

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE  
PIERRE ET MARIE CURIE**

**Spécialité :**

**Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire**

**Présentée par Alexis-Pierre Bemelmans**

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

**Transfert de gènes à potentiel thérapeutique dans des modèles  
de la maladie de Huntington développés chez le rat.**

**Soutenue le 10 décembre 1999**

**devant le jury composé de :**

<b>Marie-Jo Besson</b>	<b>Président</b>
<b>Pierre Césaró</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Olivier Danos</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Jean-louis Mandel</b>	<b>Examineur</b>
<b>Jacques Mallet</b>	<b>Directeur de thèse</b>

## Résumé

La maladie de Huntington est une affection héréditaire qui se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones GABAergiques du striatum. Cela entraîne des troubles moteurs et cognitifs qui aboutissent à la mort après une évolution d'une quinzaine d'années. On ne connaît aucun traitement susceptible d'arrêter ou de ralentir le processus neurodégénératif.

Nous avons étudié des stratégies de traitement par transfert de gène dans des modèles de la maladie de Huntington développés chez le rat. Nous nous sommes intéressés à des stratégies de type soit restauratrice, par transfert du gène de la glutamate décarboxylase, l'enzyme de biosynthèse du GABA, soit conservatrice, par transfert de gènes neuroprotecteurs. Cette deuxième approche a donné les résultats les plus prometteurs. Nous avons montré que le transfert par adénovirus recombinant du gène de la superoxyde dismutase à des neurones de striatum en culture primaire permet de les protéger totalement de la neurotoxicité du glutamate. *In vivo*, nous avons montré chez le rat que l'injection intracérébrale d'un adénovirus recombinant codant le BDNF entraîne une surexpression de cette neurotrophine. Cette surexpression permet de protéger les neurones GABAergiques du striatum de la dégénérescence induite par l'injection intrastriatale d'acide quinolinique, un modèle de la maladie de Huntington. Outre le BDNF, nous nous sommes intéressés au transfert du gène d'un autre facteur trophique, le GDNF. Ce dernier a démontré des capacités de neuroprotection moindre que le BDNF dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique. Ce travail démontre que, dans un modèle de la maladie de Huntington, il est possible d'obtenir une neuroprotection sensible à la suite du transfert de gène intracérébral direct d'une neurotrophine.

*Alors que la rédaction de ce mémoire s'achève, j'adresse ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont permis la concrétisation de ces cinq années de travail. Je tiens à remercier particulièrement :*

*Jacques Mallet, qui m'a donné la chance de travailler dans un environnement scientifique de grande qualité dont le dynamisme tient sans doute à son enthousiasme et son optimisme inoxydables.*

*Martine Barkats, Emmanuel Brouillet, Philippe Horellou et Philippe Ravassard, qui ont participé à l'amélioration de ce manuscrit. Même si certains m'ont donné beaucoup de travail, je les en remercie vivement.*

*Les membres du jury, Madame Marie-Jo Besson, Messieurs Pierre Césaro, Olivier Danos et Jean-Louis Mandel, pour avoir accepté de juger ce manuscrit.*

*Philippe Horellou, qui a guidé mes premiers pas au sein du laboratoire et m'a initié à la recherche.*

*Isabelle Brunet, capable de "techniquer" 100 lames d'histologie sans arrêter de parler une seconde ; Sylvie Carpaye, qui s'occupe des animaux avec une grande efficacité ; Philippe Colin, pour les longues journées passées ensemble à opérer les rats.*

*Tous mes amis du laboratoire (ils se reconnaîtront) qui ont contribué à faire de cette expérience une période riche et finalement agréable. Les citer tous n'est pas possible, et quelques-uns seulement, c'est l'assurance de faire des jaloux. Mais il faut bien prendre ses responsabilités. Merci donc à Philippe (mon jumeau !), Fabienne, Isabelle, Olga (qui a bien voulu stresser pour deux tout au long de la rédaction de ce mémoire), Sylvie, Nicole, Gilles, Olivier, Martine, Marie-Hélène, Delphine, Hélène, Véro, re-Fabienne (il n'y a que des filles dans ce laboratoire), Che, les Sams, le groupe "pie génique" ...*

*La fondation Marcel Mérieux et l'association Huntington France, pour leur soutien financier qui m'a permis de mener ces travaux.*

*Enfin, ma famille, pour la confiance qu'elle m'a accordée lorsque je me suis lancé dans l'aventure de la thèse. Mes parents, pour leur soutien et les corrections autographe de ma Maman (elle n'a pas relu cette partie). Ma femme et ma fille, pour leur patience (cette semaine, Hannah a prononcé sa première phrase : "Papa n'est pas là").*

---

# TABLE DES MATIERES

<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>2</b>
<b>LA MALADIE DE HUNTINGTON .....</b>	<b>3</b>
ASPECTS CLINIQUES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON.....	4
La maladie de Huntington : historique et épidémiologie.....	4
1. Historique.....	4
2. Epidémiologie.....	5
Description clinique de la maladie de Huntington .....	6
1. Les symptômes moteurs.....	6
2. Les troubles d'ordre cognitif et psychiatrique.....	7
3. Age d'apparition de la maladie.....	8
ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON .....	10
Anatomie fonctionnelle des ganglions de la base en général, et du striatum en particulier.....	10
1. Voies et fonctions des ganglions de la base .....	10
2. Anatomie fonctionnelle du striatum.....	11
3. Les différents types neuronaux du striatum.....	12
Neuropathologie de la maladie de Huntington.....	14
1. Examen macroscopique .....	14
2. Examen microscopique.....	15
3. Sélectivité de la neurodégénérescence au niveau striatal.....	16
4. Autres régions atteintes.....	17
BASES MOLECULAIRES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON.....	19
La mutation responsable de la maladie de Huntington .....	19
1. Historique.....	19
2. Les maladies neurodégénératives à répétitions de triplets .....	20
3. Le phénomène d'anticipation .....	22
Apports de la génétique moléculaire à la compréhension du mécanisme pathologique .....	24
1. Patron d'expression du gène IT15 .....	24
2. Hypothèse du gain de fonction.....	26
3. Agrégation de la huntingtine mutée .....	26
HYPOTHESES CONCERNANT LE MECANISME DE MORT CELLULAIRE.....	29
L'hypothèse excitotoxique .....	29
1. Les excitotoxines.....	29
2. Rôle des radicaux libres dans le processus excitotoxique.....	31
3. Excitotoxicité et modèles transgéniques.....	32
3. Excitotoxicité et protéines interagissant avec la huntingtine .....	33
Modèles impliquant un dysfonctionnement du métabolisme énergétique.....	34
1. Chute du métabolisme énergétique chez les patients.....	34
2. L'acide 3-nitropropionique.....	35
3. Protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et interagissant avec la huntingtine.....	37
Rôle de l'apoptose dans le processus neurodégénératif.....	38
1. Mise en évidence de l'apoptose.....	38
2. Implication des caspases.....	39
Conclusion : vers la "découverte" d'un traitement ?.....	41
<b>THERAPIES EXPERIMENTALES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON .....</b>	<b>43</b>
<b>ESSAIS THERAPEUTIQUES EN COURS DANS LA MALADIE DE HUNTINGTON.....</b>	<b>44</b>
Grefe de cellules striatales embryonnaires .....	44
1. Bases expérimentales .....	45
2. Essais cliniques en cours .....	46
3. Limites de la stratégie de neurotransplantation .....	47
Traitements pharmacologiques de la maladie de Huntington.....	48
1. Agents anti-excitotoxicité.....	48
2. Le coenzyme Q10 .....	49
Conclusion : vers la thérapie génique.....	50
<b>THERAPIE GENIQUE ET MALADIE DE HUNTINGTON .....</b>	<b>52</b>

Thérapie génique : généralités.....	52
1. Principe et champ d'application de la thérapie génique .....	52
2. Les vecteurs permettant le transfert de gène .....	53
3. Le transfert de gène appliqué aux maladies neurodégénératives.....	58
Vecteurs adénoviral et lentiviral.....	59
1. L'adénovirus recombinant .....	59
2. Le lentivirus recombinant.....	65
Quel(s) transgène(s) pour la maladie de Huntington ?.....	68
1. Transfert de gène à visée restauratrice .....	69
2. Transfert de gène à visée neuroprotectrice.....	69
<b>RESULTATS.....</b>	<b>74</b>
<b>GREFFE DE CELLULES PROGENITRICES NERVEUSES IMMORTALISEES DE FAÇON CONDITIONNELLE ET GENETIQUEMENT MODIFIEES POUR SUREXPRESSER LA GLUTAMATE DECARBOXYLASE.....</b>	<b>75</b>
OBJECTIFS.....	75
METHODOLOGIE ET RESULTATS.....	76
DISCUSSION.....	77
PUBLICATION n°1.....	80
<b>TRANSFERT DU GENE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE DANS DES NEURONES DE STRIATUM EN CULTURE PRIMAIRE : EFFET PROTECTEUR VIS-A-VIS DE LA TOXICITE DU GLUTAMATE.....</b>	<b>97</b>
OBJECTIFS.....	97
METHODOLOGIE ET RESULTATS.....	98
DISCUSSION.....	99
PUBLICATION n°2.....	102
<b>TRANSFERT DU GENE DU BDNF ET DU GENE DU GDNF DANS UN MODELE EXCITOTOXIQUE DE LA MALADIE DE HUNTINGTON DEVELOPPE CHEZ LE RAT .....</b>	<b>108</b>
OBJECTIFS.....	108
METHODOLOGIE ET RESULTATS.....	109
DISCUSSION.....	114
PUBLICATION n°3.....	118
<b>CONSTRUCTION DE VECTEURS LENTIVIRAUX RECOMBINANTS POUR LE BDNF ET LE GDNF, EFFET NEUROPROTECTEUR DANS LE MODELE DE LESION STRIATALE INDUITE PAR L'INJECTION SYSTEMIQUE D'ACIDE 3-NITRO-PROPIONIQUE.....</b>	<b>133</b>
CONSTRUCTION DE VECTEURS LENTIVIRAUX.....	133
TRANSFERT DU GENE DU BDNF DANS LE MODELE DE LESION PAR L'ACIDE 3-NITROPROPIONIQUE .....	135
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>138</b>
<b>QUEL TRANSGENE POUR LA MALADIE DE HUNTINGTON ?.....</b>	<b>139</b>
THERAPIE GENIQUE RESTAURATRICE.....	139
THERAPIE GENIQUE NEUROPROTECTRICE.....	141
Transfert d'un gène neuroprotecteur : la superoxyde dismutase.....	141
Transfert de gènes de facteurs neurotrophiques.....	142
CONCLUSION.....	146
<b>QUELLE THERAPIE GENIQUE POUR LES MALADIES NEURODEGENERATIVES ?.....</b>	<b>148</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>153</b>

---

## INDEX DES FIGURES

Figure 1 représentation schématique des principales connexions de la boucle cortex - ganglions de la base - thalamus - cortex chez le rat.....	11
Figure 2 représentation schématique de l'organisation en patchs ou striosomes et matrice des projections cortico-striatale et striato-nigrale chez le rat.....	12
Figure 3 principales voies de production des radicaux libres après stimulation par un acide aminé excitateur .....	31
Figure 4 structure du virion adénoviral.....	59
Figure 5 construction d'un vecteur adénoviral par recombinaison homologue en cellules 293.....	60
Figure 6 construction par triple transfection d'un lentivirus recombinant pseudotypé par VSVG.....	65
Figure 7 effet du transfert des gènes du BDNF et du GDNF sur la lésion induite par l'acide quinolinique : test de "paw reaching" .....	112
Figure 8 effet du transfert des gènes du BDNF et du GDNF sur la lésion induite par l'acide quinolinique : comportement rotatoire induit par l'apomorphine et l'amphétamine .....	113
Figure 9 efficacité fonctionnelle des facteurs trophiques transgéniques produits après transduction par le HIV-BDNF et le HIV-GDNF .....	134
Figure 10 astrocytes embryonnaires de rat en culture après transduction par le HIV-GFP.....	136
Figure 11 greffe d'astrocytes embryonnaires de rats transduits par l'HIV-GFP .....	137

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau n° 1 récapitulatif des maladies neurodégénératives à polyglutamines.....	22
Tableau n° 2 récapitulatif des caractéristiques des principaux vecteurs viraux.....	57
Tableau n° 3 mesure du volume de la lésion induite par l'acide quinolinique à la suite d'une injection intrastriatale d'acide quinolinique : effet neuroprotecteur de l'Ad-GDNF .....	111

---

## AVANT PROPOS

En 1994, lorsque j'ai débuté ce travail de thèse dans le laboratoire de Jacques Mallet, une nouvelle voie s'ouvrait à la recherche de traitements pour les affections neurodégénératives. En effet, plusieurs équipes, dont celle de Jacques Mallet, venaient de démontrer qu'un vecteur dérivé de l'adénovirus recombinant permettait de transférer du matériel génétique *in vivo* dans les neurones, cellules quiescentes par excellence. Le transfert de gène direct à visée thérapeutique devenait donc envisageable pour les pathologies du système nerveux. Au sein du laboratoire, nous avons utilisé l'adénovirus recombinant pour réaliser le transfert de gènes potentiellement thérapeutiques dans des modèles expérimentaux de plusieurs maladies neuro-dégénératives. Je me suis pour ma part consacré à une affection neurodégénérative génétique, la maladie de Huntington. Dans ce contexte, j'ai utilisé des modèles développés chez le rat, et des adénovirus recombinant pour des transgènes ayant un intérêt thérapeutique potentiel dans la maladie de Huntington. Dans un premier temps, j'ai étudié le transfert du gène de la glutamate décarboxylase, dans le but d'analyser son effet restaurateur. Puis, d'autres adénovirus recombinants ont été construits au laboratoire. J'ai utilisé ceux qui présentaient un intérêt thérapeutique dans des modèles de la maladie de Huntington. Je me suis particulièrement intéressé à des transgènes potentiellement neuroprotecteurs, comme la superoxyde dismutase et les facteurs trophiques BDNF et GDNF.

---

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Avant de présenter puis de discuter les résultats qui font l'objet de ce mémoire de thèse, nous nous attacherons à résumer les données de la littérature qui nous ont poussées à entreprendre ce travail.

Dans un premier temps, nous décrirons les caractéristiques de la maladie de Huntington, du tableau clinique, jusqu'aux apports des modèles expérimentaux et des mécanismes moléculaires dans la connaissance du processus physiopathologique de la maladie.

La deuxième partie de cette introduction concernera la description des travaux visant à développer un traitement pour la maladie de Huntington. Après avoir décrit les essais cliniques en cours, nous détaillerons les principes et les méthodes envisagées pour le transfert de gène appliqué aux maladies neurodégénératives, et nous exposerons l'intérêt thérapeutique potentiel de cette méthode pour la maladie de Huntington.

