." Exp Neurol 185(1): 26-35.
Zelenaia, O., B. D. Schlag, et al. (2000). "Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB." Molecular Pharmacology 57(4): 667-678.
Zennou, V., C. Serguera, et al. (2001). "The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain." Nat Biotechnol 19(5): 446-50.
Zerlin, M., A. Milosevic, et al. (2004). "Glial progenitors of the neonatal subventricular zone differentiate asynchronously, leading to spatial dispersion of glial clones and to the persistence of immature glia in the adult mammalian CNS." Dev Biol 270(1): 200-13.
Zhang, S. C. (2001). "Defining glial cells during CNS development." Nat Rev Neurosci 2(11): 840-3.
Zhang, X. Y., V. F. La Russa, et al. (2002). "Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells." Mol Ther 5(5 Pt 1): 555-65.
Zhang, Y. and W. M. Pardridge (2005). "Delivery of beta-galactosidase to mouse brain via the blood-brain barrier transferrin receptor." J Pharmacol Exp Ther 313(3): 1075-81.
Zhang, Y., F. Schlachetzki, et al. (2003). "Organ-specific gene expression in the rhesus monkey eye following intravenous non-viral gene transfer." Mol Vis 9: 465-72.
Zhang, Y., F. Schlachetzki, et al. (2004). "Normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism with intravenous nonviral gene therapy and a brain-specific promoter." Hum Gene Ther 15(4): 339-50.
Zhao, H., A. Kalota, et al. (2008). "The c-myb Protooncogene and microRNA (miR)-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells." Blood.
Zheng, K., A. Scimemi, et al. (2008). "Receptor actions of synaptically released glutamate: the role of transporters on the scale from nanometers to microns." Biophys J.
Zhou, J. and M. L. Sutherland (2004). "Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity." J Neurosci 24(28): 6301-6.
Zonta, M., M. C. Angulo, et al. (2003). "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." Nat Neurosci 6(1): 43-50.
Zonta, M., A. Sebelin, et al. (2003). "Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes." J Physiol 553(Pt 2): 407-14.

Zschocke, J., N. Bayatti, et al. (2005). "Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions." J Biol Chem 280(41): 34924-32.

Zufferey, R., J. E. Donello, et al. (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol 73(4): 2886-92.

Zufferey, R., T. Dull, et al. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol 72(12): 9873-80.

ANNEXES

GLIA 00:000–000 (2008)

Engineered Lentiviral Vector Targeting Astrocytes *In Vivo*

ANGÉLIQUE COLIN,[1,2] MATHILDE FAIDEAU,[1,2] NOELLE DUFOUR,[1,2] GWENNAELLE AUREGAN,[1,2] RAYMONDE HASSIG,[1,2] THIBAULT ANDRIEU,[3] EMMANUEL BROUILLET,[1,2] PHILIPPE HANTRAYE,[1,2] GILLES BONVENTO,[1,2] AND NICOLE DÉGLON[1,2*]
[1]*CEA, Institute of Biomedical Imaging (I2BM) and Molecular Imaging Research Center (MIRCen), Orsay, France*
[2]*CNRS URA2210, Orsay, France*
[3]*CEA, Institute of Emerging diseases and Innovative Therapy (IMETI), Fontenay-aux-Roses, France*

KEY WORDS
gene transfer; microRNA; pseudotyping; Mokola; glutamate transporters

ABSTRACT
Astrocytes are involved in key physiological brain processes, such as glutamatergic transmission and energy metabolism, often altered in neurodegenerative diseases. Targeted gene expression in astrocytes is needed to assess the contribution of these cells to physiological processes and for the development of new therapeutic strategies. However, most of the viral vectors currently used for gene transfer in the central nervous system (CNS) are highly neurotropic. We used mokola pseudotyping to shift the tropism of lentiviral vectors toward astrocytes and a detargeting strategy with miRNA to eliminate residual expression in neuronal cells. In primary cultures, we showed that incorporating target sequences for the neuron-specific miR124 effectively abolished transgene expression in neurons post-transcriptionally. Targeted expression of the LacZ reporter gene in astrocytes was achieved in the hippocampus, striatum, and cerebellum of the adult mouse *in vivo*. As a proof-of-principle, this new lentiviral vector was used to either overexpress or downregulate (RNA interference) the glial glutamate transporter GLAST into striatal astrocytes *in vivo*. These vectors provide new opportunities for cell type-specific gene transfer in the CNS. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Neuron–glial cell interactions are now recognized to play a key role in controlling human brain development, function, and disease. Astrocytes regulate important physiological processes, such as ion and water homeostasis, synaptic transmission, energy metabolism, and blood flow (Haydon and Carmignoto, 2006; Slezak and Pfrieger, 2003; Takano et al., 2006; Volterra and Meldolesi, 2005; Voutsinos-Porche et al., 2003). Improvements in our understanding of these functions have shed light on the role of astrocytes in neurodegenerative diseases (Maragakis and Rothstein, 2006; Seifert et al., 2006). There is now strong evidence for noncell autonomous mechanisms in which neurodegeneration is strongly influenced by toxicity linked to the production of mutant proteins in both neurons and astrocytes (Lobsiger and Cleveland, 2007). The number of known diseases involving astrocyte defects is rapidly increasing, but it remains unclear whether glial changes are really the cause of the disease. Our understanding is based mostly on data obtained *in vitro*, due to the lack of experimental tools for the selective manipulation of these cells *in vivo*. Current approaches are based on transgenic mice and combine the glial fibrillary acid protein (GFAP) promoter with the Cre/loxP system (Brenner et al., 1994) to restrict expression of the transgene to GFAP-producing cells. Another recently developed strategy based on the tamoxifen (TAM)-inducible CreER^{T2}/loxP system can also be used for conditional transgene expression in astroglial cells (Hirrlinger et al., 2006; Mori et al., 2006; Slezak et al., 2007). However, it remains difficult and time-consuming to target specific cell subpopulations through transgenesis, and differences in recombination efficiency between transgenic lines complicate the analysis. The development of highly efficient viral vectors for gene transfer in the central nervous system (CNS) is providing new systems for localized and controlled gene expression (Jakobsson and Lundberg, 2006; Wong et al., 2006). Initial studies have shown that both adeno-associated vector type 2 and VSV-peudotyped lentiviral vector principally transduce neurons (Kaplitt et al., 1994; Naldini et al., 1996). However, recent studies have indicated that new AAV serotypes and lentiviral vectors pseudotyped with various envelopes infect both neurons and glial cells (Broekman et al., 2006; Burger et al., 2004; Cearley and Wolfe, 2006; Desmaris et al., 2001; Mazarakis et al., 2001; Paterna et al., 2004; Pertusa et al., 2008; Tenenbaum et al., 2004; Watson et al., 2002; Wong et al., 2004). Astroglial cell-specific promoters have been proposed as a means of further restricting transgene expression. However, this approach is currently limited by the low level of transcriptional activity, the difficulty of maintaining tissue-specific expression when genes are integrated into

Grant sponsors: CEA, CNRS, FP6-network of excellence Clinigene, FP7-collaborative project Neugene.

*Correspondence to: Nicole Déglon, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4, Place du Général Leclerc, 91401 Orsay, France. E-mail: nicole.deglon@cea.fr or Gilles Bonvento, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4, Place du Général Leclerc, 91401 Orsay, France. E-mail: gilles.bonvento@cea.fr

Received 19 May 2008; Accepted 22 September 2008

DOI 10.1002/glia.20795

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

©2008 Wiley-Liss, Inc.

viral vectors, and the small number of characterized promoters (Xu et al., 2001).