## LA MALADIE DE HUNTINGTON

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire. La neurodégénérescence, qui est restreinte à quelques catégories de neurones du système nerveux central, se traduit par une importante atrophie du striatum. Cette neurodégénérescence entraîne des symptômes moteurs et cognitifs très invalidants qui apparaissent à l'âge adulte et aboutissent invariablement à la mort après une évolution d'une durée moyenne de quinze à vingt ans. La génétique de la maladie se caractérise par une transmission de type autosomique dominante avec une pénétrance complète de la mutation. La proportion de porteurs de la mutation dans la population des pays occidentaux est comprise entre 5 et 10 pour 10.000 personnes.

Dans cette première partie de l'introduction, les aspects cliniques et neuropathologiques de la maladie seront exposés. Puis, dans un deuxième temps nous nous détaillerons les bases moléculaires de la maladie qui, en peu de temps, ont permis de progresser rapidement vers la connaissance du processus neurodégénératif à l'origine de la maladie. Enfin, nous exposerons les fondements des différentes hypothèses permettant d'expliquer le processus neurodégénératif de la maladie de Huntington.

## ASPECTS CLINIQUES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON

### La maladie de Huntington : historique et épidémiologie

#### 1. Historique

La maladie de Huntington a d'abord été connue sous le nom de "chorée". Ce terme, dérivant du latin *chorus* et du grec *choros*, signifiant danse, reste encore aujourd'hui attaché aux symptômes d'origine neurologique se traduisant par des mouvements anormaux et involontaires de grandes amplitudes et pouvant s'apparenter à une danse (Grandmougin *et al.*, 1997).

En 1872, la symptomatologie de la maladie fut décrite avec une grande précision par G. Huntington, un médecin américain exerçant dans l'état de l'Ohio. La qualité de cette description fit que très rapidement on attribua le nom de chorée de Huntington à ce type de chorée héréditaire et survenant chez l'adulte. La description princeps de G. Huntington fait état de trois caractéristiques qui permettent de définir la maladie (Huntington, 1872) :

- La maladie survient chez l'adulte, vers l'âge de 30 à 40 ans et provoque des mouvements involontaires qui peuvent toucher tous les muscles du corps. La maladie se conclut toujours par la mort du patient.

- La maladie entraîne des troubles psychiatriques. Huntington fait état de cas de suicides fréquents, mais aussi d'une détérioration progressive de "l'intelligence" menant jusqu'à la "folie".

- La maladie a une composante héréditaire. Lorsqu'une personne est atteinte, elle transmet la maladie à une partie de sa descendance. Huntington met également en évidence le caractère dominant de la mutation à l'origine de la maladie, puisqu'il rapporte que cette dernière ne peut sauter une génération.

Ainsi, G. Huntington est historiquement le premier à avoir dégagé les trois caractères essentiels de cette maladie, génétique, moteur et psychiatrique.

## 2. Epidémiologie

La mutation qui est à l'origine de la maladie de Huntington a une pénétrance complète, et l'on ne connaît actuellement aucun facteur, environnemental, individuel ou autre, susceptible d'entrer en interaction avec le processus de la maladie. De ce fait, l'épidémiologie de cette pathologie peut se résumer à la prévalence de la mutation dans la population.

La fréquence communément admise pour la maladie est 4 à 7 pour 100.000 dans les populations d'origine caucasienne. On pense que la mutation a une origine européenne (Harper, 1992 ; MacMillan et Harper, 1991). Des études de prévalence ont été effectuées sur d'autres populations et semblent confirmer cette hypothèse. Ainsi, la population finlandaise, qui a une origine génétique différente de la population européenne présente une prévalence très faible (0,5 pour 100.000), et les finlandais atteints par la maladie ont des ascendants provenant de populations où la prévalence est élevée (Ikonen *et al.*, 1992 ; Palo *et al.*, 1987). De même, une étude américaine réalisée en Caroline du Sud (U.S.A.) a montré une prévalence de la maladie cinq fois plus importante pour la population d'origine européenne que pour la population d'origine africaine (Wright *et al.*, 1981). Enfin, une étude réalisée sur la population chinoise de Hong Kong a permis de déterminer une prévalence de 0,4 pour 100.000 (Leung *et al.*, 1992).

Toutes ces études suggèrent que la mutation a une origine européenne. Cependant, les néomutations, bien que rares, sont possibles et pourraient être à l'origine d'une augmentation de la prévalence de la maladie aussi bien dans les populations caucasiennes que non-caucasiennes (Rubinsztein *et al.*, 1994).

## **Description clinique de la maladie de Huntington**

Comme nous le verrons dans la partie suivante, l'anatomopathologie de la maladie de Huntington se caractérise essentiellement par une dégénérescence progressive des neurones du striatum. Cette structure est impliquée dans le contrôle de la motricité volontaire, mais également dans les processus cognitif et émotionnel. Ainsi, les symptômes de la maladie de Huntington sont d'ordre moteur autant que cognitif et psychiatrique. Ces symptômes s'aggravent lentement au cours de la maladie qui évolue sur une quinzaine d'années en moyenne.

### **1. Les symptômes moteurs**

Les troubles moteurs présentés par les personnes atteintes de la maladie de Huntington sont très hétérogènes. Les plus fréquemment rencontrés sont des mouvements anormaux et involontaires de types choréiques qui apparaissent souvent au niveau des extrémités des membres et qui peuvent évoluer jusqu'à concerner l'ensemble du corps. A ces mouvements choréiques, qui sont imprévisibles et explosifs, sont associés d'autres troubles moteurs : une perturbation du contrôle musculaire (dystonie) ou une perte de la coordination des muscles de la face et de la déglutition (dyskinésie oro-faciale) sont fréquentes. Tant que les mouvements choréiques sont de faible amplitude, le patient peut conserver une vie proche de celle qu'il menait avant de débiter la maladie - poursuite d'une activité professionnelle, possibilité de conduire une voiture. Au cours de la maladie, les mouvements choréiques peuvent s'aggraver jusqu'à empêcher la marche. Au contraire, chez d'autres malades, ils peuvent rester discrets jusqu'à la fin de la maladie. A un stade terminal, les mouvements choréiques s'arrêtent fréquemment pour faire place à une hypertonie musculaire (rigidité). Le patient évolue alors vers un stade "akinéto-rigide" ou tout mouvement volontaire est devenu impossible.

Les troubles moteurs peuvent également revêtir la forme d'une rigidité, plus ou moins importante, apparaissant dès le début de la maladie. Ce type de trouble est plus fréquemment observé lorsque la maladie apparaît tôt dans la vie et qu'elle est à évolution rapide.

## 2. Les troubles d'ordre cognitif et psychiatrique

La maladie de Huntington est la plupart du temps associée à une démence de type sous-corticale. Les cas reportés sans aucun signe de démence ne sont pas fréquents et concernent en général des patients chez qui la maladie est survenue tardivement (Behan et Bone, 1977). Cependant, le degré de cette démence est très variable d'un individu à l'autre.

En plus de la démence, la maladie de Huntington est très souvent associée à des troubles psychiatriques. On observe fréquemment des troubles de la personnalité qui se traduisent par une irritabilité et une agressivité des patients. Ce type de troubles marque souvent le début de la maladie. On observe également des troubles de l'humeur qui aboutissent chez de nombreux patients à des épisodes dépressifs sévères. Une étude de 1994 portant sur 110 patients rapporte un changement de personnalité dans 72 % des cas, des épisodes dépressifs dans 39 % des cas, et des troubles de type schizophrénique dans 9 % des cas (Shiwach, 1994)

Il est communément admis que l'apparition de troubles psychiatriques chez une personne à risque pour la maladie de Huntington est le signe avant-coureur de la maladie. Cependant, une étude de 1994, portant sur 93 personnes à risque mais n'ayant pas encore déclarées la maladie, semble infirmer cette hypothèse (Shiwach et Norbury, 1994). Après diagnostic génétique, il est apparu que l'incidence des maladies psychiatriques était la même dans le groupe de personnes hétérozygotes asymptomatiques que dans le groupe de personnes homozygotes normales. Shiwach et Norbury en ont conclu que les épisodes psychiatriques de personnes à risque mais asymptomatiques sont plus le reflet d'un stress dû à la possibilité de développer la maladie qu'un indicateur permettant de prévoir l'apparition de troubles neurologiques (Shiwach et Norbury, 1994).

### 3. Age d'apparition de la maladie

Classiquement, la maladie apparaît au milieu de la vie chez l'adulte jeune vers l'âge de 40 ans. On est donc en présence d'une maladie qui touche des personnes au milieu de leur vie professionnelle et qui, fréquemment, ont des enfants à charge. Il existe cependant des formes juvéniles et infantiles où la maladie apparaît très tôt au cours de la vie. Ces formes représentent environ 5 à 10 % des cas de maladie de Huntington (Roos *et al.*, 1991).

Les formes dites infantiles surviennent avant 10 ans et sont caractérisées par une modification du comportement et du caractère puis par une détérioration cognitive rapide. Les troubles moteurs sont souvent caractérisés par un ralentissement des mouvements volontaires (bradykinésie). L'évolution des formes infantiles est rapide, le décès du patient intervenant la plupart du temps avant l'âge adulte (Turpin, 1993).

Les formes dites juvéniles surviennent entre 10 et 20 ans et sont plus fréquentes que les formes infantiles. Comme ces dernières, elles sont caractérisées par une prépondérance des troubles comportementaux et des symptômes psychiatriques. Cependant, les troubles moteurs sont souvent présents dès le début de la maladie, se traduisent par des mouvements anormaux où prévalent les dystonies et évoluent rapidement vers un tableau akinéto-rigide.

Ces formes infantiles et juvéniles sont caractérisées par une transmission paternelle préférentielle (Roos *et al.*, 1991 ; Turpin, 1993). Comme nous le verrons dans la description des bases moléculaires de la maladie, cela a pu être expliqué par le phénomène d'anticipation (Myers *et al.*, 1982 ; Vegter-van der Vlis *et al.*, 1976).

Après cette brève description des symptômes rattachés à la maladie de Huntington, il apparaît qu'une des caractéristiques de cette maladie est son hétérogénéité. On peut observer des patients avec une détérioration cognitive très importante sans troubles moteurs évidents, et vice-versa. Il faut également garder à l'esprit que les troubles d'ordre cognitifs et psychiatriques sont les plus invalidants pour le malade et les plus difficiles à

gérer pour leur entourage.

Il n'existe aucune thérapeutique spécifique pour la maladie de Huntington. On ne connaît actuellement aucun moyen permettant d'arrêter ou même de ralentir le processus neurodégénératif. Le traitement se limite à l'administration de neuroleptiques qui ont en général une action suspensive très nette sur les mouvements de types choréiques. Enfin, du fait des troubles psychiatriques et cognitifs engendrés par la maladie, le suivi psychologique des patients est très important.

## ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON

La caractéristique neuropathologique principale de la maladie de Huntington est la dégénérescence progressive des neurones GABAergiques de projection du striatum. Afin de mieux cerner ce qu'implique la mort de ces neurones, nous exposerons en premier lieu l'anatomie fonctionnelle des ganglions de la base - auxquels appartient le striatum - puis les différents types neuronaux en présence dans le striatum. Dans un deuxième temps, nous décrirons les caractéristiques neuropathologiques de la maladie et les différences de neurodégénérescence selon le type neuronal striatal.

### **Anatomie fonctionnelle des ganglions de la base en général, et du striatum en particulier**

Les ganglions de la base forment une structure qui est en interaction étroite avec le cortex cérébral. Les noyaux majeurs des ganglions de la base sont le striatum, le pallidum, la substance noire et le noyau sous-thalamique (pour une revue exhaustive, lire Parent et Hazrati, 1995a ; Parent et Hazrati, 1995b). Chez les primates, le striatum est composé de deux parties distinctes, le noyau caudé et le putamen, alors que chez les rongeurs, ces deux parties sont réunies en une seule appelée néostriatum ou simplement striatum (Parent, 1996). Nous exposerons l'anatomie du striatum tel qu'il existe chez le rat, car nous avons utilisé cette espèce pour modéliser la maladie de Huntington.

#### 1. Voies et fonctions des ganglions de la base

Le circuit des ganglions de la base forme une boucle dont le point de départ et le point d'arrivée est le cortex cérébral (figure 1). Au sein de cette boucle, le striatum reçoit

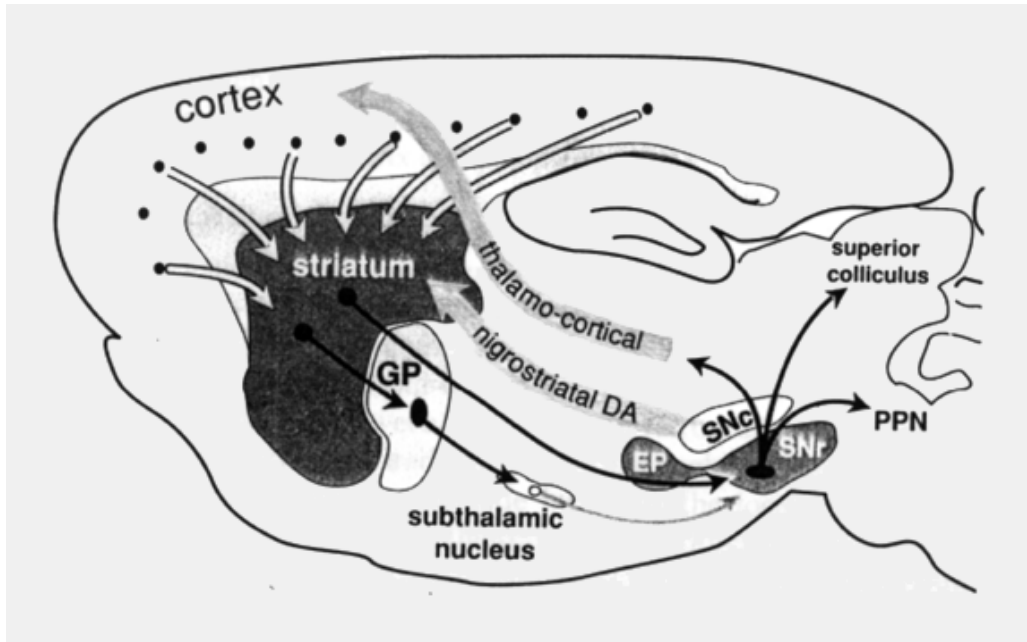


Figure 1 : représentation schématique des principales connexions de la boucle cortex - ganglions de la base - thalamus - cortex chez le rat.

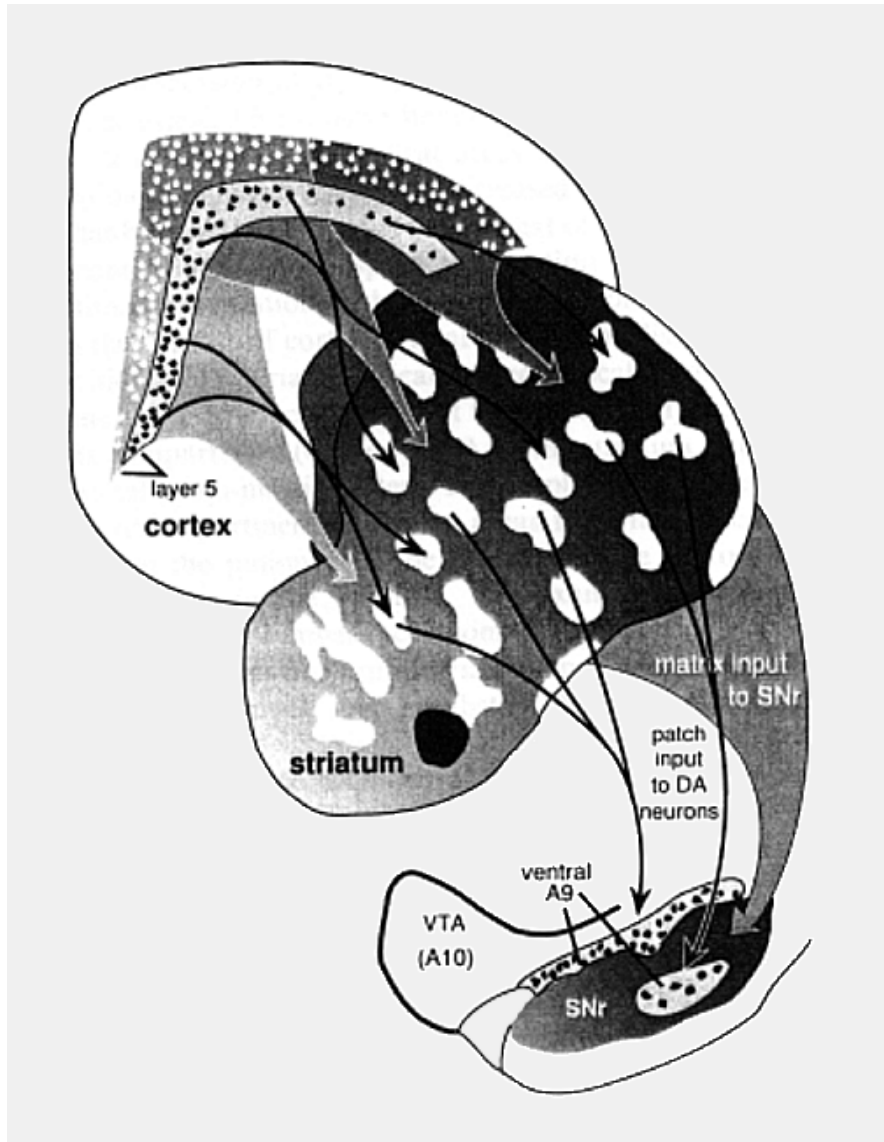
Le striatum est situé au départ de cette boucle et reçoit toutes les afférences glutamatergiques corticales. Les neurones GABAergiques de projection du striatum innervent ensuite la substance noire, soit par une voie directe, soit par une voie indirecte passant par le globus pallidus puis le noyau sous-thalamique. GP : globus pallidus ; SNc / SNr : substance noire pars compacta / pars reticulata (d'après Gerfen, 1992).

toutes les afférences glutamatergiques corticales. Puis la boucle se divise en deux voies GABAergiques, une voie directe du striatum vers la substance noire (projection striato-nigrale), et une voie indirecte, se rendant également dans la substance noire, mais avec deux relais, dans le pallidum en premier lieu (projection striato-pallidale), puis dans le noyau sous-thalamique. A partir de la substance noire, l'information est renvoyée vers le cortex via le thalamus, ce qui permet de fermer la boucle. En plus de cette boucle, il existe au sein des ganglions de la base des voies de rétrocontrôle, dont la principale est la voie dopaminergique nigro-striatale (Gerfen, 1992).

Dans les maladies qui impliquent les ganglions de la base, on observe une détérioration du contrôle moteur (Albin *et al.*, 1989). La maladie de Parkinson, qui résulte de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striatale, entraîne une difficulté à initier des mouvements. La maladie de Huntington, qui quant à elle résulte de la dégénérescence des neurones du striatum, est caractérisée principalement par des mouvements involontaires. Il apparaît donc que les ganglions de la base ont un rôle important dans le contrôle de la motricité. De par leur position anatomique et leurs connexions avec le cortex cérébral, les ganglions de la base participent au contrôle moteur et à certaines tâches cognitives effectués par le cortex (Parent et Hazrati, 1995a ; Parent et Hazrati, 1995b). Cependant le rôle exact des ganglions de la base n'est pas encore totalement déterminé.

## 2. Anatomie fonctionnelle du striatum

C'est au sein du striatum qu'a lieu le premier traitement de l'information provenant du cortex et traversant la boucle des ganglions de la base. Le striatum reçoit des afférences de pratiquement toutes les aires corticales (Kemp et Powell, 1970). Il peut être divisé en deux compartiments définis sur la base de critères neuroanatomiques et neurochimiques. Le premier compartiment est celui des patchs ou striosomes. Il est défini par une faible activité acétylcholine estérase (AChE) (Graybiel et Ragsdale, 1978). Le deuxième compartiment, celui de la matrice, est défini par une forte activité AChE (Graybiel et



*Figure 2 : représentation schématique de l'organisation en patches ou striosomes et matrice des projections cortico-striatale et striato-nigrale chez le rat.*

La partie superficielle de la couche V du cortex innerve le compartiment de la matrice, alors que sa partie profonde innerve le compartiment des striosomes. Les neurones GABAergiques de projection de la matrice striatale innervent les neurones de la substance noire pars reticulata, alors que les neurones de projection du compartiment des striosomes innervent les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta. DA : dopaminergique ; SNr : substance noire pars reticulata (d'après Gerfen, 1992).

Ragsdale, 1978). Il est composé de neurones contenant de la calbindine, une protéine liant le calcium (Gerfen *et al.*, 1985). Cette organisation est le reflet d'un fonctionnement compartimenté du striatum, où les afférences et les efférences diffèrent selon que leur cible ou origine respective est le compartiment des striosomes ou celui de la matrice (pour une revue, lire Gerfen, 1992).

Le compartiment des patchs ou striosomes reçoit des afférences glutamatergiques provenant de la partie profonde de la couche corticale V. Puis, les neurones de ce compartiment innervent les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*. Le compartiment de la matrice, quant à lui, reçoit des afférences glutamatergiques provenant de la partie superficielle de la couche corticale V. Les neurones de ce compartiment envoient leur projection vers les neurones GABAergiques de la substance noire *pars reticulata* (figure 2).

### 3. Les différents types neuronaux du striatum

#### *Les neurones de projection :*

Chez le rat, ils représentent 90 à 95 % de l'ensemble des neurones du striatum (Graveland et DiFiglia, 1985). En raison de la taille moyenne de leur soma (12 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre) et de leur arborisation dendritique présentant de nombreuses épines (Wilson et Groves, 1980), ces neurones ont été baptisés neurones épineux de taille moyenne. Tous ces neurones ont pour neurotransmetteur l'acide gamma-amino-butyrique (GABA), et un certain nombre de neuropeptides. Ainsi, les neurones de la voie directe - projection striato-nigrale - expriment majoritairement la dynorphine et la substance P, alors que les neurones de la voie indirecte - projection striato-pallidale - expriment l'enképhaline ou la substance P (Parent et Hazrati, 1995a ; Steiner et Gerfen, 1998).

#### *Les interneurones :*

Le reste des neurones du striatum, qui représentent 5 à 10 % de la population

neuronale, est composé d'interneurones, c'est-à-dire de neurones dont la terminaison axonale est située dans le striatum. Des études par coloration de Golgi ont démontré que les interneurones du striatum présentent une caractéristique commune, l'absence ou la rareté des épines dendritiques (DiFiglia *et al.*, 1976). Ces neurones non épineux ont été subdivisés en deux catégories selon leur taille, les neurones non épineux de grande taille, et les neurones non épineux de taille moyenne.

*Les interneurones non épineux de grande taille :*

La taille de leur soma est évaluée entre 20 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre (DiFiglia *et al.*, 1976). Ce sont des neurones cholinergiques qui sont caractérisés par l'expression de choline acétyltransférase (ChAT) (Kawaguchi *et al.*, 1995). Ces interneurones ont une arborisation dendritique très étendue, comparativement aux autres interneurones du striatum (Wilson *et al.*, 1990). Chez le rat, ils représentent moins de 2 % de la population neuronale du striatum (Phelps et Vaughn, 1986).

*Les interneurones non épineux de taille moyenne*

Ces interneurones, qui représentent environ 1 à 2 % de la population neuronale du striatum, sont caractérisés par une taille équivalente à celle des neurones de projections, soit 12 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils expriment le GABA et un ou plusieurs neuropeptides qui peuvent être soit la parvalbumine, soit la calrétinine, soit le neuropeptide Y associé à la somatostatine. Cette classe d'interneurones peut être mise en évidence par détection histochimique de la NADPH diaphorase (pour une revue, lire Kawaguchi *et al.*, 1995).

Contrairement à la plupart des structures cérébrales, le striatum contient beaucoup plus de neurones de projection que d'interneurones. Chez le rat, le ratio entre les neurones de projection et les interneurones est de 9:1 pour le striatum. Chez le primate, ce ratio est de 3:1 (Graveland et DiFiglia, 1985). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, la maladie de Huntington entraîne la mort progressive des neurones de projection du striatum. C'est le dysfonctionnement de ces neurones qui serait à l'origine

des symptômes moteurs et cognitifs observés au cours de la maladie de Huntington.

## **Neuropathologie de la maladie de Huntington**

La principale caractéristique neuropathologique de la maladie de Huntington est la dégénérescence du striatum, c'est-à-dire du noyau caudé et du putamen chez l'homme. Les examens macroscopique et microscopique post-mortem de cerveaux de personnes atteintes par la maladie de Huntington ont permis d'établir une échelle de sévérité de la maladie qui est le reflet de la progression des symptômes cliniques (Vonsattel *et al.*, 1985). Cette échelle comprend cinq degrés, du degré zéro au degré 4. Le degré zéro correspond à une maladie de Huntington diagnostiquée, sans que l'examen microscopique du striatum ne révèle d'anomalies évidentes. Au degré 4, qui est le stade ultime de la maladie, le striatum a presque complètement disparu.

### **1. Examen macroscopique**

L'examen de cerveaux post-mortem révèle, chez les personnes atteintes de la maladie de Huntington, une atrophie cérébrale caractérisée par le rétrécissement des circonvolutions, et l'augmentation concomitante des sillons. Cette atrophie, qui est plus marquée au niveau du lobe frontal, peut-être subtile ou sévère selon le stade de la maladie. Ainsi, dans une étude rapportant l'examen de 138 échantillons, les poids moyens des cerveaux était de 1240 grammes pour les degrés 0 et 1, 1140 grammes pour le degré 2, 1120 grammes pour le degré 3, 995 grammes pour le degré 4 alors qu'il est de 1350 grammes pour un cerveau témoin (Vonsattel, 1992).

Une étude réalisée par De La Monte *et al.* et portant sur l'examen macroscopique de sections coronales provenant de trente patients différents a montré une diminution du volume de plusieurs structures, dont le cortex, le thalamus et le striatum (De La Monte *et*

*al.*, 1988). Cette dernière structure est la plus atteinte, avec une diminution de 57 % pour le noyau caudé et une diminution de 64 % pour le putamen. L'examen des ventricules a également montré une augmentation de leur volume, d'autant plus importante que la maladie est avancée. Ainsi, Vonsattel rapporte un volume ventriculaire moyen de 11,7 cm<sup>3</sup> au degré 1, de 15,5 cm<sup>3</sup> au degré 2, de 16,8 cm<sup>3</sup> au degré 3 et de 20,2 cm<sup>3</sup> au degré 4, alors que le volume ventriculaire moyen de cerveaux témoins est de 7 cm<sup>3</sup> (Myers *et al.*, 1988 ; Vonsattel, 1992).

## 2. Examen microscopique

C'est l'examen microscopique qui a permis d'établir les différents degrés de sévérité qui sont le reflet de l'évolution de la maladie (Myers *et al.*, 1988 ; Vonsattel *et al.*, 1985).

Ainsi, le degré 0 correspond à une maladie diagnostiquée de façon certaine, sans que les examens macroscopique et microscopique ne laissent apparaître un signe évident de neurodégénérescence. Seule la tête du noyau caudé peut montrer une perte neuronale.

Au degré 1, l'examen macroscopique reste normal. Par contre, l'examen microscopique révèle un début d'astrocytose et une perte neuronale au sein de la tête du noyau caudé. En effet, à cet endroit, la mortalité des neurones du striatum estimée par comptage cellulaire est d'environ 50 %.

Au degré 2, l'atrophie apparaît de façon évidente pour le noyau caudé et le putamen, alors que le pallidum semble intact. L'astrocytose et la perte neuronale apparaissent sur l'ensemble du noyau caudé et sur la partie dorsale du putamen.

Au degré 3, l'atrophie du striatum est importante, celle du pallidum est plus modérée. Au plan microscopique, une astrocytose apparaît au sein du pallidum.

Au degré 4, le striatum est presque complètement atrophié et le pallidum a perdu la moitié de son volume.

### 3. Sélectivité de la neurodégénérescence au niveau striatal

Les différents types neuronaux présents dans le striatum ne sont pas égaux devant le processus neurodégénératif de la maladie de Huntington. Au cours de la maladie, les neurones de projection disparaissent beaucoup plus rapidement que les interneurons de taille moyenne ou de grande taille (Kowall *et al.*, 1987).

En utilisant la technique histochimique de détection de la NADPH diaphorase, qui permet de mettre en évidence les interneurons non épineux de taille moyenne (Kowall *et al.*, 1987), il a été démontré que ces neurones sont relativement épargnés lors de la maladie. Ainsi, par rapport à la population neuronale totale du striatum, la proportion de neurones NADPH diaphorase positifs, qui est d'environ 2 % dans un striatum normal, passe à 30 % dans les cas avancés de la maladie de Huntington (Ferrante *et al.*, 1985 ; Kowall *et al.*, 1987).

La deuxième classe d'interneurones du striatum, les interneurons non épineux de grande taille, ou cholinergiques, est également relativement préservée lors de la maladie. Cela a été démontré par la détection histochimique de l'acétylcholine estérase (AChE) qui marque les neurones cholinergiques. Grâce à cette technique, il a été démontré que cette classe de neurones est relativement épargnée chez les personnes atteintes par la maladie de Huntington (Ferrante *et al.*, 1987).

Cette augmentation relative de la proportion d'interneurones provoquée par la maladie de Huntington est en fait le reflet de la diminution rapide du nombre de neurones de projection, qui sont les premiers atteints, puis qui meurent progressivement pendant l'évolution de la maladie (Graveland *et al.*, 1985 ; Lange *et al.*, 1976). Au sein de cette population, il y a également des différences selon le site de projection et-ou le ou les neuropeptide(s) exprimé(s) avec le GABA. Une étude portant sur l'examen de cerveaux des degrés 2, 3 et 4 a démontré une perte plus importante des neurones enképhalinergiques projetant vers le segment externe du pallidum ainsi que des neurones

contenant la substance P et projetant vers la substance noire pars reticulata (Albin, 1995 ; Albin *et al.*, 1992 ; Reiner *et al.*, 1988). A contrario, les neurones GABAergiques exprimant la substance P, et projetant vers le segment interne du pallidum ou la substance noire pars compacta, semblent moins sévèrement atteints dans les phases précoces de la maladie.