We used the recently described microRNA (miRNA) regulation pathway (Brown et al., 2006, 2007) to develop a mokola-pseudotyped lentiviral vector specifically targeting astroglial cells. miRNAs are small (21–23 nucleotides) noncoding RNAs that play a key role in various biological processes (Tsang et al., 2007). Mature miRNAs are found in cytoplasm, where they act as post-transcriptional regulators of gene expression. Although the precise mechanism of miRNA-mediated gene-silencing remains unclear, the binding to partially complementary sites on target mRNAs promote the degradation and/or inhibit the translation (Liu et al., 2005; Wu and Belasco, 2005; Yekta et al., 2004). The brain is enriched in several miRNAs, including miR124 (Deo et al., 2006; Lagos-Quintana et al., 2002). In humans and mice, miR124 is encoded by three different genes, which give rise to only one mature miR124a (Deo et al., 2006). miR124 is expressed in neurons and not in astrocytes (Smirnova et al., 2005). The insertion of a miR124 target sequence (miR124T) at the 3′ end of a transgene of interest will therefore lead to its post-transcriptional silencing in neurons and not in astrocytes because of the neuron-specific expression of the miR124.

In the present study, we provide evidence that combining mokola pseudotyping of lentiviral vectors and insertion of a miR124 target sequence lead to a restricted transgene expression in astrocytes in different brain regions of adult mice.

MATERIALS AND METHODS

Lentiviral Vectors

We used a self-inactivated (SIN-W-PGK) lentiviral vector (Déglon et al., 2000) containing the central polypurine tract (cPPT) sequence, the mouse phosphoglycerate kinase I promoter (PGK), and the woodchuck post-regulatory element (WPRE) sequence and encoding a nuclear β-galactosidase (SIN-cPPT-PGK-nls-LacZ-WPRE).

To clone the EAAT1 promoter (Kim et al., 2003), we performed a PCR on genomic DNA from human HeLa cells. The following primers were used: EAAT1-F, ATCGATATGTCTACACAAACTGAAATAATG; EAAT1-R, GGATCCAAGATATCAAGCAGTAACG; the PCR product was cloned in the PCR2.1-TOPO plasmid (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) to finally generate the SIN-cPPT-EAAT1-nls-LacZ-WPRE.

For the validation of the detargeting strategy, the natural target sequence of miR124 from the integrin-β1 gene was inserted after the WPRE. At the 3′ end of this sequence, we inserted a single adenosine residue to improve sensitivity to miR124 (Wu and Belasco, 2005). The following primers were used to insert the two copies of miR124T into pBC-SK+ (Stratagene): gatccctcgagGCTGAGGTCACAGTGTGCCTTAgagaGCTGAGTCACAGTGTGCCTTctcgaggtcgacg and gatccgtcgacctcgagAAAGGCACACTGTGACCTCAGCtctcAAAGGCACACTGTGACCTCAGCctcgag. We selected the pBC-miR124T(2×) plasmid to clone the miR sequence into the SIN-cPPT-PGK-nls-LacZ-WPRE vector. Clones containing four copies of the target sequences [miR124T(4×)] were used (Brown et al., 2006).

For the visualization of individually labeled cells, a destination vector containing the miR124T sequence and a green fluorescent reporter gene (EGFP) was produced. We first inserted the miR124T(4×) sequence into a Gateway™ destination vector. This SIN-cPPT-PGK-Gateway-WPRE plasmid contained a conversion cassette (RFA-A conversion cassette; Invitrogen) following the mouse PGK promoter. The EGFP (Clontech) gene was inserted into the entry vector pENTR-4 (Invitrogen). An LR clonase (Invitrogen) was then used to transfer the GFP gene into the lentiviral vector [SIN-cPPT-PGK-GFP-WPRE- miR124T(4×)].

A PCR product corresponding to the mouse GLAST cDNA (Genbank AF330257: nucleotides 67–1,698) was obtained from the pcDNA3-myc-GLAST plasmid (kindly provided by Dr. K. Tanaka) with the following primers: GLAST-F, CACCAGATCTCCACCATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGACCAAAAGCAACGGAGAAGAGCC; GLAST-R, CTCGAGCTACATCTTGGTTTCGCTGTCTGCCAC. A hemaglutinin (HA) Tag (epitope YPYDVPDYA) was added to the N-terminus of GLAST to distinguish its expression from the endogenous GLAST. The PCR product was inserted into the pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen). The GLAST cDNA was then transferred, with the LR clonase recombination system, into the SIN-cPPT-PGK-Gateway-WPRE-miR124T(4×) vector.

Finally, to produce the shRNA targeting the mouse GLAST mRNA, the following primers were used to perform a PCR on the pBC-H1 plasmid (pBC plasmid; Stratagene, Amsterdam, The Netherlands, containing the H1 promoter; Abbas-Terki et al., 2002): shGLAST, CTAGTTTCCAAAAAACAAACGCATCACCAGATTTGACAGGAAGAATCTGGTGATGCGTTTGTGGGGATCTGTGGTCTCATACAGAAC; H1-3F, CACCGAACGCTGACGTCATCAACCCG. The PCR product was cloned in the pENTR/D-TOPO plasmid (Invitrogen). The H1-shRNA cassette was then transferred with the LR clonase recombination system in the SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE-LTR-TRE-gateway vector to produce the final plasmid (SIN-cPPT-PGK-nlsLacZ-WPRE-LTR-TRE-siGLAST).

Viruses were produced in 293T cells, using a four-plasmid system, as previously described (Hottinger et al., 2000). The HIV-1-based vectors were pseudotyped with either the vesicular stomatitis virus G protein (VSV) or the G protein of the mokola lyssaviruses (MOK) [pGMok (Pertusa et al., 2008)]. The viruses were resuspended in 1% bovine serum albumin in PBS, and the virus particle content of the batches produced was determined by p24 antigen ELISA (RETROtek, Gentaur). The stocks were stored at −80°C until use.

Animals

Seven-week-old male C57Bl6 mice (weight, 20 g; Charles River, France) were used in this study. All exper-

imental procedures were performed in strict accordance with the recommendations of the European Commission concerning the care and use of laboratory animals.

Stereotaxic Injections

Lentiviral vectors were diluted in PBS–BSA to a final concentration of 100 ng p24/μL. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (1.5 mg/kg). Suspensions of lentiviral vector were injected into the striatum, using a 34-gauge blunt-tip needle linked to a Hamilton syringe by a polyethylene catheter. The stereotaxic coordinates for injection in the striatum were, from bregma: anteroposterior (AP) +1 mm; lateral (L) ±1.8 mm; and ventral (V) −2.7 mm from the dura, with tooth bar set at 0 mm. Mice received a total volume of 4 μL for mokola and mokola-miR124T and 2 μL for VSV and VSV-miR124T vectors, administered at a rate of 0.2 μL/min. For injection into the hippocampus, the stereotaxic coordinates were, from bregma: AP: −2 mm; L: ±2 mm; V: −1.5 mm. Mice received 1 μL of VSV and 1.5 μL of mokola-miR124T vectors. For the cerebellum, the stereotaxic coordinates were, from lambda: AP: −2 mm; L: ±0.5 mm; V: +0.8 mm. Mice received 1 μL of mokola-miR124T. At the end of the injection, the needle was left in place for 5 min before being slowly removed. The skin was sutured and mice were allowed to recover.

Primary Striatal Neuron Cultures

Primary striatal neuron cultures were obtained from E15–E16 rat embryos, as previously described (Escartin et al., 2006). Cells were plated at a density of 400,000 cells/well in 24-well plates. Astrocyte growth was inhibited by adding cytosine arabinoside (Ara C, 10 μM) to the medium at DIV1 and replacing the entire medium after 48 h. Infections were performed at DIV4. We used 50 ng of p24/well for VSV-pseudotyped vectors and 100 ng of p24/well for Mokola-pseudotyped vectors. Cell cultures were studied at 11 DIV for all experiments.

Primary striatal astrocyte cultures

Primary cultures of striatal astrocytes were prepared from E19 embryos of Sprague–Dawley rats, using a modified version of a previously described protocol (Vega et al., 2002). The striatum was dissected in ice-cold Hank's balanced sodium salts without Ca^{2+} and Mg^{2+} and placed in a medium consisting of 50% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco), 50% F12 (Gibco), 10% fetal calf serum and 1% antibiotic–antifungal mixture (Invitrogen). Cells were plated at a density of 200,000 cell/cm^2 The culture medium was replaced 4–5 days after seeding and every 2–3 days thereafter, by regular 'shake-off' involving gently tapping of the plates to remove the less adherent oligodendrocytes, oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor cells and microglia, but not the astrocytes. Astrocytes were infected 10–15 days after plating, with 50 ng p24/cm^2 of VSV-pseudotyped vectors or 100 ng of p24/cm^2 of mokola-pseudotyped vectors, considering the number of cells to have doubled since plating. Experiments were performed 7 days after infection.

Primary Striatal Neuron/Astrocyte Cultures

The protocol used for pure neuronal cultures was also used to obtain striatal mixed neuron/astrocyte cultures. Only Ara C was omitted to allow astrocyte growth. Half the medium was changed weekly and infections were carried out at DIV12. We used 50 ng of p24/well for VSV-pseudotyped vectors and 100 ng of p24/well for Mokola-pseudotyped vectors. Cell cultures were studied at 21 DIV.

Immunostaining

Three weeks after lentivirus injection, the animals were killed with an overdose of sodium pentobarbital and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde and 10% picric acid in PBS. Brains were postfixed by incubation in the same solution overnight and cryoprotected by incubation in a 30% sucrose solution. Coronal brain sections (40 μm) were cut on a freezing microtome, collected serially (interspace, 240 μm), and stored at −20°C until analysis.

Brain sections were double-labeled and studied by confocal microscopy (LSM 510; Zeiss). Sections were blocked and incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against the following: S100β (1:3,000, Sigma), β-galactosidase (1:2,000, Molecular Probes), neuronal nuclear protein (NeuN; 1:500; Chemicon), HA (1:1,000; Covance) and calbindin (1:200, Sigma). They were then incubated for 1 h at room temperature with fluorescent secondary antibodies at a dilution of 1:500 (anti-rabbit AlexaFluor 488, anti-mouse AlexaFluor 594; Invitrogen). The same protocol was applied to cell cultures plated on glass coverslips and fixed by incubation for 15 min in 4% paraformaldehyde except that the incubation with primary antibodies in this case was at room temperature for 3 h.

In each set of conditions, the number of LacZ-NeuN-positive and of LacZ-S100β-positive cells was determined on images (six images per section, three sections, three animals) using a 63× objective on a Zeiss Axioplan2 imaging microscope equipped with automated motorized stage and an image acquisition and analysis system (FluoUp and Mercator software, Explora Nova, La Rochelle, France) as previously described (Coggeshall, 1992; Palfi et al., 2007). The fluorescence intensity of LacZ-NeuN-positive cells was also measured using a 40× objective on three images per section on three different sections and three different animals and *in vitro* on three wells from two to three independent cell cultures, using Morpho expert software (Explora Nova), and was expressed in arbitrary units.

Immunohistochemical detection of β-galactosidase was carried out on sections incubated overnight at 4°C with a primary antibody against β-galactosidase (1:2,000). They were then incubated with biotinylated secondary antibodies (1:1,500) for 1 h at room temperature. Bound antibodies were visualized with 3,3′-diaminobenzidine (DAB Metal Concentrate; Pierce) and the ABC amplification system (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories).

Morphological, numerical, and other features of LacZ-positive cells were obtained by scanning seven serial coronal sections spread over the anteroposterior extent of the striatum (intersection distance: 240 μm) using a 5× objective. The segmentation of LacZ-positive objects throughout the entire section was obtained using light intensity thresholding followed by object's size and shape filtering. The estimated total number of cells was corrected using the Abercrombie factor (Coggeshall, 1992). The infection volume was calculated using the Cavalieri principle.

Western Blot

The striatum was rapidly dissected out on ice. Tissue samples were homogenized as previously described (Escartin et al., 2006). Membranes were incubated overnight with β-galactosidase antibody (1:1,000).

Flow Cytometry Analysis

A nonenzymatic cell dissociation solution (C5914, Sigma) was used to detach cells from wells. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde and permeabilized by incubation in 0.1% Tween for 10 min on ice. Cells were incubated with primary antibodies for 15 min at RT. They were then incubated with fluorescent secondary antibodies for 15 min at RT. Each sample was double-stained with the primary antibodies against the following proteins: S100β (from rabbit, 1:200; AbCAM), β-galactosidase (from chicken, 1:50; AbCAM), neuronal nuclear protein (NeuN conjugated with Alexa Fluor 488; 1:25; Chemicon). The secondary antibodies used were phycoerythrin-conjugated antirabbit (1:200, Molecular Probes) and Alexa Fluor 633-conjugated antichicken (1:200, Molecular Probes) antibodies. Cells were kept in PBS at 4°C until acquiring on a FACS LSR I instrument (BD Biosciences) using CellQuest software (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (Tree star).

Quantification of mRNA by RT-PCR

We extracted mRNA with the RNAII total extraction kit (Macherey-Nagel). We carried out reverse transcription in a total volume of 50 μL, using 0.8 μg total RNA and the random hexamers protocol of the Superscript II first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen).

Real-time quantitative PCR (RT-QPCR) was performed in triplicate, with 3 μL of diluted (1:20) random-primed cDNA (Invitrogen). PCR was carried out in a reaction volume of 20 μL containing Platinum SYBR Green qPCR super Mix-UDG (Invitrogen), and 10 μM of both forward (CCTTACTGCCGCCTGTTTTGAC) and reverse (TGATGTTGAACTGGAAGTCGCC) primers. The ABI PRISM 7000 thermal cycler was programmed for initial denaturation (95°C, 2 min) followed by 40 cycles of amplification (95°C, 15 s; 60°C, 1 min). The amplification rate of each target was evaluated from the cycle threshold (Ct) obtained for cDNA dilutions and corrected for cyclophillin expression (CYCLO-1F: ATGGCAAAT GCTGGACCAAA; CYCLO-2R: GCCTTCTTTCACCTTCC CAAA), which was assumed to be constant. Relative mRNA levels were normalized, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. RT-QPCR was performed on seven to eight samples for each set of conditions, from two independent cultures. Data are expressed as the mean of normalized values for relative nlsLacZ mRNA level.

The same protocol was used to quantify levels of integrin-β1 mRNA with forward (TCAACTGCGATAGGTC CAACG) and reverse (AAGCACCACATTCACAGATGCC) primers. RT-PCR was carried out on five samples for each set of conditions.

Quantification of Endogenous Rat miR124

We quantified rat miR124 from samples analyzed by RT-PCR, using Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Reverse transcription was performed on 160 ng total RNA with the Taqman MicroRNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems). The cDNA was obtained with the Multiscribe RT and a stem-looped primer specific for miR124. QPCR was performed with a Taqman Probe linked to FAM dye and the primers provided in the kit.

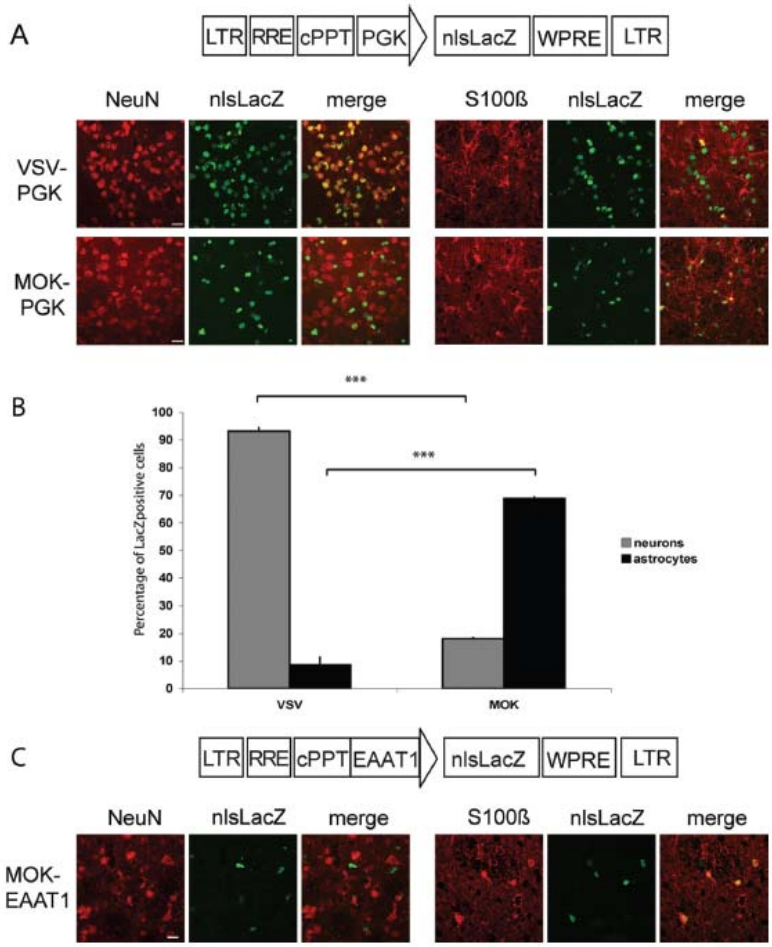
Statistical Analysis

Results are expressed as mean values ± SEM. Statistical analysis included Student's t tests for discrete data and Mann–Whitney U tests for data expressed as percentages.