#### 4. Autres régions atteintes

##### ***Le cortex :***

Cette structure est également très largement touchée lors de la maladie (Vonsattel, 1992). Cela a été démontré à la fois par des études morphométriques (De La Monte *et al.*, 1988 ; Lange *et al.*, 1976) et par comptage cellulaire (Hedreen *et al.*, 1991 ; Sotrel *et al.*, 1991). Les neurones de grande taille de la couche VI sont les plus atteints, mais, bien que moins marquée, on observe également une dégénérescence neuronale dans les couches III et V (Cudkowicz et Kowall, 1990 ; Hedreen *et al.*, 1991 ; Sotrel *et al.*, 1991). Le fait que la mort neuronale au niveau cortical ne corresponde pas exactement aux neurones de la projection cortico-striatale - dont les corps cellulaires sont situés uniquement dans la couche V du cortex - laisse penser qu'elle n'est pas simplement due à un effet rétrograde de la neurodégénérescence striatale mais également à un effet direct du processus neurodégénératif (Sharp et Ross, 1996).

##### ***Le pallidum :***

Au sein de cette structure, on observe une perte neuronale qui semble être en corrélation avec la relative sélectivité de la mort neuronale survenant dans le striatum. En effet, l'atrophie du segment externe du pallidum est fréquente, alors que l'atrophie du segment interne est plus rare (Reiner *et al.*, 1988). Ainsi, on pense que la mort neuronale observée dans le pallidum est principalement due à la perte des afférences striato-pallidales (Reiner *et al.*, 1988).

*Autres régions :*

Une atrophie due à une mort neuronale a été observée dans certaines parties de l'hypothalamus, de l'amygdale et du thalamus (Dom *et al.*, 1976 ; Zech *et al.*, 1986). Cependant, dans ces structures, l'atrophie, lorsqu'elle existe, est faible comparée à celle observée dans le striatum et le cortex.

## BASES MOLECULAIRES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON

### **La mutation responsable de la maladie de Huntington**

#### 1. Historique

Dès 1983, l'équipe de James Gusella avait localisé l'emplacement du gène dont la mutation est responsable de la maladie de Huntington sur le chromosome 4 par analyse de liaison avec un marqueur polymorphique (Gusella *et al.*, 1983). A ce moment, James Gusella pensait que cinq ans au maximum serait nécessaire pour isoler le gène et caractériser la mutation (Morell, 1993). Finalement, la mutation fut identifiée dix ans plus tard, en 1993, par un consortium international, composé de six équipes localisées aux U.S.A., en Grande-Bretagne et au Pays de Galles, et coordonné par James Gusella (The Huntington's Disease Research Collaborative Group, 1993). La recherche très fastidieuse du gène a nécessité la mise en œuvre de nombreuses techniques de génétique moléculaire comme la définition de nouveaux marqueurs génétiques dans la région définie, l'établissement des cartes génétique et physique de cette région, l'établissement de contigs de cette région à l'aide de cosmides et de chromosomes artificiels de levure (The Huntington's Disease Research Collaborative Group, 1993). Finalement, la région impliquée a été réduite à un segment de 2,2 mégabases localisé en 4p16.3 (Bates *et al.*, 1991 ; MacDonald *et al.*, 1989 ; Snell *et al.*, 1992). Au sein de cette région, un fragment de 500 kilobases particulièrement intéressant a été étudié par la technique de capture d'exons, ce qui a permis d'isoler un nouveau gène - baptisé IT15 pour "transcrit intéressant numéro 15" - et contenant une répétition d'une séquence trinuécléotidique CAG anormalement amplifiée chez les personnes atteintes par la maladie de Huntington (The Huntington's Disease Research Collaborative Group, 1993).

Ainsi, la maladie de Huntington rejoignait la famille grandissante des maladies

génétiqes à répétition de triplets. En 1993, lorsque la mutation responsable de la maladie de Huntington a été identifiée, l'amplification anormale d'une séquence trinuéotidique avait déjà été identifiée comme étant la cause de trois maladies génétiques, le syndrome X-fragile (Kremer *et al.*, 1991 ; Verkerk *et al.*, 1991), la dystrophie myotonique (Aslanidis *et al.*, 1992 ; Buxton *et al.*, 1992 ; Harley *et al.*, 1992) et l'atrophie musculaire spino-bulbaire (La Spada *et al.*, 1991).

## 2. Les maladies neurodégénératives à répétitions de triplets

Parmi les maladies génétiques dues à l'expansion d'une répétition de triplets, on peut distinguer deux grands groupes en fonction de l'emplacement de la mutation :

- Dans le premier groupe, la mutation est située dans une région non traduite de l'ARNm et entraîne une perte de fonction. C'est le cas pour le syndrome X-fragile (Kremer *et al.*, 1991) ou pour l'ataxie de Friedriech (Campuzano *et al.*, 1996).

- Dans le deuxième groupe, la mutation est située dans la séquence codante de l'ARNm. Ce groupe contient pour le moment huit maladies répertoriées (tableau n° 1), dont la maladie de Huntington (Hardy et Gwinn, 1998). Il est frappant de remarquer que toutes les maladies de ce groupe possèdent le même type de mutation : la répétition de triplets, dont la longueur est pathologique, a une séquence du type (CAG)*n* et code donc pour un enchaînement de glutamines, ou polyglutamine. On constate également que toutes ces maladies fonctionnent selon un mécanisme dominant qui suggère une mutation du type gain de fonction.

L'étude de la mutation entraînant la maladie de Huntington a démontré que cette dernière est en fait une séquence polymorphe dans la population générale. Le nombre de répétitions CAG est variable d'un individu à un autre sans que cela ait des conséquences pathologiques. Cependant, au-delà d'un certain nombre de répétitions, la chaîne polyglutaminiqne acquiert une propriété pathologique qui entraîne la maladie de Huntington. En 1993, Duyao *et al.* rapportent un seuil pathologique situé entre 35 et 37

répétitions (Duyao *et al.*, 1993), Andrew *et al.* indiquent un seuil de 38 répétitions (Andrew *et al.*, 1993), alors que Snell *et al.* décrivent un recouvrement entre le nombre de répétitions des allèles normaux et des allèles mutés situé aux alentours de 30 (Snell *et al.*, 1993).

En 1994, une étude portant sur un très grand nombre de patients a permis de déterminer le seuil à partir duquel le nombre de répétitions est pathologique (Kremer *et al.*, 1994). Sur les 995 chromosomes étudiés et porteurs de la mutation, le nombre de répétitions était compris entre 36 et 121. Par contre, le nombre de répétitions pour les chromosomes normaux était toujours inférieur à 35, fixant à 36 le nombre de répétitions à partir duquel la chaîne polyglutamique acquiert sa propriété pathologique. Pourtant, le devenir des personnes ayant un nombre de répétitions compris entre 36 et 39 reste incertain. En 1996, Rubinsztein *et al.* rapportent les cas de 10 personnes, comprenant un nombre de répétitions inclus dans cette fourchette et âgées de 67 à 95 ans, mais ne présentant aucun signe de la maladie (Rubinsztein *et al.*, 1996). Au contraire, certains auteurs précisent que la plupart des personnes présentant un nombre de répétitions compris entre 36 et 39 développent la maladie.

Ce type de mécanisme, où le nombre de répétitions est polymorphe et doit dépasser un certain seuil pour devenir pathologique, a pu être démontré pour les autres maladies à polyglutamines (Hardy et Gwinn, 1998).

L'étude de la mutation de la maladie de Huntington chez un grand nombre de patients a permis de mettre en évidence une autre caractéristique de ce type de mutation : il existe une forte corrélation inverse entre l'âge d'apparition des premiers symptômes et le nombre de triplets CAG (Andrew *et al.*, 1993 ; Duyao *et al.*, 1993 ; Snell *et al.*, 1993). Ainsi les formes juvéniles de la maladie correspondent à un nombre élevé de répétitions, en général supérieur à 50 (Telenius *et al.*, 1993).

Cependant, le nombre de répétition pour un individu donné ne permet pas de prédire l'âge de début de la maladie. Bien que les études statistiques montrent une forte corrélation entre l'âge d'apparition des symptômes et le nombre de répétitions, il apparaît également que, pour un nombre de répétitions donné, l'âge de début peut varier de

manière très significative d'un individu à un autre (Duyao *et al.*, 1993). Ceci est d'autant plus vrai que le nombre de répétitions est proche du seuil pathologique, c'est-à-dire compris entre 37 et 52. Néanmoins, dans le cas des formes juvéniles, le nombre de répétitions est toujours beaucoup plus important (Duyao *et al.*, 1993).

<b>maladie :</b>	<b>liaison :</b>	<b>Gène :</b>	<b>pathologie :</b>
maladie de Huntington	chromosome 4	IT15	inclusions
DRPLA	chromosome 12	Atrophine 1	inclusions
SCA1	chromosome 6	Ataxine 1	inclusions
SCA2	chromosome 12	Ataxine 2	
SCA3 (MJD)	chromosome 14	Ataxine 3	inclusions
SCA6	chromosome 19	CACNL1A4	
SCA7	chromosome 3	SCA7	inclusions
SBMA	X	AR	inclusions

Tableau n° 1 : récapitulatif des maladies neurodégénératives à polyglutamines (d'après Hardy et Gwinn, 1998). DRPLA : dentatorubral and pallidolusian atrophy ; SCA : spino-cerebellar ataxia ; MJD : Machado-Joseph disease ; SBMA : spino-bulbar and muscular atrophy.

### 3. Le phénomène d'anticipation

Bien avant la découverte du gène et de sa mutation, une aggravation des symptômes et un âge de début plus précoce au cours des générations avaient été remarqués dans les familles atteintes par la maladie de Huntington. Ce phénomène est appelé anticipation. Dès 1976, Vegter-van der Vlis *et al.* rapportent que l'âge de décès moyen est le même pour deux générations successives lorsque l'on considère les

personnes qui ont reçu l'allèle muté de leur mère. Cependant, si l'on prend en considération les personnes qui ont reçu l'allèle muté de leur père, l'âge de décès moyen est de deux ans inférieur à celui de leur parent affecté (Vegter-van der Vlis *et al.*, 1976). Les auteurs expliquent cette différence par le fait que la plupart des formes juvéniles recensées dans cette étude provenaient d'une transmission paternelle de la mutation.

En 1982, une étude menée par Myers *et al.* a confirmé ce phénomène d'anticipation (Myers *et al.*, 1982). L'étude de 95 familles a démontré un âge d'apparition des symptômes plus jeune au cours des générations lorsque l'allèle muté est hérité du père. De plus, sur neuf formes juvéniles observées lors de cette étude, sept étaient d'ascendance paternelle.

Avec la découverte du gène, le phénomène d'anticipation a pu recevoir une explication. L'étude d'ADN extrait du sperme de patients a démontré que le nombre de répétitions est très instable lors de la spermatogenèse (Duyao *et al.*, 1993). De plus, cette instabilité est d'autant plus élevée que le nombre de répétitions de départ est grand (Leeflang *et al.*, 1995). En résumé, lorsque l'allèle est transmis par la mère, le nombre de répétitions peut augmenter ou décroître, en moyenne de quatre répétitions, avec une légère tendance à l'augmentation. Par contre, lorsque l'allèle est hérité du père, l'expansion de la répétition est beaucoup plus fréquente et peut aller jusqu'à un doublement de la taille de cette dernière (Albin et Tagle, 1995 ; Trottier *et al.*, 1994).

Le phénomène d'anticipation a également été étudié d'un point de vue phylogénétique. Par comparaison de la longueur des répétitions dans des populations humaines différentes et dix espèces de primates, une étude a montré que les allèles humains dérivent d'un gène ancestral commun (Rubinsztein *et al.*, 1994). Les auteurs de cette étude proposent un modèle expliquant l'expansion de la répétition par un biais mutationnel d'où la sélection naturelle est absente. A l'aide de simulations informatiques, ils prédisent un accroissement de la prévalence de la maladie de Huntington dans la population générale.

## Apports de la génétique moléculaire à la compréhension du mécanisme pathologique

En 1993, la découverte du gène contenant la mutation responsable de la maladie de Huntington a suscité un grand espoir pour la compréhension du mécanisme à l'origine de la neurodégénérescence. Six ans plus tard, la fonction de la protéine codée par IT15 n'est toujours pas connue et le rôle exact des polyglutamines dans la mort neuronale n'est pas compris. Cependant, les nombreuses études menées sur l'expression du gène IT15 ont permis de progresser dans la connaissance du processus pathologique.

### 1. Patron d'expression du gène IT15

Le gène IT15 code pour une protéine qui a été baptisée huntingtine. L'article original décrivant le gène IT15 rapporte une taille de 11 kilobases pour l'ARNm et prédit une taille de 3144 aminoacides et 348 kDa pour la huntingtine (The Huntington's Disease Research Collaborative Group, 1993). Cette protéine ne présente aucune homologie avec une protéine déjà connue. La taille d'environ 350 kDa a pu être vérifiée par la suite en western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de la huntingtine (Aronin *et al.*, 1995 ; Jou et Myers, 1995 ; Sharp *et al.*, 1995 ; Trottier *et al.*, 1995).

Après la découverte du gène, les premières expériences entreprises afin de comprendre le mécanisme pathologique de la maladie de Huntington ont eu pour but de caractériser le patron d'expression du gène IT15. Ces expériences ont mis en évidence une expression très étendue du gène IT15. En dehors du système nerveux, l'ARNm correspondant au gène IT15 a été détecté dans le cœur, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les reins, le pancréas, les ovaires, les testicules (Li *et al.*, 1993 ; Strong *et al.*, 1993). Dans le système nerveux central, IT15 est également largement exprimé, aussi bien dans les cellules gliales que dans les neurones, avec tout de même une prépondérance neuronale (Li *et al.*, 1993 ; Strong *et al.*, 1993). De plus, le striatum ne fait pas partie des régions comme l'hippocampe ou la couche granulaire du cervelet, où l'expression de IT15

est la plus forte. Dans ces deux dernières régions, la forte expression observée pourrait en fait être un artéfact dû à la forte densité neuronale (Strong *et al.*, 1993).

La mise au point d'anticorps spécifiques de la huntingtine a rapidement permis d'étudier l'expression de IT15 sur le plan protéique. Ces anticorps ont permis de démontrer que la huntingtine est présente dans les cellules où l'expression du gène IT15 avait été détectée (Aronin *et al.*, 1995 ; DiFiglia *et al.*, 1995 ; Jou et Myers, 1995 ; Sharp *et al.*, 1995 ; Trottier *et al.*, 1995). Concernant le système nerveux central, il semble que la huntingtine soit présente à différents niveaux d'expression dans tous les neurones (DiFiglia *et al.*, 1995 ; Sharp *et al.*, 1995). Ces études ont également montré que la chaîne polyglutaminique est présente dans la protéine (Aronin *et al.*, 1995 ; DiFiglia *et al.*, 1995 ; Jou et Myers, 1995 ; Trottier *et al.*, 1995).