RESULTS

Effect of Mokola Pseudotyping on Cellular Tropism

We used a mokola envelope to shift the natural neuronal tropism of VSV-pseudotyped lentiviral vectors toward astrocytes. Preliminary experiments performed *in vivo* indicated that transduction efficiency and/or transgene expression were lower with the mokola-pseudotyped vector than with VSV for a similar p24 value. We therefore used twice the amount of mokola-pseudotyped lentiviral vector for comparison with VSV. Follow-



COLOR

Fig. 1. Effect of pseudotyping (VSV *vs.* mokola) and of the EAAT1 promoter on cellular tropism *in vivo*. (**A**) Scheme of the proviral vector form of lentiviral vector with the PGK promoter. Double-immunofluorescence staining after the injection of VSV- or mokola-pseudotyped lentiviral vector into mouse striatum. NeuN-positive cells or S100β-positive cells (red) and β-galactosidase-positive cells (green). (**B**) The use of mokola pseudotyping significantly decreased the percentage of β-galactosidase-NeuN-positive cells, whereas the percentage of β-galactosidase-S100β-positive cells increased. (**C**) Scheme of the proviral vector form of lentiviral vector with the EAAT1 promoter. The use of the specific glial promoter EAAT1 strongly reduced the expression of the transgene with no change in the tropism.

ing injection into mouse striatum, the *LacZ* reporter gene displayed a significant shift in expression profile, being more strongly expressed in astrocytes with mokola-pseudotyped lentiviral vectors than with VSV (Fig. 1A). Quantification showed that the percentage of β-galactosidase-NeuN-positive cells was significantly lower with mokola vectors than with VSV vectors [18 ± 4% (93/520) *vs.* 93 ± 1% (1440/1546), Mann–Whitney U test, $P < 0.001$], whereas the percentage of β-galactosidase-S100β-positive cells was significantly higher [68 ± 8% (282/416) *vs.* 9 ± 2% (100/1191), Mann–Whitney U test, $P < 0.001$] (Fig. 1B).

F1

Effect of a Glial Promoter (EAAT1) on Cellular Tropism

We next tested whether a glial-specific promoter (EAAT1) could restrict the transgene expression within astrocytes. The use of EAAT1 dramatically reduced the

overall expression of LacZ (Fig. 1C). In addition, the relative percentage of astrocytes (73 ± 4%) *versus* neurons (16 ± 4%) expressing β-galactosidase was not improved compared with PGK promoter.

Effect of Inserting a Neuronal miRNA Target (miR124T) on Cellular Tropism

We then used a detargeting strategy with miRNA to eliminate residual expression in neuronal cells. We successfully inserted four copies of an experimentally validated miR124 target sequence from the integrin-β1 gene (miR124T) into our viral vector (see Fig. 2) (Lim et al., 2005). *In vitro* experiments on primary striatal neuron/astrocyte cultures indicated that inserting miR124T into the vector reduced transgene expression in NeuN-positive cells (Fig. 3A). Using microscopy imaging, we first observed that the percentage of infected neurons decreased from 96 to 51% with VSV-miR124T. We next quantified mean fluorescence intensity in LacZ-NeuN-positive cells. Mean fluorescence intensity was 49% lower with VSV-miR124T than with VSV (79 ± 9, n = 448 *vs*. 41 ± 7, n = 446; Student's t test, P = 0.016, Fig. 3B). By contrast, mean fluorescence intensity was similar in S100β-positive cells infected with VSV and VSV-miR124T (65 ± 13, n = 116 *vs*. 85 ± 10, n = 122; Student's t test, P = 0.28, Fig. 3B). Transgene expression was specifically decreased in neurons only, as confirmed by flow cytometry analyses (Fig. 3C).

We analyzed the mechanisms underlying this lower level of expression in neurons and assessed whether this was due to degradation of target mRNAs and/or inhibition of the translation. We carried out quantitative RT-PCR analysis on pure astrocytic and neuronal cultures. β-Galactosidase mRNA levels in neurons infected with VSV-miR124T were half those in neurons infected with VSV (49 ± 11%, n = 7 *vs*. 100 ± 15%, n = 8, Mann–Whitney U test, P = 0.021), whereas the two vectors gave similar levels of β-galactosidase mRNA in astrocytes (82 ± 5%, n = 5 *vs*. 100 ± 12%, n = 4, Mann–Whitney U test, $P > 0.05$, Fig. 3D). The silencing of the transgene is therefore mainly due to mRNA cleavage and not to inhibition of the translation. Finally, we investigated the impact of our new lentiviral vector on the endogenous miRNA machinery to exclude a saturation/dysfunction of this regulatory pathway that may lead to deleterious effects in astrocytes. In particular, we assessed whether the expression of the endogenous miR124 was altered by the presence of the mir124T in our vector (feedback loop) (Kim et al., 2007) or whether the miRNA/RISC (miRISC) machinery was saturated, by assessing the expression of one natural target of the mir124, the integrin-β1. RT-PCR analyses indicated no difference in the levels of miR124 (Fig. 3E) or integrin-β1 (Fig. 3F) mRNA between neurons infected with VSV and neurons infected with VSV-miR124T (miR124 levels 100 ± 1%, n = 5 for VSV *vs*. 97 ± 1%, n = 5 for VSV-miR124T, Mann–Whitney U test, P = 0.072; integrin-β1 levels 100 ± 11%, n = 5 for VSV *vs*. 99 ± 8%, n = 5 for VSV-miR124T, Mann–Whitney U test, P = 0.337). These data indicate that our vector is not perturbing the miRNA machinery of astrocytes.

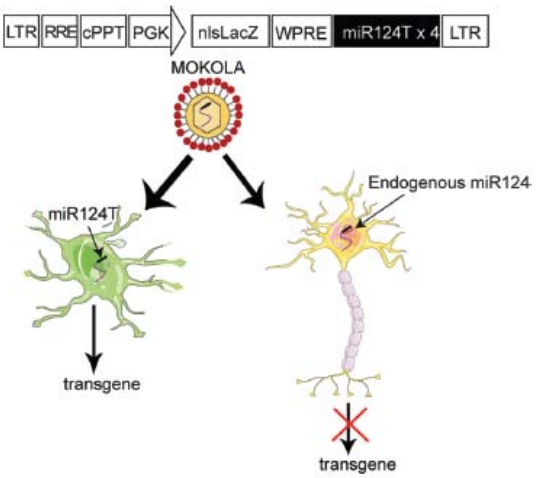
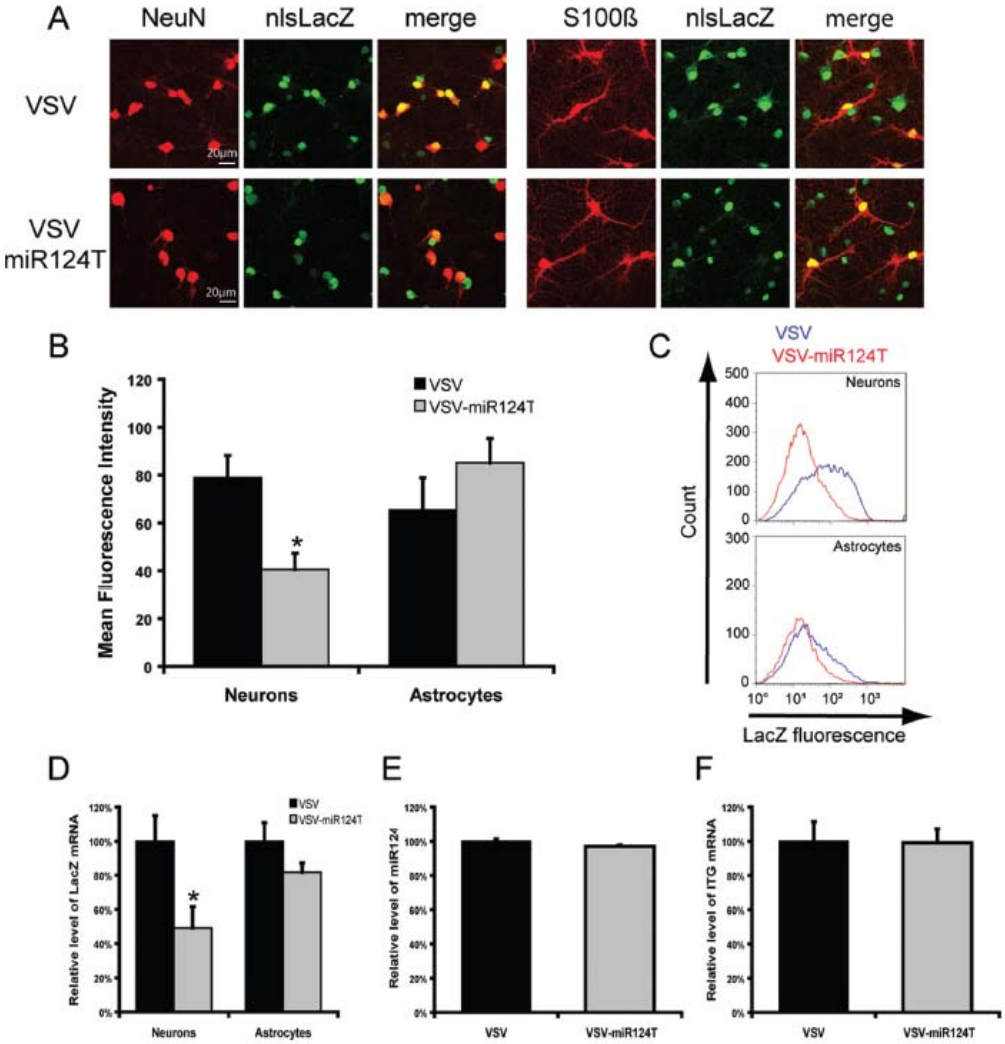


Fig. 2. Detargeting strategy using miRNA. Scheme of the proviral vector form of lentiviral vector modified to carry miR124T sequences. For the specific inhibition of residual transgene expression in infected neurons, four copies of a natural target (miR124T) of the neuronal miR124 were inserted into the 3′ UTR region of the lentiviral vector. Binding of miR124 to its target should promote its degradation and/or inhibit its translation, thereby preventing transgene expression.

We next investigated whether the insertion of four copies of miR124T into a lentiviral vector effectively decreased neuronal transgene expression *in vivo*, by comparing β-galactosidase levels in mice injected with VSV-pseudotyped lentiviral vector (strong neuronal tropism) and mice injected with a vector containing the miR124T sequence (VSV-miR124T). Immunostaining for β-galactosidase 3 weeks after striatal injection showed that both the level of expression and the number of infected cells in mouse striatum were lower if the miR124T sequence was inserted into the vector (Fig. 4A). Double-immunofluorescence staining indicated that β-galactosidase levels were lower in NeuN-positive cells (Fig. 4B). We quantified mean fluorescence intensity in neurons and found it to be 50% lower in mice injected with VSV-miR124T (78 ± 2, n = 858 *vs*. 39 ± 2, n = 660; Student's t test, $P < 0.001$, Fig. 4C). This result was finally confirmed by western blot analysis on the whole striatum (Fig. 4D).

Targeting Astrocytes *In Vivo* with a Combination of Mokola Pseudotyping and miR124T

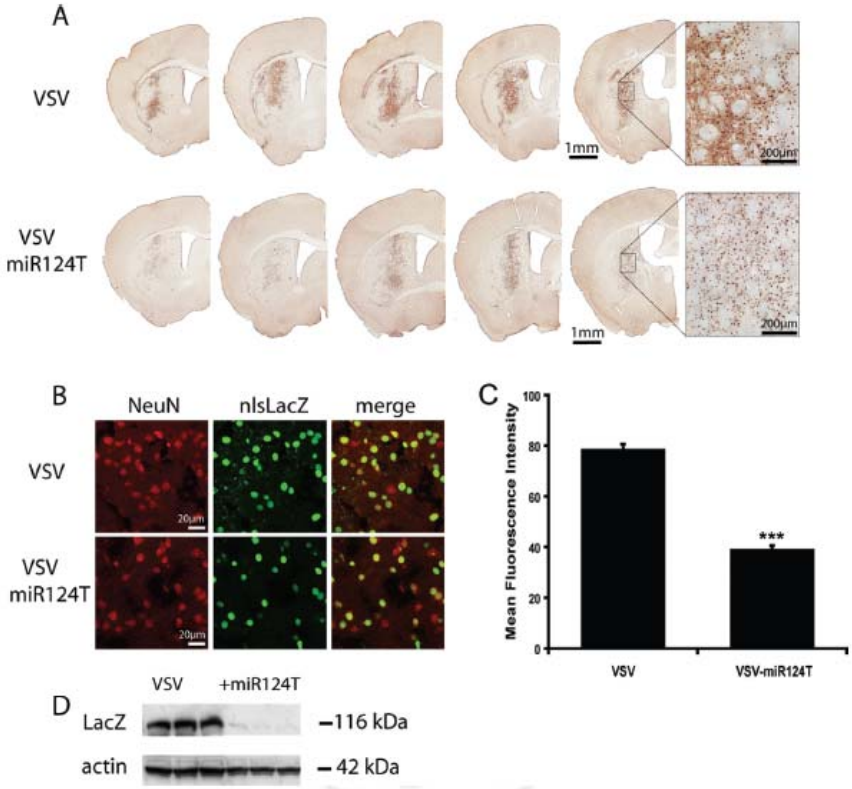
Having confirmed that miR124T efficiently and specifically downregulated transgene expression in neurons, we combined mokola pseudotyping and the detargeting strategy based on miR124T. β-Galactosidase immunostaining showed that both the level of expression and the number of infected cells in mouse striatum were



COLOR

Fig. 3. Efficacy and mechanism of miR124T insertion *in vitro*. (**A**) Double-immunofluorescence staining of mixed neuron/astrocyte cultures shows the level of expression of the transgene (β-galactosidase, green) to be significantly lower in NeuN-positive cells (red) after the insertion of miR124T. Quantification of the mean fluorescence intensity (in arbitrary units) of β-galactosidase in NeuN-positive and S100β-positive cells, showing a significant decrease in expression only in neurons (**B**), confirmed by flow cytometry (**C**). (**D**) RT-PCR analyses on pure neuronal and astrocytic cultures showed that miR124T halved LacZ mRNA levels in neurons only. Insertion of miR124T did not significantly alter the expression of miR124 (**E**) and of its natural target integrin-β1 (ITG, **F**).