Enfin, dans le striatum, la huntingtine n'est pas exprimée à un taux plus important que dans le reste du cerveau. Dans le cas de la protéine mutée, plusieurs groupes ont montré que son expression semble plus faible que celle de la protéine non mutée (Aronin *et al.*, 1995 ; Schilling *et al.*, 1995 ; Trottier *et al.*, 1995). Cependant, en comparant l'expression de la huntingtine avec celle d'une protéine présente dans les neurones de projection du striatum, Schilling *et al.* ont montré que la chute d'expression observée dans le striatum de malade est équivalente pour les deux protéines (Schilling *et al.*, 1995). Les auteurs en concluent que la chute d'expression de la huntingtine mutée au niveau striatale n'est pas due à un effet direct de la mutation, mais est plutôt une conséquence de la disparition des neurones.

Il est donc apparu clairement que la sélectivité de la mort cellulaire dans la maladie de Huntington, où seuls certains neurones centraux sont atteints, n'est pas la conséquence d'une expression très régionalisée du gène IT15. Cette constatation a renforcé l'hypothèse du gain de fonction, où la protéine mutée acquiert une nouvelle caractéristique, délétère uniquement pour les neurones qui dégénèrent.

## 2. Hypothèse du gain de fonction

Plusieurs faits suggèrent que la mutation du gène IT15 entraîne un gain de fonction.

La transmission de la maladie se fait sur un mode dominant qui est souvent associé à un gain de fonction. De plus, les patients homozygotes pour l'allèle mutée présentent une symptomatologie très semblable aux patients hétérozygotes (Wexler *et al.*, 1987).

Les premières études visant à modéliser la maladie de Huntington par les techniques de transgénèse ont eu pour but d'inactiver l'homologue murin de IT15. Une telle inactivation a été entreprise par trois équipes différentes, et a conduit à l'observation d'un phénotype létal à l'état embryonnaire (Duyao *et al.*, 1995 ; Nasir *et al.*, 1995 ; Zeitlin *et al.*, 1995). Ces études ont permis d'une part d'établir que l'expression du gène IT15 joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire, et d'autre part de confirmer l'hypothèse du gain de fonction, puisque, sauf dans un cas (Nasir *et al.*, 1995), les souris hétérozygotes ne présentaient pas de phénotype particulier. L'hypothèse du gain de fonction confirmée, il apparaissait donc comme nécessaire de générer des lignées transgéniques exprimant la protéine mutée pour obtenir un modèle génétique de la maladie de Huntington.

## 3. Agrégation de la huntingtine mutée

Les premières évidences de formation d'agrégats par la huntingtine mutée ont été apportées par des expériences menées sur des souris transgéniques. G. Bates et son équipe ont développé plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant l'exon 1 du gène IT15 humain contenant un nombre variable de répétitions CAG, compris entre 116 et 156 (Mangiarini *et al.*, 1996). Il est apparu que ces souris présentent plusieurs caractéristiques phénotypiques ressemblant à la maladie de Huntington : apparition des symptômes entre 9 et 10 semaines après la naissance, tremblements, mouvements involontaires soudains et

d'une grande amplitude, amaigrissement, aggravation progressive de la maladie conduisant à la mort en une à deux semaines (Mangiarini *et al.*, 1996). En utilisant des anticorps dirigés contre la huntingtine, afin de détecter le patron d'expression de la huntingtine mutée transgénique, l'équipe de G. Bates a pu mettre en évidence qu'elle forme des agrégats que l'on retrouve uniquement dans les noyaux des neurones (Davies *et al.*, 1997). Davies *et al.* décrivent ces agrégats comme une inclusion nucléaire circulaire, marquée de façon intense - par les anticorps anti-huntingtine - et présente en un exemplaire unique dans pratiquement tous les neurones du striatum (Davies *et al.*, 1997). Les agrégats sont également très présents dans d'autres neurones, comme ceux du cortex, du cervelet ou de la moelle épinière, et ils contiennent, en plus de la huntingtine mutée, de l'ubiquitine. Depuis, la présence d'inclusions dans les modèles transgéniques de la maladie, exprimant une partie ou la totalité de la huntingtine mutée a été confirmée par de nombreuses équipes (Hodgson *et al.*, 1999 ; Martindale *et al.*, 1998 ; Ordway *et al.*, 1997 ; Reddy *et al.*, 1998 ; Schilling *et al.*, 1999).

Chez les malades, la présence d'agrégats nucléaires anormaux avait été notée dès 1979 (Roizin *et al.*, 1979). Cependant, pour plusieurs raisons, ces agrégats n'avaient pas suscité un grand intérêt. D'une part, cette étude qui avait été menée sur des biopsies n'a pu être reproduite en utilisant des échantillons post mortem, la microscopie électronique demandant une très bonne préservation des tissus (Davies *et al.*, 1997). D'autre part, le fait que ces agrégats contiennent la huntingtine mutée n'était pas connu, et n'a été mis en lumière qu'avec l'étude des modèles transgéniques. Quelques semaines après la publication des inclusions intranucléaires chez les souris transgéniques (Davies *et al.*, 1997), la présence d'inclusions composées de huntingtine mutée dans les neurones corticaux et striataux de personnes atteintes de la maladie de Huntington a été confirmé (DiFiglia *et al.*, 1997). Ces auteurs ont démontré que ces inclusions sont fortement corrélées au processus pathologique : on les observe uniquement dans les neurones concernés par le processus de neurodégénérescence, c'est-à-dire ceux du striatum et du cortex, et ils sont absents des cerveaux contrôles et présymptomatiques (DiFiglia *et al.*, 1997). L'utilisation d'anticorps

anti-huntingtine spécifiques de différentes parties de la protéine a permis de démontrer que seule sa partie N-terminale, contenant la chaîne polyglutaminique entre dans la formation des agrégats (DiFiglia *et al.*, 1997 ; Li et Li, 1998 ; Martindale *et al.*, 1998). De plus, la fréquence des inclusions dépend de la longueur de la chaîne polyglutaminique (Li et Li, 1998 ; Martindale *et al.*, 1998), ce qui milite en faveur d'une implication de ces inclusions dans le processus pathologique de la maladie - plus la chaîne polyglutaminique est longue, plus le nombre d'inclusions est grand, et plus la maladie apparaît tôt.

La présence d'agrégats de protéine mutée, ou d'un fragment de cette protéine contenant la mutation, a été rapportée pour la plupart des maladies génétiques à répétition de triplets (tableau n° 1 ; Bates *et al.*, 1998 ; Price *et al.*, 1998). La présence de ces agrégats a également été rapportée dans des modèles *in vitro* obtenus par transfection d'une séquence codant pour une chaîne polyglutaminique (Lunkes et Mandel, 1998 ; Saudou *et al.*, 1998). Cependant, la toxicité éventuelle de ces inclusions neuronales nucléaires reste controversée. Il a été démontré, dans deux modèles différents, qu'une protéine contenant une chaîne polyglutaminique de longueur anormale induit la mort de la cellule lorsqu'elle est transloquée dans le noyau, sans qu'il y ait obligatoirement formation d'inclusions nucléaires (Klement *et al.*, 1998 ; Saudou *et al.*, 1998). Ainsi, la question du rôle des agrégats de protéine mutée dans les maladies génétiques à répétitions de triplets reste posée. Ces derniers pourraient aussi bien être directement toxiques pour la cellule, qu'être le résultat d'un processus de détoxification de la protéine mutée ayant lieu dans le noyau (Sisodia, 1998).

## HYPOTHESES CONCERNANT LE MECANISME DE MORT CELLULAIRE

Le mécanisme physiopathologique conduisant à la mort neuronale qui survient lors de la maladie de Huntington n'est toujours pas connu de façon exacte. Cependant, l'étude des modèles de la maladie et du processus pathologique chez l'homme permet de dégager trois hypothèses principales qui sont l'excitotoxicité, le dysfonctionnement du métabolisme énergétique et la mort par apoptose. Au premier abord, il pourrait sembler que ces trois hypothèses sont exclusives. Ce n'est pourtant pas le cas, et il apparaît maintenant que l'association de ces trois mécanismes pourrait expliquer la dégénérescence des neurones de projections du striatum.

### **L'hypothèse excitotoxique**

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des mammifères. Il peut se lier à une grande diversité de récepteurs de types canaux ioniques, entraînant une dépolarisation et l'excitation neuronale qui, lors du fonctionnement normal de la synapse, est transitoire. Lorsque l'activation du récepteur est excessive ou prolongée, la cellule cible - celle qui porte le récepteur - peut être endommagée et mourir. Ce phénomène porte le nom d'excitotoxicité.

#### 1. Les excitotoxines

Depuis longtemps, l'excitotoxicité a été proposée comme un des mécanismes impliqués dans le processus neurodégénératif de la maladie de Huntington. L'origine de cette hypothèse excitotoxique remonte aux travaux de Coyle et Schwarcz et de McGeer et McGeer, qui ont remarqué que l'injection de kaïnate, un agoniste glutamatergique, dans le

striatum de rat entraîne une lésion présentant des similitudes avec certains aspects histologiques et neurochimiques de la maladie de Huntington (Coyle et Schwarcz, 1976 ; McGeer et McGeer, 1976). Depuis, il a été montré que d'autres agonistes glutamatergiques, comme l'acide iboténique, sont capables de reproduire des caractéristiques de la maladie de Huntington. Du fait de leur mécanisme d'action à la fois excitateur et toxique, ces molécules ont été appelées "excitotoxines". Leur utilisation permet de développer des modèles expérimentaux de la maladie. A l'aide de ces modèles, les différentes stratégies thérapeutiques envisagées pour la maladie de Huntington peuvent être testées (DiFiglia, 1990). Ainsi, l'un des modèles parmi les plus utilisés actuellement est l'injection intrastriatale d'acide quinolinique, un agoniste du récepteur *N*-Méthyl-D-Aspartate (NMDA). Cette excitotoxine provoque la mort des neurones GABAergiques de projection tout en épargnant relativement les interneurones cholinergiques ou exprimant la somatostatine ainsi que les fibres de passage (Beal *et al.*, 1991 ; Beal *et al.*, 1986).

Le fait que le striatum, principale cible de la neurodégénérescence, reçoive une innervation glutamatergique abondante en provenance du cortex a milité en faveur de l'hypothèse excitotoxique dans la maladie de Huntington. Il a été suggéré que le taux intrastriatal endogène de glutamate pourrait être toxique chez les patients (DiFiglia, 1990). Les travaux récents concernant la huntingtine n'ont pas totalement remis en cause l'hypothèse excitotoxique. La fonction toxique de la huntingtine mutée pourrait passer par une activation secondaire d'un phénomène excitotoxique aboutissant à la mort des neurones GABAergiques du striatum qui sont particulièrement riches en récepteurs au glutamate (Petersen *et al.*, 1999 ; Sharp et Ross, 1996). Des essais cliniques reposant sur cette hypothèse sont en cours. Leur but est d'obtenir une neuroprotection grâce à des agents pharmacologiques, comme le riluzole, capable de réduire la neurotransmission glutamatergique et, par voie de conséquence, de contrecarrer le phénomène excitotoxique (Doble, 1999 ; Kiebertz, 1999). Les résultats d'un premier essai clinique impliquant le riluzole suggèrent que cette drogue aurait un effet sur les symptômes moteurs de types choréiques provoqués par la maladie (Rosas *et al.*, 1999).

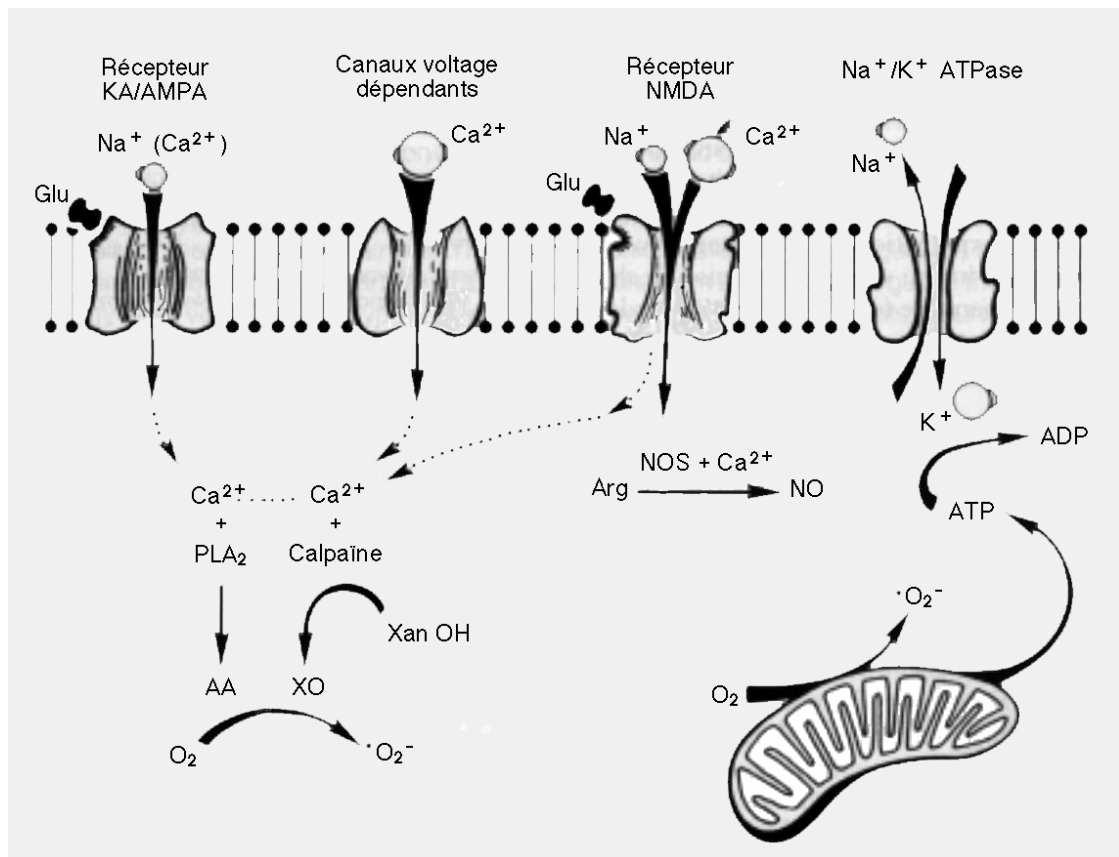


Figure 3 : principales voies de production des radicaux libres après stimulation par un acide aminé exciteur.