slightly lower with miR124T, suggesting that the residual neuronal expression of the transgene had been successfully targeted (Fig. 5A). Double-immunofluorescence staining confirmed that miR124T restricted transgene expression almost exclusively to astrocytes (Fig. 5B). Quantification showed that the percentage of β-galactosidase-NeuN-positive cells was significantly decreased from 18 ± 4% to 6 ± 4% (93/520 *vs.* 26/435, Mann–Whitney U test, $P < 0.001$), whereas the percentage of β-galactosidase-S100β-positive cells was significantly increased from 68 ± 8% to 89 ± 3% (282/416 *vs.* 294/331, Mann–Whitney U test, $P < 0.001$), by the inclusion of the miR124T sequence in the mokola-pseudotyped vector (Fig. 5C). We therefore reversed the neuron to astrocyte ratio (expressed as percentage of positive β-galactosidase cells) from 93/9 (VSV) to 6/89 (mokola-miR124T). We also performed a quantification of the total number of infected LacZ-positive cells in the stria-



COLOR

Fig. 4. Proof-of-principle for the efficacy of miR124T insertion *in vivo*. We inserted four copies of miR124T into the classical neuronal VSV-pseudotyped lentiviral vector to check the efficacy of this strategy *in vivo*. (**A**) Immunostaining of β-galactosidase showing that both the levels of this protein and the number of infected cells producing this protein in mice striatum are decreased by miR124T. (**B**): Double-immunofluorescence staining indicates that the level of LacZ transgene expression (green) in NeuN-positive cells (red) is decreased by miR124T insertion, as confirmed by the significant decrease in mean fluorescence intensity (in arbitrary units) for β-galactosidase observed in NeuN-positive cells (**C**). Immunoblotting for β-galactosidase in the whole striatum further confirmed that insertion of miR124T in the VSV vector decreases transgene expression (**D**).

tum after injection of the mokola-miR124T vector. We found that injection of 4 μL of mokola-miR124T into the mouse striatum led to the infection of 56,600 ± 3,000 cells in a mean volume of 4.29 ± 0.71 mm^3 (n = 4). Since 89% of the infected cells are astrocytes, this means that one injection led to the infection of 50,430 astrocytes, representing a numerical density of 11,740/mm^3. Considering that the numerical density of S100β-positive cells is ~20,000/mm^3 (Savchenko et al., 2000), we can reasonably assume that ~60% of astrocytes are targeted by a single injection of our mokola-miR124T lentiviral vector in a given volume of ~4 μL.

We then investigated whether our new lentiviral vector restricted transgene expression to astrocytes in other regions of the brain. We found that mokola-miR124T vectors express β-galactosidase only in astrocytes (S100β-positive cells), with no expression in pyramidal cells (NeuN-positive cells) after injection into the hippocampus (Figs. 6A–D). Similarly, only Bergmann glial cells from the molecular layer and astrocytes from the granular cell layer (S100β-positive cells) expressed β-galactosidase, whereas no β-galactosidase was detected in the Purkinje cells (Calbindin-positive cells) of the cerebellum (Figs. 6E–G). Another potential use of our mokola-miR124T vector is visualization of the full three-dimensional structure of astrocytes if the green fluorescent protein (GFP) is used as a reporter gene (Figs. 6H,I). Finally, this new lentiviral vector can also be used to induce a cell type-specific overexpression or a downregulation of a gene encoding an astrocytic protein. As a proof-of-principle, we first overexpressed the glial glutamate transporter GLAST within the striatum (Figs. 6J–L). Since GLAST is located in the plasma membrane, its production reveals the typical bushy structure of astrocytes. We also provided evidence that our lentiviral vector encoding a shRNA against GLAST effectively downregulated the expression of this glial glutamate transporter in a localized area within the striatum (Figs. 6M–O).

F6

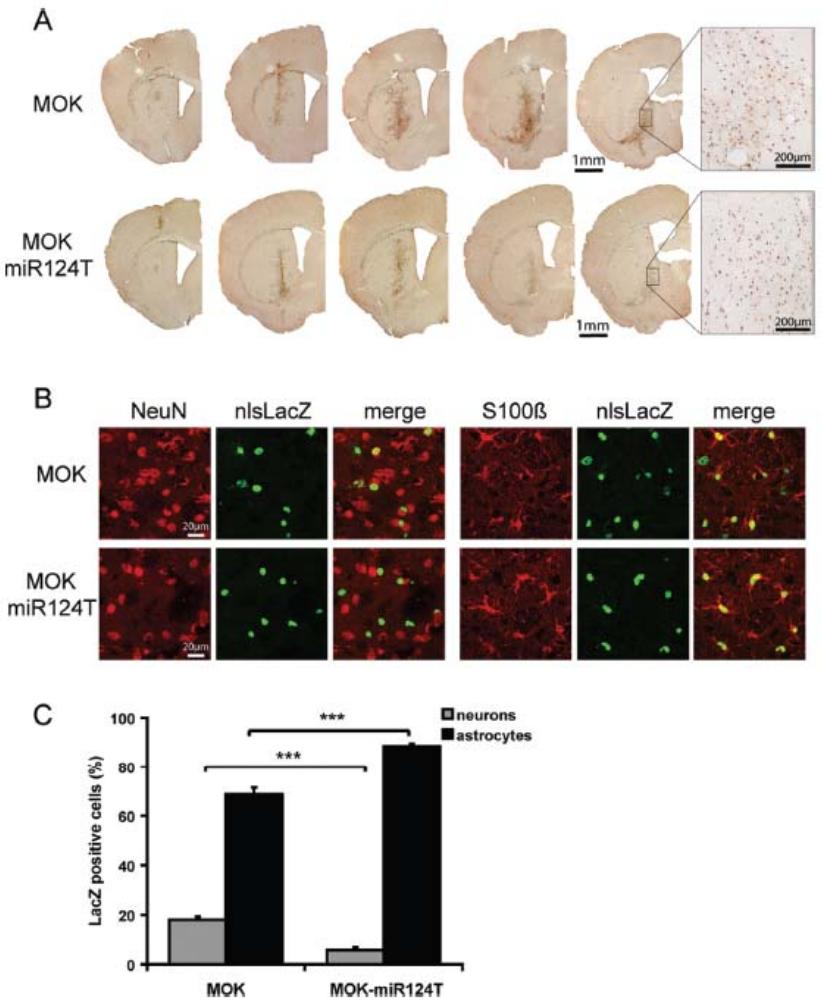


Fig. 5. Targeting astrocytes *in vivo* with a combination of mokola pseudotyping and miR124T. (**A**) Immunostaining of β-galactosidase, showing that transgene expression is reduced by miR124T. (**B**) Double-immunofluorescence staining confirmed that miR124T insertion restricted transgene expression (green) almost exclusively to S100β-positive cells (red). (**C**) The percentage of β-galactosidase-positive cells that also stained positively for NeuN was significantly decreased, whereas the percentage of β-galactosidase-positive cells also positive for S100β was significantly increased by the insertion of miR124T into the mokola-pseudotyped vector.

DISCUSSION

We have developed a new lentiviral expression system based on pseudotyping with the mokola envelope and the endogenous miRNA machinery for selective transgene expression in astrocytes within the CNS.

Previous studies have demonstrated that mokola-pseudotyped lentiviral vectors give high levels of transgene expression in rodent brain, transducing both neuronal and glial cells (Desmaris et al., 2001; Pertusa et al., 2008; Watson et al., 2002). However, viral particle production is less efficient with mokola envelope, resulting in slightly lower titers than that obtained with VSV-pseudotyped vectors (Desmaris et al., 2001). In this study, we observed a dramatic shift in the proportion of neuronal/glial cells transduced between VSV- and mokola-pseudotyped lentiviral vectors. In the striatum of mice injected with the mokola vector, 68% of β-galactosidase-positive cells expressed the glial marker S100β, whereas only 9% positive cells in VSV-injected striata expressed this marker. This percentage is higher than that obtained by Desmaris et al. (2001), who detected 13% GFAP-positive cells in rat striatum. Species variability in gene transfer efficiency and differences in the glial marker used for analysis may account for this discrepancy (Kato et al., 2007).

This selective, but not entirely specific, expression of mokola-lentiviral vectors in astroglial cells was encour-

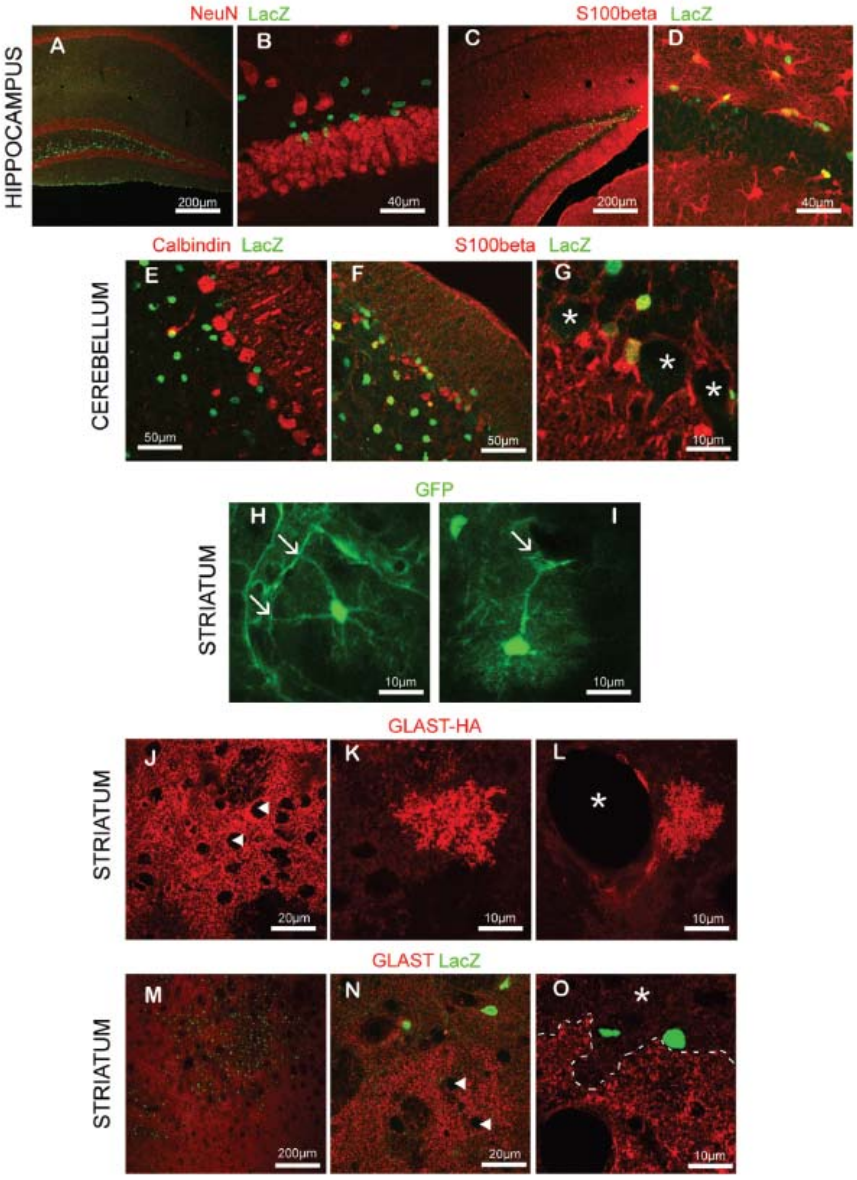


Fig. 6. *In vivo* applications of astroglial targeting. (**C**, **D**) The Mokola-miR124T vector expressing LacZ induced the production of β-galactosidase in S100β-positive astrocytes but not in pyramidal NeuN-positive cells (**A**, **B**) after its injection into the hippocampus. (**F**, **G**) S100β-positive Bergmann glial cells from the molecular layer and astrocytes from the granular cell layer, but not calbindin-positive Purkinje cells (**E** and white stars in **G**) from the cerebellum, produced β-galactosidase. (**H**, **I**) Visualization of the structure of astrocytes following infection of the mokola-miR124T vector expressing GFP into the striatum. Endfeet abutting onto blood vessels are clearly visible (arrows). (**J**) Overproduction of a specific astrocytic protein located in the plasma membrane (GLAST, glial glutamate transporter) in astrocytes within the striatum (holes are neuronal somata, white arrowheads), revealing the typical bushy structure of astrocytes (**K**), one of which is in contact with a blood vessel (**L**, white star). (**M**) Downregulation of GLAST expression in the striatum following injection of a mokola-miR124T vector expressing β-galactosidase and a siRNA targeted against GLAST. The downregulation is spatially restricted to the area where infected astrocytes expressing LacZ are found (white star) (**N**, **O**).

COLOR

aging, but the lack of specificity precluded the dissection of functions *in vivo*. Tissue-specific promoters have been proposed as a means of altering the tropism of lentiviral vectors in the CNS (Jakobsson and Lundberg, 2006). We therefore inserted the promoter from the glial glutamate transporter (EAAT1) gene into our lentiviral vector (Kim et al., 2003), but found that the level of expression of the transgene was highly reduced. In addition, no increase in the efficiency of glial cell transduction was observed with this glial promoter. Difficulties identifying promoter elements reproducing the endogenous pattern of gene expression with a sufficient level of expression and the influence of integration sites are major limitations to this approach. The recent identification and characterization of genes with strong expression in astrocytes should provide new and improved cell type-specific promoters for gene transfer in the CNS (Cahoy et al., 2008).

As an alternative strategy to restricting transgene expression strictly to astroglial cell populations, we used miRNA to block transgene expression in neuronal cells. Brown et al. (2006, 2007) have elegantly demonstrated the power of this approach. They showed that the integration of four tandem copies of a miRNA target sequence perfectly complementary to the miR-142-3p in the 3′ untranslated region of the lentiviral vector abolished transgene expression in hematopoietic cells (Brown et al., 2006). The extent to which expression was repressed was proportional to the number of miRNA target sites (Brown et al., 2007; Doench et al., 2003). In addition, the level of mRNA degradation was correlated with endogenous miRNA activity, although a direct relationship was not always observed, suggesting that additional factors influenced miRNA-mediated suppression (Brown et al., 2007). We used a target sequence of the neuron-specific miR124, one of the most abundant miRNAs in the brain, with $\sim 10^4$ copies per cell body (Deo et al., 2006; Lagos-Quintana et al., 2002; Smirnova et al., 2005). The integration of four copies of the natural, validated target sequence from the integrin-β1 gene was associated with a halving of β-galactosidase levels in neurons, both *in vitro* and *in vivo*. This result is consistent with the ~50% decrease in transgene expression in a vector carrying four copies of a natural target (NFI-A) of the miR223 in U937 cells (Brown et al., 2007). RT-PCR analysis and fluorescence measurements of transgene expression showed that this regulation principally involved mRNA degradation in primary neuronal cultures. Furthermore, it was achieved without disturbing expression of the endogenous miR124 and its natural target, integrin-β1. In adult mouse brains, we demonstrated that combining mokola pseudotyping and miRNA regulation led to restricted transgene expression in astrocytes not only in the striatum (6% NeuN-positive cells and 89% S100β-positive cells) but also in the hippocampus and cerebellum.

This technology is expected to have many applications, given increasing interest in the role of glial cells and the current lack of experimental tools for selectively manipulating these cells, particularly *in vivo*. In the last few years, a number of targeted molecular genetic approaches based on transgenic animals have demonstrated that changes in protein levels in astrocytes may affect neuronal functions. For example, studies of transgenic mice in which the SNARE-dependent release of gliotransmitters in astrocytes was selectively impaired (Pascual et al., 2005) have shown that astrocytes are the main source of extracellular adenosine, which is known to inhibit glutamatergic transmission. Recent studies have indicated that the selective production of mutant proteins such as Tau or mutant ataxin-7 in the astrocytes of transgenic mice is sufficient to cause focal neuron degeneration (Custer et al., 2006; Forman et al., 2005), whereas the selective elimination of mutant superoxide dismutase (SOD1) in astrocytes slows progression of amyotrophic lateral sclerosis (Yamanaka et al., 2008). Besides these powerful but time-consuming transgenic approaches, the use of viral vectors offers several advantages such as (1) the possibility to restrict the transgene expression to any region of interest at any period during development and adulthood, (2) a great versatility such that any transgene can be expressed to induce either an overexpression or a downregulation using silencing RNAs, and (3) a potential use in primates for conducting preclinical studies. If future experiments provide evidence for a significant role of astrocytes in the progression of any of these diseases, new therapeutic strategies based on gene transfer into astrocytes via our lentiviral vector could be envisaged. Indeed, we show here that our expression system can be used for the specific overexpression in astrocytes of the glial transporter GLAST, the main target of mutant ataxin-7 (spinocerebellar ataxia-7) (Custer et al., 2006). The demonstration that a single injection of 4 μL of mokola-miR124T vector infected ~50,000 astrocytes in a volume of ~4 mm^3 supports its use in a therapeutic context.