Suite à l'activation des récepteurs glutamatergiques, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et/ou la consommation d'ATP provoque la formation de radicaux libres dans la cellule. Abréviations :  $\text{PLA}_2$ , phospholipase  $\text{A}_2$ ; AA, acide arachidonique; Xan DH, xanthine déhydrogénase; XO, xanthine oxydase; NOS, NO synthétase; NO, nitric oxide (d'après Coyle et Puttfarcken, 1993).

striatum de rat entraîne une lésion présentant des similitudes avec certains aspects histologiques et neurochimiques de la maladie de Huntington (Coyle et Schwarcz, 1976 ; McGeer et McGeer, 1976). Depuis, il a été montré que d'autres agonistes glutamatergiques, comme l'acide iboténique, sont capables de reproduire des caractéristiques de la maladie de Huntington. Du fait de leur mécanisme d'action à la fois excitateur et toxique, ces molécules ont été appelées "excitotoxines". Leur utilisation permet de développer des modèles expérimentaux de la maladie. A l'aide de ces modèles, les différentes stratégies thérapeutiques envisagées pour la maladie de Huntington peuvent être testées (DiFiglia, 1990). Ainsi, l'un des modèles parmi les plus utilisés actuellement est l'injection intrastriatale d'acide quinolinique, un agoniste du récepteur *N*-Méthyl-D-Aspartate (NMDA). Cette excitotoxine provoque la mort des neurones GABAergiques de projection tout en épargnant relativement les interneurones cholinergiques ou exprimant la somatostatine ainsi que les fibres de passage (Beal *et al.*, 1991 ; Beal *et al.*, 1986).

Le fait que le striatum, principale cible de la neurodégénérescence, reçoive une innervation glutamatergique abondante en provenance du cortex a milité en faveur de l'hypothèse excitotoxique dans la maladie de Huntington. Il a été suggéré que le taux intrastriatal endogène de glutamate pourrait être toxique chez les patients (DiFiglia, 1990). Les travaux récents concernant la huntingtine n'ont pas totalement remis en cause l'hypothèse excitotoxique. La fonction toxique de la huntingtine mutée pourrait passer par une activation secondaire d'un phénomène excitotoxique aboutissant à la mort des neurones GABAergiques du striatum qui sont particulièrement riches en récepteurs au glutamate (Petersen *et al.*, 1999 ; Sharp et Ross, 1996). Des essais cliniques reposant sur cette hypothèse sont en cours. Leur but est d'obtenir une neuroprotection grâce à des agents pharmacologiques, comme le riluzole, capable de réduire la neurotransmission glutamatergique et, par voie de conséquence, de contrecarrer le phénomène excitotoxique (Doble, 1999 ; Kiebertz, 1999). Les résultats d'un premier essai clinique impliquant le riluzole suggèrent que cette drogue aurait un effet sur les symptômes moteurs de types choréiques provoqués par la maladie (Rosas *et al.*, 1999).

## 2. Rôle des radicaux libres dans le processus excitotoxique

Depuis longtemps, on sait que le phénomène d'excitotoxicité entraîne une accumulation de radicaux libres dans la cellule (pour une revue, lire Coyle et Puttfarcken, 1993). La stimulation par les acides aminés excitateurs peut aboutir à la formation de radicaux libres par trois voies distinctes :

- l'activation des récepteurs glutamatergiques (NMDA et AMPA) provoque une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Cette augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induit l'activation, d'une part, de la phospholipase  $\text{A}_2$  ce qui initie la cascade métabolique de l'acide arachidonique, et d'autre part, de protéases qui vont produire de la xanthine oxydase. Ces deux voies vont aboutir à la formation de l'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Figure 3).

- Suite à la dépolarisation, les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase vont consommer de l'ATP pour rétablir les concentrations de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{K}^+$  de part et d'autre de la membrane plasmique. Cette consommation d'ATP va aboutir, dans la mitochondrie, à une augmentation de la phosphorylation oxydative et à une fuite d'ions superoxyde du métabolisme mitochondrial (Figure 3).

- Enfin l'augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  active la nitrique oxyde synthase (figure 3), ce qui aboutit à la formation d'oxyde nitrique (NO) capable de réagir rapidement avec l'ion superoxyde pour former du peroxynitrite qui se décomposera en radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) :



Une fois générés, les radicaux libres, dont le plus toxique d'entre eux est  $\text{OH}^{\bullet}$ , s'attaquent aux protéines, aux acides nucléiques, et surtout aux lipides membranaires. Parmi ces derniers, les acides gras poly-insaturés, qui sont présents en proportion importante dans le cerveau, sont très vulnérables. Leur réaction avec le radical hydroxyle aboutit à la formation de liaisons covalentes inter-acide gras, ce qui rigidifie les membranes puis les casse et entraîne la mort de la cellule.

Des études menées sur des modèles *in vitro* et animaux ont permis de confirmer que les radicaux libres, qui entraînent le stress oxydatif, pourraient être impliqués dans la maladie de Huntington. *In vitro*, sur un modèle de culture nerveuse primaire, il a été démontré que la toxicité due à une hyperactivation du récepteur NMDA est médiée par l'ion superoxyde, via la libération d'acide arachidonique (Lafon-Cazal *et al.*, 1993), et par le NO, un radical libre qui est le produit de la NO synthase (Dawson *et al.*, 1993). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la NO synthase neuronale, le 7-nitroindazole, permet d'atténuer significativement les lésions induites par des excitotoxines dans le striatum de rat (Schulz *et al.*, 1995a). Cela semble confirmer une implication des radicaux libres dans la maladie de Huntington, comme un événement secondaire du stress excitotoxique (Beal, 1996).

### 3. Excitotoxicité et modèles transgéniques

Des lignées de souris transgéniques exprimant une partie ou la totalité de la huntingtine mutée ont été créées (Hodgson *et al.*, 1999 ; Mangiarini *et al.*, 1996 ; Reddy *et al.*, 1998 ; Schilling *et al.*, 1999). Ces lignées ont permis des avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Huntington. Leur étude a notamment contribué à mettre en évidence les inclusions neuronales nucléaires de huntingtine mutée (Davies *et al.*, 1997). Rapidement, il s'est avéré que ces lignées transgéniques permettent de reproduire bon nombre des caractéristiques de la maladie de Huntington : inclusions neuronales nucléaires, durée de vie réduite, symptômes moteurs, amaigrissement et réduction de la taille du cerveau. Cependant, dans les lignées qui ont fait l'objet des premières publications, il n'y a pas d'évidence claire de dégénérescence neuronale (Davies *et al.*, 1997 ; Mangiarini *et al.*, 1996). Cela suggère que dans ces lignées, il existe un dysfonctionnement neuronal sans perte cellulaire et laisse supposer que leur utilisation pour tester des thérapies expérimentales est hasardeuse.

Une étude publiée récemment s'est intéressée au processus excitotoxique chez ces souris transgéniques (Hansson *et al.*, 1999). De façon surprenante, les souris transgéniques

ne sont pas sensibles à l'injection intrastriatale d'acide quinolinique alors que les animaux sauvages de la même portée le sont. Ce résultat semble en contradiction avec l'hypothèse d'une mort cellulaire par excitotoxicité dans la maladie de Huntington. Pourtant, il faut garder à l'esprit que dans cette étude, d'une part les lésions par l'acide quinolinique ont été réalisées sur des animaux présymptomatiques, et d'autre part, bien que ces souris développent des symptômes moteurs, une mort cellulaire est difficilement détectable (Davies *et al.*, 1997 ; Mangiarini *et al.*, 1996). On peut donc penser que chez ces souris transgéniques un mécanisme de résistance, induit par la sensibilité excessive conférée par l'expression de la huntingtine mutée, est mis en œuvre par les neurones du striatum. Ce mécanisme pourrait alors permettre aux neurones de résister à un choc excitotoxique aigu comme l'injection d'acide quinolinique.

#### 4. Excitotoxicité et protéines interagissant avec la huntingtine

Expliquer le mécanisme pathologique par une interaction anormale entre la huntingtine et une autre protéine est une idée séduisante : elle permet de prendre en compte l'hypothèse du gain de fonction, puisque seule la huntingtine mutée devrait entrer en jeu dans l'interaction anormale ; elle expliquera aussi le caractère discret de la maladie, l'interaction anormale n'ayant lieu que dans les neurones concernés par le processus de neurodégénérescence. Plusieurs équipes ont donc recherché des protéines capables d'interagir spécifiquement avec la huntingtine mutée. Ainsi, en 1996 Bao *et al.* montrent que la huntingtine mutée interagit indirectement avec la calmoduline, par le biais d'une autre protéine qui n'a pu être isolée (Bao *et al.*, 1996). De par sa capacité à lier l'ion calcium, la calmoduline pourrait intervenir dans le processus excitotoxique, ce qui permettrait de relier ce mécanisme à la mutation du gène IT15.

L'utilisation du système double hybride, qui permet de cribler une banque sur le critère d'interactions protéine/protéine, a permis d'isoler des ADNc codant pour des protéines interagissant avec la huntingtine mutée. En particulier, il a été montré une interaction avec la cystathionine beta-synthase (CBS) (Boutell *et al.*, 1998). La CBS a pour

substrat l'homocystéine qui possède elle même des métabolites, comme l'homocystéate, connus pour leur action excitotoxique.

Un autre argument a renforcé l'hypothèse excitotoxique pour expliquer le processus neurodégénératif de la maladie de Huntington. En effet, une baisse du métabolisme énergétique, qui pourrait être occasionnée par la huntingtine mutée, peut provoquer une susceptibilité accrue des neurones de projection du striatum au stress excitotoxique.

### **Modèles impliquant un dysfonctionnement du métabolisme énergétique**

#### 1. Chute du métabolisme énergétique chez les patients

Les premières preuves de l'implication d'une baisse du métabolisme énergétique dans la maladie de Huntington proviennent d'observations faites par tomographie par émission de positons. Dès 1982, Kuhl *et al.* rapportent une baisse du métabolisme du glucose au niveau du noyau caudé et du putamen, mais pas dans le reste du cerveau, chez les personnes atteintes par la maladie de Huntington (Kuhl *et al.*, 1982). En utilisant la même technologie de détection du métabolisme du glucose par tomographie par émission de positons, Kuwert *et al.* ont étendu ce résultat au cortex, où ils ont également mesuré une baisse de l'utilisation du glucose chez les patients (Kuwert *et al.*, 1990). De plus cette étude, qui a été effectuée sur 23 patients, suggère une corrélation entre la baisse d'utilisation du glucose et la sévérité de la maladie. Cela a été confirmé par Grafton *et al.* qui ont pu montrer que la baisse du métabolisme du glucose précède les manifestations cliniques de la maladie (Grafton *et al.*, 1990). Cette dernière observation suggère que la baisse du métabolisme énergétique est potentiellement à l'origine de la maladie et pas un phénomène secondaire dû à la perte neuronale.

L'hypothèse d'un dysfonctionnement du métabolisme énergétique au niveau striatal a également été appuyée par plusieurs études portant sur des échantillons post-mortem. En effet, une baisse de l'activité de la succinate déshydrogénase, le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, a été démontrée dans le striatum des personnes atteintes de la maladie de Huntington (Brennan *et al.*, 1985 ; Browne *et al.*, 1997 ; Gu *et al.*, 1996 ; Tabrizi *et al.*, 1999).

L'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire a permis de confirmer ces résultats. La baisse du métabolisme énergétique observée par cette technique est non seulement corrélée au stade de la maladie, mais également au nombre de triplets CAG (Jenkins *et al.*, 1993 ; Jenkins *et al.*, 1998).

Ces données expérimentales ont conduit à l'hypothèse d'excitotoxicité indirecte pour expliquer le processus neurodégénératif de la maladie de Huntington. Selon cette hypothèse, la baisse du métabolisme énergétique, qui se traduit par une diminution de la concentration intracellulaire en ATP, entraîne une baisse de l'activité des pompes membranaires  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . En conséquence, après une dépolarisation, la repolarisation de la membrane se fait moins bien. Cela aboutit à une baisse du potentiel de membrane qui empêche le blocage voltage dépendant du canal NMDA par l'ion  $\text{Mg}^{2+}$ . Le taux physiologique de glutamate extracellulaire devient alors suffisant pour entraîner une hyperactivation des récepteurs NMDA et une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui aboutit à la mort par excitotoxicité (pour une revue, lire Beal, 1994).

## 2. L'acide 3-nitropropionique

L'hypothèse d'excitotoxicité indirecte secondaire à une baisse du métabolisme énergétique a été renforcée par des observations faites en Chine et rapportant le développement de syndrome choréique chez des enfants ayant ingéré des friandises contaminées par de l'acide 3-nitropropionique (3-NP) (Ludolph *et al.*, 1991). Par la suite, il a

été démontré que l'intoxication chronique par le 3-NP, qui est un inhibiteur irréversible de la succinate déshydrogénase ou complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, aboutit à des lésions du striatum qui reflètent ce qui se passe lors de la maladie de Huntington (pour une revue, lire Brouillet *et al.*, 1999).

Les travaux de l'équipe de Beal ont montré que l'injection systémique répétée de 3-NP chez le rat entraîne une neurodégénérescence qui, dans un premier temps, est restreinte au striatum (Beal *et al.*, 1993). Au sein de cette structure, on observe une dégénérescence des neurones de taille moyenne ; par contre, les neurones de grande taille, ainsi que les afférences dopaminergiques et les fibres de passage sont préservées (Beal *et al.*, 1993 ; Guyot *et al.*, 1997a ; Wullner *et al.*, 1994). De plus, les neurones GABAergiques de projection présentent des anomalies typiques de la maladie de Huntington : on observe une augmentation de la densité des épines dendritiques ainsi qu'un recourbement anormal des extrémités de ces dendrites (Beal *et al.*, 1993). Enfin, la sensibilité du striatum du rat au 3-NP dépend de l'âge de l'animal : en réponse à la même dose de toxine, le volume de la lésion augmente avec l'âge de l'animal, les adultes jeunes (4 mois) étant beaucoup plus sensibles que les pré-adultes (1 mois) (Brouillet *et al.*, 1993).

Depuis, la caractérisation du modèle de maladie de Huntington obtenu par intoxication systémique chronique par le 3-NP a été affinée. Une baisse de performance dans le test d'évitement passif, une diminution de l'activité locomotrice spontanée, des anomalies de la marche et une bradykinésie ont été observées chez le rat lésé (Borlongan *et al.*, 1995 ; Guyot *et al.*, 1997a ; Koutouzis *et al.*, 1994). De plus, le modèle a été développé chez le primate. L'équipe de P. Hantraye, à Orsay, a montré que l'intoxication chronique de macaques ou de babouins reproduit les caractéristiques anatomo-pathologiques de la maladie, mais également les symptômes moteurs, puisque l'on observe chez ces animaux des dystonies et des dyskinésies des membres inférieurs qui apparaissent spontanément (Brouillet *et al.*, 1995 ; Palfi *et al.*, 1998). En plus de ces symptômes moteurs, des tests fonctionnels ont permis de mettre en évidence une altération cognitive de type frontal chez ces animaux (Palfi *et al.*, 1996). Enfin, il a été montré chez le rat qu'une inhibition partielle de la succinate déshydrogénase par le 3-NP est suffisante pour provoquer la mort

des neurones de projections du striatum, comme c'est le cas dans la maladie de Huntington (Brouillet *et al.*, 1998).