Finally, the use of fluorescent reporter genes could help to resolve unanswered questions concerning the full three-dimensional structure and organization of spatial domains of control (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007) or activated astrocytes (Oberheim et al., 2008; Wilhelmsson et al., 2006).

In conclusion, we have designed a new paradigm in vector design with applications for genetic engineering in the growing field of neuron–astrocyte interactions. It is expected that this new lentiviral vector may also have important implications for therapeutic gene transfer.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Kohichi Tanaka for providing us with the GLAST plasmid and antibody, Dr. Jacques Mallet for providing the pGMOK plasmid, Carole Malgorn, Fanny Petit, Diane Houitte, Marion Chaigneau, and Martine Guillermier for invaluable technical help, and Dr. Carole Escartin for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Déglon N, Pralong W, Aebischer P. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. Hum Gene Ther 13:2197–2201.

Brenner M, Kisseberth WC, Su Y, Besnard F, Messing A. 1994. GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. J Neurosci 14:1030–1037.

Broekman ML, Comer LA, Hyman BT, Sena-Esteves M. 2006. Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV-1 or -2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain. Neuroscience 138:501–510.

Brown BD, Gentner B, Cantore A, Colleoni S, Amendola M, Zingale A, Baccarini A, Lazzari G, Galli C, Naldini L. 2007. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. Nat Biotechnol 25:1457–1467.

Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi Sergi L, Naldini L. 2006. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. Nat Med 12:585–591.

Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ, Muzyczka N. 2004. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. Mol Ther 10:302–317.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J Neurosci 22:183–192.

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. J Neurosci 28:264–278.

Cearley CN, Wolfe JH. 2006. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. Mol Ther 13:528–537.

Coggeshall RE. 1992. A consideration of neural counting methods. Trends Neurosci 15:9–13.

Custer SK, Garden GA, Gill N, Rueb U, Libby RT, Schultz C, Guyenet SJ, Deller T, Westrum LE, Sopher BL, others. 2006. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. Nat Neurosci 9:1302–1311.

AQ1

Déglon N, Tseng JL, Bensadoun JC, Zurn AD, Arsenijevic Y, Pereira de Almeida L, Zufferey R, Trono D, Aebischer P. 2000. Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. Hum Gene Ther 11:179–190.

Deo M, Yu JY, Chung KH, Tippens M, Turner DL. 2006. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. Dev Dyn 235:2538–2548.

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.

Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. 2003. siRNAs can function as miRNAs. Genes Dev 17:438–442.

Escartin C, Brouillet E, Gubellini P, Trioulier Y, Jacquard C, Smadja C, Knott GW, Kerkerian-Le Goff L, Deglon N, Hantraye P, others. 2006. Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. J Neurosci 26:5978–5989.

Forman MS, Lal D, Zhang B, Dabir DV, Swanson E, Lee VM, Trojanowski JQ. 2005. Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. J Neurosci 25:3539–3550.

Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. 2007. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. J Neurosci 27:6473–6477.

Haydon PG, Carmignoto G. 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. Physiol Rev 86:1009–1031.

Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Hirrlinger J, Kirchhoff F. 2006. Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. Glia 54:11–20.

Hottinger AF, Azzouz M, Déglon N, Aebischer P, Zurn AD. 2000. Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. J Neurosci 20:5587–5593.

Jakobsson J, Lundberg C. 2006. Lentiviral vectors for use in the central nervous system. Mol Ther 13:484–493.

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.

Kato S, Inoue K, Kobayashi K, Yasoshima Y, Miyachi S, Inoue S, Hanawa H, Shimada T, Takada M, Kobayashi K. 2007. Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains using a human immunodeficiency virus type 1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein. Hum Gene Ther 18:1141–1151.

Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A. 2007. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. Science 317:1220–1224.

Kim SY, Choi SY, Chao W, Volsky DJ. 2003. Transcriptional regulation of human excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1): Cloning of the EAAT1 promoter and characterization of its basal and inducible activity in human astrocytes. J Neurochem 87:1485–1498.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol 12:735–739.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature 433:769–773.

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. Nat Cell Biol 7:719–723.

Lobsiger CS, Cleveland DW. 2007. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. Nat Neurosci 10:1355–1360.

Maragakis NJ, Rothstein JD. 2006. Mechanisms of disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. Nat Clin Pract Neurol 2:679–689.

Mazarakis ND, Azzouz M, Rohll JB, Ellard FM, Wilkes FJ, Olsen AL, Carter EE, Barber RD, Baban DF, Kingsman SM, others. 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.

Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kuhn R, Gotz M. 2006. Inducible gene deletion in astroglia and radial glia–a valuable tool for functional and lineage analysis. Glia 54:21–34.

Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272:263–267.

Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M. 2008. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. J Neurosci 28:3264–3276.

Palfi S, Brouillet E, Jarraya B, Bloch J, Jan C, Shin M, Conde F, Li XJ, Aebischer P, Hantraye P, others. 2007. Expression of mutated huntingtin fragment in the putamen is sufficient to produce abnormal movement in non-human primates. Mol Ther 15:1444–1451.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science 310:113–116.

Paterna JC, Feldon J, Bueler H. 2004. Transduction profiles of recombinant adeno-associated virus vectors derived from serotypes 2 and 5 in the nigrostriatal system of rats. J Virol 78:6808–6817.

Pertusa M, Garcia-Matas S, Mammeri H, Adell A, Rodrigo T, Mallet J, Cristofol R, Sarkis C, Sanfeliu C. 2008. Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats. Neurobiol Aging 29:1366–1379.

Savchenko VL, McKanna JA, Nikonenko IR, Skibo GG. 2000. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: Comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. Neuroscience 96:195–203.

Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: A molecular perspective. Nat Rev Neurosci 7:194–206.

Slezak M, Goritz C, Niemiec A, Frisen J, Chambon P, Metzger D, Pfrieger FW. 2007. Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells. Glia 55:1565–1576.

Slezak M, Pfrieger FW. 2003. New roles for astrocytes: Regulation of CNS synaptogenesis. Trends Neurosci 26:531–535.

Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. Eur J Neurosci 21:1469–1477.

Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. 2006. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. Nat Neurosci 9:260–267.

Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, Velu T, Brotchi J, Levivier M. 2004. Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. J Gene Med 6 (Suppl 1):S212–S222.

Tsang J, Zhu J, van Oudenaarden A. 2007. MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. Mol Cell 26:753–767.

Vega C, Pellerin L, Dantzer R, Magistretti PJ. 2002. Long-term modulation of glucose utilization by IL-1 alpha and TNF-alpha in astrocytes: Na+ pump activity as a potential target via distinct signaling mechanisms. Glia 39:10–18.

Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. Nat Rev Neurosci 6:626–640.

Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. Neuron 37:275–286.

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(5 Pt 1):528–537.

Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M. 2006. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. Proc Natl Acad Sci USA 103:17513–17518.

Wong LF, Azzouz M, Walmsley LE, Askham Z, Wilkes FJ, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Mazarakis ND. 2004. Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. Mol Ther 9:101–111.

Wong LF, Goodhead L, Prat C, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Mazarakis ND. 2006. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: Therapeutic and research applications. Hum Gene Ther 17:1–9.

Wu L, Belasco JG. 2005. Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. Mol Cell Biol 25:9198–9208.

Xu R, Janson CG, Mastakov M, Lawlor P, Young D, Mouravlev A, Fitzsimons H, Choi KL, Ma H, Dragunow M, others. 2001. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. Gene Ther 8:1323–1332.

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci 11:251–253.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science 304:594–596.

Author Proof