Plusieurs évidences suggèrent que le dysfonctionnement du métabolisme énergétique provoqué par le 3-NP induit une augmentation intracellulaire de la concentration en radicaux libres. L'utilisation d'un inhibiteur de la NO synthase neuronale, le 7-nitroindazole, permet d'atténuer significativement les lésions induites par le 3-NP dans le striatum de rat (Schulz *et al.*, 1995a). Beal *et al.* rapportent que les lésions induites par le 3-NP sont atténuées de manière significative chez des souris transgéniques surexprimant la superoxyde dismutase, l'enzyme qui permet la détoxification de l'ion superoxyde (Beal *et al.*, 1995). Ainsi, la formation excessive de radicaux libres pourrait être impliquée dans la maladie de Huntington comme un évènement secondaire du stress métabolique (Beal, 1996).

L'intoxication chronique par le 3-NP fournit donc un modèle convaincant de la maladie de Huntington, puisque l'on y retrouve ces principales caractéristiques : vulnérabilité spécifique du striatum, influence de l'âge, symptômes moteurs et cognitifs, dégénérescence préférentielle des neurones GABAergiques de projection du striatum, chute partielle de l'activité de la succinate déshydrogénase. Ce modèle permet de tester de nouvelles approches thérapeutiques. Il suggère également qu'une baisse du métabolisme énergétique, même modérée, due à la huntingtine mutée pourrait être à l'origine du processus neurodégénératif de la maladie de Huntington (Brouillet *et al.*, 1998).

3. Protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et interagissant avec la huntingtine

En 1996, Burke *et al.* démontrent qu'une enzyme de la voie de la glycolyse, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), est capable d'interagir avec la huntingtine et avec la protéine dont la mutation est responsable de l'atrophie dentatorubrale et pallidolusienne (DRPLA) (Burke *et al.*, 1996).

Si elle se confirme, l'interaction de la huntingtine mutée avec la GAPDH permettrait d'expliquer le dysfonctionnement du métabolisme énergétique survenant lors de la maladie de Huntington. Cependant, toutes les interactions décrites entre la huntingtine et d'autres protéines ont été déterminées dans des conditions non physiologiques - expérience *in vitro* ou système double hybride. Même si certaines des protéines isolées de cette manière semblent avoir un rapport avec les hypothèses concernant le mécanisme physiopathologique de la maladie, les interactions devront être mises en évidence chez les patients.

## **Rôle de l'apoptose dans le processus neurodégénératif**

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme de mort cellulaire qui permet à l'organisme d'éliminer les cellules surnuméraires lors du développement embryonnaire normal. L'apoptose est caractérisée par une relative préservation des organelles de la cellule et une fragmentation internucléosomale de l'ADN (Bredesen, 1995).

### 1. Mise en évidence de l'apoptose

Plusieurs études ont démontré la présence de mort par apoptose dans la maladie de Huntington. La technique de TUNEL (terminal transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling) permet de mettre en évidence la fragmentation de l'ADN et a été utilisée pour détecter la neurodégénérescence sur des échantillons post-mortem et dans des modèles expérimentaux de la maladie. La présence de neurones marqués par cette technique a pu être démontrée dans le striatum et le cortex des patients (Dragunow *et al.*, 1995 ; Portera-Cailliau *et al.*, 1995). Cette technique permet également de mettre en évidence une fragmentation de l'ADN dans le modèle excitotoxique de la

maladie obtenu par injection intrastriatale d'acide quinolinique chez le rat (Portera-Cailliau *et al.*, 1995).

Les études menées grâce aux différents modèles transgéniques de la maladie semblent confirmer l'implication de l'apoptose dans le processus neurodégénératif de la maladie de Huntington.

*In vitro*, par transfection de culture primaire de neurones striataux par un fragment du gène IT15 portant 17 ou 68 répétitions CAG, il a été montré que la chaîne polyglutaminique de grande taille entraîne une mort par apoptose de ces neurones (Saudou *et al.*, 1998).

*In vivo*, certaines lignées de souris transgéniques sont sujettes à une dégénérescence neuronale striatale. C'est le cas des lignées développées par Reddy *et al.*, qui expriment un ADNc du gène IT15 contenant 48 ou 89 répétitions CAG (Reddy *et al.*, 1998). De plus, la technique de TUNEL permet de mettre en évidence une fragmentation de l'ADN dans le striatum et l'hippocampe de ces lignées (Reddy *et al.*, 1998). L'apoptose semble également impliquée dans le processus de neurodégénérescence intervenant dans une autre lignée de souris transgéniques qui portent la totalité du gène IT15 contenant 72 répétitions (Hodgson *et al.*, 1999). En effet, l'étude en microscopie électronique de la morphologie des neurones du striatum de ces souris montre des caractéristiques, comme la dilatation de l'appareil de Golgi, le rétrécissement du noyau et la condensation de la chromatine, qui suggèrent un processus apoptotique (Hodgson *et al.*, 1999).

Il faut cependant garder à l'esprit que la technique de TUNEL et l'étude de la morphologie neuronale ne permettent pas d'impliquer de manière certaine l'existence d'un processus apoptotique dans la maladie de Huntington ou dans ces modèles. Toutefois, l'étude des modèles transgéniques et des protéines interagissant avec la huntingtine ont permis de renforcer l'hypothèse de l'apoptose en démontrant l'implication d'une famille de protéines pro-apoptotiques, les caspases.

## 2. Implication des caspases

Les caspases sont des protéases cystéine et aspartyl spécifiques qui jouent un rôle dans le processus apoptotique (pour une revue, lire Thornberry et Lazebnik, 1998). En fait, les caspases sont considérées comme des exécutants de l'apoptose, elles interviennent une fois que cette dernière a été déclenchée, par exemple par un stress excitotoxique ou une augmentation des radicaux libres (Holtzman et Deshmukh, 1997). L'étude des modèles transgéniques de la maladie de Huntington développés *in vitro* et *in vivo* semble indiquer que les caspases joueraient un rôle dans le processus neurodégénératif de cette pathologie.

La première protéine de la famille des caspases à avoir été impliquée dans le processus physiopathologique de la maladie de Huntington est la caspase-3. Saudou *et al.* ont montré qu'un inhibiteur de la caspase-3 est capable de prévenir l'apoptose dans le modèle de neurones de striatum en culture primaire transfectés par la séquence codante de la huntingtine mutée (Saudou *et al.*, 1998). Il a été montré que la huntingtine est clivée par la caspase-3, à la fois dans un modèle *in vitro* utilisant de la huntingtine et de la caspase-3 purifiées, et dans un modèle cellulaire obtenu par transfection de cellules COS par la séquence codante de la huntingtine (Goldberg *et al.*, 1996). De plus, l'expansion de la répétition CAG augmente la vitesse de clivage de la huntingtine (Goldberg *et al.*, 1996). Cela suggère que la caspase-3 pourrait provoquer la libération d'un fragment protéique toxique par clivage de la huntingtine mutée.

Sanchez *et al.* rapportent que la transfection de neurones primaires par un plasmide codant une chaîne polyglutaminique de taille pathologique provoque l'activation de la caspase-8, ce qui entraîne la mort par apoptose (Sanchez *et al.*, 1999). *In vivo*, la même étude suggère la présence de caspase-8 activée, détectée par la technique de Western blot, dans le noyau caudé de patients (Sanchez *et al.*, 1999).

Ona *et al.* ont étudié la caspase-1. Ils rapportent une activation de cette protéine à la fois dans un modèle transgénique de la maladie et chez les patients (Ona *et al.*, 1999). De plus, ils démontrent que l'injection intracérébroventriculaire d'un inhibiteur des caspases permet de ralentir la progression de la maladie et d'allonger la durée de vie des souris de

la lignée transgénique développée par l'équipe de G. Bates (Ona *et al.*, 1999).

Toutes ces données indiquent que le processus apoptotique prend une part importante dans la mort cellulaire survenant lors de la maladie de Huntington. Il apparaît de plus en plus clairement que les caspases sont impliquées dans le processus physiopathologique de la maladie. Cette implication pourrait aussi bien être causale, comme le suggère le clivage de la huntingtine par la caspase-3, que secondaire à l'activation d'un processus apoptotique.

De la même manière, le niveau auquel intervient l'apoptose n'est pas clairement établi. Le mécanisme apoptotique pourrait être impliqué de façon directe, par exemple du fait d'une activation des caspases par la huntingtine mutée, ou être un phénomène secondaire à un stress excitotoxique ou métabolique dû à la huntingtine mutée (Sharp et Ross, 1996).

### **Conclusion : vers la "découverte" d'un traitement ?**

La découverte du gène IT15 et de la mutation qui lui est associée dans la maladie de Huntington a permis de progresser rapidement dans la connaissance de la pathologie de cette maladie. Il a été démontré que le fragment N-terminal de la protéine mutée forme des agrégats, appelés inclusions neuronales nucléaires, dans les neurones atteints lors de la maladie et chez les animaux transgéniques (Davies *et al.*, 1997 ; DiFiglia *et al.*, 1997). Ces agrégats sont retrouvés principalement dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme (DiFiglia *et al.*, 1997). Bien que l'on ne sache pas si ces agrégats sont toxiques ou non, il semble que la protéine mutée agisse au sein du noyau pour déclencher le processus qui conduit à la mort neuronale (Saudou *et al.*, 1998). Ce processus pourrait passer par l'activation des caspases par la chaîne polyglutaminique, ce qui aboutirait à une mort par

apoptose.

Il est vraisemblable que l'étude des modèles de la maladie de Huntington permettra, dans un avenir proche, l'élucidation de son processus physiopathologique. Ainsi, même si ce processus n'est pas totalement connu, on commence à avoir une idée assez précise des mécanismes qui sont en cause. Partant de la connaissance de ces mécanismes, il est possible d'explorer les voies qui permettraient d'aboutir à un traitement de la maladie de Huntington. On peut par exemple envisager de diminuer les taux intracellulaires de radicaux libres pour lutter contre l'excitotoxicité, ou apporter des facteurs trophiques exogènes pour lutter contre le processus apoptotique. Ces stratégies thérapeutiques, ainsi que leurs raisons d'être sont exposées dans la partie suivante de cette introduction.

## **THERAPIES EXPERIMENTALES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON**

Bien qu'il n'existe pas de thérapie effective pour la maladie de Huntington, les stratégies pour la mise au point d'un traitement sont nombreuses. Il est envisagé entre autres :

- Le remplacement par greffe des neurones qui dégènèrent.
- L'utilisation d'agents capables d'arrêter le processus neurodégénératif.
- D'empêcher l'expression de l'allèle muté, soit au niveau de l'ADN - inhibition de la transcription -, soit au niveau de l'ARNm - inhibition de la traduction.

L'étude de ces stratégies thérapeutiques a été rendue possible grâce à la mise au point de modèles de la maladie obtenu par voies pharmacologique ou transgénique. Dans cette deuxième partie nous décrirons les différentes stratégies thérapeutiques, en détaillant les possibilités de traitement par transfert de gène de la maladie de Huntington, travail qui est l'objet de cette thèse.

## ESSAIS THERAPEUTIQUES EN COURS DANS LA MALADIE DE HUNTINGTON

Quelle que soit la forme de traitement envisagé pour la maladie de Huntington, on peut diviser en deux groupes principaux les stratégies thérapeutiques qui sont à l'étude :

- Il existe des stratégies dites de restauration dont le but est de remplacer, à l'aide de greffes de cellules, les neurones qui ont dégénéré au cours de la maladie. Les cellules greffées pourraient être des cellules striatales embryonnaires, des cellules souches ou des cellules modifiées génétiquement.

- A contrario, il existe des stratégies neuroprotectrices, ou conservatrice, où l'objectif est d'arrêter ou de ralentir le processus neurodégénératif. Ce type de stratégie est envisageable grâce à l'évolution lente de la maladie, qui permet d'intervenir à un stade précoce. Grâce au diagnostic génétique précoce de la maladie, on peut même imaginer une intervention avant l'apparition des symptômes. Afin de mettre en œuvre une telle stratégie, des agents ayant un effet bénéfique sur les neurones GABAergiques de projection du striatum ont été identifiés à l'aide des modèles expérimentaux de la maladie.

### **Grefe de cellules striatales embryonnaires**

La greffe de cellules striatales embryonnaires est considérée depuis longtemps comme une stratégie prometteuse pour les maladies neurodégénératives où la perte cellulaire est très localisée. C'est le cas de la maladie de Huntington, mais aussi celui de la maladie de Parkinson qui est due à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. Pour cette dernière, les modèles expérimentaux ont permis de démontrer que la greffe de cellules fœtales dans le striatum de rat déplété en dopamine permet d'obtenir une récupération fonctionnelle (pour une revue, lire Björklund *et al.*, 1994a ; Brundin *et al.*, 1994). Le striatum est la seule cible des neurones dopaminergiques

qui dégénèrent lors de la maladie de Parkinson. Cela permet de greffer directement dans le striatum les neurones dopaminergiques d'origine embryonnaire pour obtenir une récupération.

Le cas de figure de la maladie de Huntington est plus complexe. Les neurones GABAergiques de projection du striatum font partie d'un circuit neuronal très organisé et forment un relais entre le cortex et le globus pallidus, d'une part, et entre le cortex et la substance noire pars reticulata, d'autre part (voir 1ère partie, page 10). Le but de la stratégie restauratrice est de reconstruire ce circuit à l'aide de greffes intrastriatales de neurones d'origine embryonnaire.

### 1. Bases expérimentales

Au début des années 80, Deckel *et al.*, puis Isacson *et al.* rapportent que, chez le rat, la greffe intrastriatale de cellules striatales embryonnaires permet de diminuer très sensiblement les effets neurochimiques et moteurs d'une lésion excitotoxique (Deckel *et al.*, 1983 ; Isacson *et al.*, 1984). Depuis, de nombreuses études ont permis de caractériser l'effet des greffes de cellules embryonnaires dans les modèles expérimentaux de la maladie (pour une revue, lire Björklund *et al.*, 1994b). Grâce à des tests comportementaux, il a été démontré que ces greffes permettent d'obtenir une récupération fonctionnelle (Dunnett *et al.*, 1988 ; Emerich *et al.*, 1991 ; Isacson *et al.*, 1986). Les travaux menés par Wictorin *et al.*, utilisant des marquages antérogrades et rétrogrades, ont montré que les neurones striataux embryonnaires greffés reçoivent des afférences du cerveau hôte (Wictorin et Björklund, 1989 ; Wictorin *et al.*, 1988). De plus les cellules greffées sont capables d'innover le globus pallidus du cerveau hôte (Wictorin *et al.*, 1989a). Enfin ces fibres afférentes et efférentes sont capables de former des synapses fonctionnelles (Wictorin *et al.*, 1989b ; Wictorin *et al.*, 1990).

Par la suite, des études du même type ont été entreprises chez le primate afin de caractériser l'effet des greffes de cellules striatales embryonnaires dans un modèle toujours expérimental, mais plus proche de la maladie telle que l'on peut l'observer chez

l'homme. Une intégration de la greffe, ainsi qu'un effet fonctionnel ont pu être obtenus chez le primate, en utilisant des neurones embryonnaires originaires de la même espèce (Palfi *et al.*, 1998), mais également avec des neurones d'origine murine (Hantraye *et al.*, 1992). L'utilisation de primates a permis la mise en œuvre de tests comportementaux plus fins que chez le rongeur, ce qui a révélé que l'amélioration due à la greffe est non seulement d'ordre moteur, mais également sensible sur le plan cognitif (Palfi *et al.*, 1998).

Enfin, la faculté des cellules striatales embryonnaires humaines à se comporter comme ses homologues prélevés chez le rat ou le primate a été vérifiée. Naimi *et al.* ont démontré que les cellules humaines provenant de l'éminence ganglionnaire latérale - la structure embryonnaire précurseur du striatum - donnent naissance à une greffe d'aspect striatal lorsqu'elles sont transplantées dans le striatum de rat (Naimi *et al.*, 1996). Ainsi, l'accumulation de toutes ces données expérimentales permet de penser que la greffe de cellules striatales embryonnaires pourrait permettre de reformer le circuit du noyau caudé et du putamen chez les patients. Cela a conduit à l'initiation d'essais cliniques (Peschanski *et al.*, 1995).

## 2. Essais cliniques en cours

Des tentatives de neurotransplantations intrastriatales chez des patients sont menés dans plusieurs pays (Kopyov *et al.*, 1998 ; Madrazo *et al.*, 1993). Pour l'instant ces études indiquent que le protocole de neurotransplantation utilisé ne semble pas dangereux pour le malade (Kopyov *et al.*, 1998). Les greffes ne semblent pas entraîner des améliorations spectaculaires chez les patients, mais il faut souligner que pour ces deux études, l'évaluation des malades ne permet pas une appréciation fiable. Il a donc fallu mettre en place une échelle d'évaluation très sensible, le CAPIT-HD, permettant de détecter des effets, même mineurs (Quinn *et al.*, 1996).

Sur la base de cette échelle d'évaluation, un essai clinique, mené en collaboration par les équipes de P. Césaro, P. Hantraye et M. Peschanski, est en cours à l'hôpital Henri Mondor de Créteil.

### 3. Limites de la stratégie de neurotransplantation

Même si l'on arrive à mettre en évidence une amélioration des patients après un protocole de greffe intrastriatale, différentes considérations incitent à la prudence.

Dans un premier temps, on peut se demander si, à très long terme, les greffes ne risquent pas d'être rejetées. De plus, bien que cela n'ait jamais été observé après une greffe de cellules fœtales d'origine neurale, un processus de tumorigénèse ne peut pas être exclu a priori, ce qui serait dramatique pour le patient.

Ensuite, l'utilisation de cellules d'origine embryonnaire suscite de nombreuses interrogations d'ordre éthique qui sont encore loin d'être résolues. Les embryons utilisés proviennent d'interruption volontaire de grossesse, et, bien que très minoritaire, une partie de la population reste farouchement opposée à ce genre d'intervention. De plus les cellules utilisées pour les greffes sont évidemment prélevées sur le cerveau des embryons, organe qui, dans l'imaginaire collectif, est le siège de l'esprit. Cela apparaît donc beaucoup moins anodin de greffer des neurones qu'un cœur ou un poumon.

Enfin, et c'est peut-être le problème principal, la disponibilité des cellules destinées aux greffes n'est pas illimitée. Cela est d'autant plus vrai que d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson pourraient bénéficier d'un tel traitement. Il semble donc difficile que tous les malades puissent un jour bénéficier d'un tel traitement, qui serait alors réservé aux personnes à un stade avancé de la maladie et-ou réfractaires aux autres traitements éventuels.

La solution pourrait provenir de l'utilisation de cellules alternatives, disponible en grande quantité, et dont l'utilisation poserait moins de problèmes éthiques. On envisage en particulier d'utiliser des cellules embryonnaires provenant d'animaux génétiquement proches de l'homme et faciles à élever, comme le porc (Isacson et Breakefield, 1997). On envisage également l'utilisation de cellules souches ou progénitrices humaines, qui

pourraient être multipliées presque indéfiniment *in vitro* avant d'être greffées et d'acquérir le phénotype requis pour remplir la fonction manquante. Pouvoir contrôler la différenciation de ces cellules souches est un des défis actuels de la recherche thérapeutique (pour une revue, lire Svendsen et Smith, 1999).

## Traitements pharmacologiques de la maladie de Huntington

Comme nous l'avons rapporté plus haut, le processus physiopathologique provoquant la neurodégénérescence lors de la maladie de Huntington est encore mal connu. Cependant, les modèles expérimentaux ont permis de suggérer l'implication de différents mécanismes capables d'entraîner la mort cellulaire. Parmi ceux-ci, l'excitotoxicité, l'atteinte du métabolisme énergétique, le stress oxydatif et l'apoptose sont les plus sérieux candidats. On peut donc envisager un traitement médicamenteux de la maladie de Huntington ayant pour but de bloquer un ou plusieurs de ces mécanismes sans connaître exactement le processus pathologique de la maladie.

### 1. Agents anti-excitotoxicité

Actuellement, le riluzole et le rémacémide, deux molécules ayant des propriétés anti-excitotoxiques connues, sont en cours d'essais cliniques pour la maladie de Huntington.

Le riluzole est une molécule à effet anti-glutamatergique qui entraîne une diminution de la réponse post-synaptique des neurones GABAergiques de projections du striatum en réponse au glutamate (Centonze *et al.*, 1998). Une neuroprotection par le riluzole a pu être mise en évidence dans le modèle de la maladie de Huntington obtenu par intoxication chronique de rat par le 3-NP (Guyot *et al.*, 1997b ; Palfi *et al.*, 1997). Sur

cette base, un essai clinique a été réalisé (Rosas *et al.*, 1999). Ce dernier a montré que le riluzole permet de diminuer les symptômes de type choréique, sans pour autant permettre une amélioration globale. Cet essai a été réalisé sur des patients dont la maladie évoluait déjà depuis plusieurs années, et ne peut donc pas rendre compte d'un effet neuroprotecteur éventuel du riluzole, les patients n'ayant été traités que pendant six semaines.

Le rémacémide est un agent qui bloque spécifiquement le canal ionique du récepteur NMDA. Il pourrait de ce fait protéger les neurones sensibles au stress excitotoxique médié par ce récepteur. Un premier essai clinique, de même nature que celui décrit précédemment pour le riluzole, a été entrepris (Kieburtz *et al.*, 1996). Il a permis d'établir la bonne tolérance du médicament par les patients. Actuellement, un essai clinique de grande ampleur qui permettra d'établir l'intérêt thérapeutique du rémacémide est en cours (Kieburtz, 1999).

Cet essai thérapeutique a également pour but de tester une autre molécule, le coenzyme Q10, qui intervient sur le métabolisme énergétique.

## 2. Le coenzyme Q10

Comme nous l'avons vu précédemment, une baisse du métabolisme énergétique dans les neurones GABAergiques de projection du striatum pourrait favoriser un phénomène d'excitotoxicité secondaire qui entraînerait la mort de la cellule. Cette hypothèse suggère qu'un agent pharmacologique permettant de rétablir le bon fonctionnement du métabolisme énergétique pourrait avoir un effet neuroprotecteur dans le cas de la maladie de Huntington (Beal, 1994). Dans cette optique, le coenzyme Q10, qui est un cofacteur essentiel de la chaîne du transport d'électrons, est considéré comme un agent thérapeutique potentiel (Beal, 1994). Les premiers essais cliniques ont montré une bonne tolérance du médicament chez les patients, mais sans amélioration des symptômes (Feigin *et al.*, 1996). Cependant, des données obtenues par imagerie fonctionnelle ont

permis de montrer que, au niveau cortical, le coenzyme Q10 permet d'abaisser le taux de lactate qui augmente de façon anormale chez les patients (Beal et Matthews, 1997 ; Koroshetz *et al.*, 1997).

L'essai clinique de grande ampleur, concernant également le rémacémide et portant sur 340 patients, permettra d'évaluer les capacités neuroprotectrices du coenzyme Q10 dans la maladie de Huntington.

### **Conclusion : vers la thérapie génique**

Les stratégies thérapeutiques qui sont en cours d'essais cliniques semblent donc présenter des limitations.

Bien que les études réalisées sur les modèles expérimentaux de la maladie permettent d'envisager des résultats prometteurs, la greffe de cellules striatales embryonnaires risque de rester une technique peu répandue, principalement à cause de la limitation en cellules disponibles pour la greffe. De plus cette stratégie s'adresse plus particulièrement aux personnes dont la maladie est à un stade avancé, pour lequel un traitement neuroprotecteur n'est plus indiqué.

Pour ce qui est des essais médicamenteux, l'efficacité des molécules actuellement en cours de test est pour l'instant incertaine. Une étude portant sur l'effet du riluzole dans un modèle de la maladie induit par l'acide 3-nitropropionique chez le primate suggère que cette molécule à un effet symptomatique, mais peu ou pas de vertu neuroprotectrice (Palfi *et al.*, 1997).

On connaît pourtant d'autres composés qui ont un effet neuroprotecteur sur les neurones GABAergiques de projection du striatum ou qui sont capables de contrecarrer le stress cellulaire induit par des processus excitotoxiques ou de baisse du métabolisme énergétique. Les facteurs neurotrophiques, ou les enzymes de détoxification des radicaux

libres ont ce type d'effets. L'obstacle principal à leur utilisation pour une application clinique est leur mode d'administration, qui doit être local, à la fois pour obtenir une efficacité maximale et pour éviter les effets secondaires. A cause de la barrière hématoencéphalique, l'administration *in situ* d'une protéine devrait s'effectuer par injection directe dans le cerveau, et cela pendant plusieurs années. Cela paraît difficilement envisageable, c'est pourquoi on recherche des modes d'administration alternatifs de ces protéines. Le plus prometteur de ces modes d'administration alternatif est le transfert de gène.

## THERAPIE GENIQUE ET MALADIE DE HUNTINGTON

L'objectif d'un traitement par thérapie génique de la maladie de Huntington est d'apporter *in situ* un gène codant une protéine apportant un bénéfice thérapeutique. Dans un premier temps, nous exposerons le principe de la thérapie génique et résumerons l'état actuel des recherches menées sur le transfert de gènes thérapeutiques appliqué au système nerveux. Puis, nous décrirons les facteurs envisagés pour la maladie de Huntington, ainsi que les vecteurs de transfert de gène utilisés dans le cerveau, en nous attardant plus particulièrement sur ceux qui ont fait l'objet de ce travail de thèse.

### **Thérapie génique : généralités**

#### 1. Principe et champ d'application de la thérapie génique

Le principe au sens large de la thérapie génique est le transfert, dans des cellules ou des tissus, de matériel génétique dans un but thérapeutique. Pour atteindre ce but, plusieurs stratégies, que l'on peut classer en trois catégories principales, sont mises en œuvre. La première consiste à apporter un gène qui va remplacer une fonction déficiente, comme dans le cas de la mucoviscidose (Crystal, 1995). C'est ce type de stratégie qui est le plus souvent envisagé pour les maladies génétiques impliquant une perte de fonction. Une seconde stratégie consiste à introduire un gène qui apportera une nouvelle fonction aux cellules transduites, leur permettant ainsi de contrecarrer le processus pathologique de la maladie. Enfin, une troisième stratégie envisageable serait d'intervenir au niveau transcriptionnel ou traductionnel, en introduisant un gène capable d'empêcher l'expression d'une fonction délétère pour la cellule.

Le transfert de matériel génétique se fait grâce à un vecteur qui peut revêtir

plusieurs formes, qui seront exposées plus loin. Le matériel génétique peut être introduit directement dans les cellules cibles, par injection du vecteur dans l'organisme. On parle alors de transfert de gène direct ou *in vivo*. Alternativement, le matériel génétique peut être introduit dans des cellules en culture qui seront ensuite greffées chez le malade. Ces cellules se comporteront alors comme des pompes biologiques capables de libérer *in situ* une protéine thérapeutique. On parle dans ce cas de transfert de gène indirect ou *ex vivo*.

Le premier essai clinique, débuté en 1990, a concerné une maladie génétique due à une déficience en adénosine déaminase (Blaese *et al.*, 1995). Depuis, il y a plus de 300 essais cliniques en cours. Ils concernent des maladies génétiques dans 16 % des cas, mais également le cancer (69 % des cas) et le SIDA (11 % des cas) (Anderson, 1998). Plusieurs enseignements peuvent être tirés de ces essais cliniques. En premier lieu, il apparaît que le champ d'application de la thérapie génique n'est pas confiné aux maladies génétiques, mais concerne également un grand nombre de pathologies acquises, l'ensemble représentant un nombre considérable de patients. Ensuite, les essais cliniques déjà effectués font état de très peu d'effets secondaires, la thérapie génique semble donc présenter relativement peu de risques pour les patients. Enfin, il apparaît que la principale limitation de la thérapie génique est le transfert de gène proprement dit : actuellement, les protocoles de transfert de gène utilisés pour les essais cliniques ne permettent pas l'obtention d'une expression suffisamment forte ou prolongée du transgène, nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique (Anderson, 1998). Le succès de la thérapie génique passe donc par la mise au point d'un vecteur permettant, chez l'homme, une transduction efficace des cellules et une bonne expression du transgène à long terme, tout en restant sûr pour le patient.

## 2. Les vecteurs permettant le transfert de gène

Un grand nombre de vecteurs permettant le transfert de gène ont été développés,

---

ou sont encore en cours de développement ou d'amélioration. Nous décrirons dans cette partie les principaux vecteurs utilisés actuellement, qui peuvent être divisés en deux groupes principaux : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux.

Les vecteurs non-viraux sont basés sur l'utilisation de molécules d'ADN recombinant du type vecteur d'expression. Ces vecteurs peuvent être utilisés tels quels, et il a été démontré que l'injection intramusculaire de plasmide recombinant permet d'obtenir une bonne expression du transgène chez la souris (Danko *et al.*, 1993 ; Wolff *et al.*, 1990). Cependant, il semble que le transfert de gène par injection d'ADN ne soit vraiment efficace que pour les cellules musculaires, et des vecteurs permettant la transduction d'autres types cellulaires ont été développés. Dans ce contexte, les systèmes de transfert les plus utilisés sont les liposomes et le couplage à des ligands spécifiques de récepteurs membranaires.

Les liposomes sont des vésicules lipidiques dans lesquelles on peut introduire une solution aqueuse contenant le plasmide. Du fait de leur nature lipidique, ces liposomes ont ensuite la capacité de traverser la membrane cytoplasmique de la cellule cible. Plusieurs obstacles subsistent cependant à l'utilisation des liposomes en thérapie génique. Malgré leur innocuité, et la faiblesse ou l'absence de réponse immunitaire suite à leur injection *in vivo*, il semble que les liposomes soient très instables après avoir été introduits dans l'organisme (Desnick et Schuchman, 1998). De plus, les liposomes ne permettent pas de cibler les cellules transduites, le mécanisme d'internalisation n'étant pas spécifique d'un type cellulaire particulier.

Afin de résoudre le problème de ciblage, des molécules ayant pour but de coupler une molécule d'ADN avec un ligand spécifique d'un récepteur ont été développées. Le premier "vecteur de couplage" a été mis au point par Wu et Wu et consiste en une molécule de polylysine - capable de se lier avec l'ADN - reliée par des ponts disulfure à un ligand permettant le ciblage spécifique des hépatocytes (Wu et Wu, 1988). Depuis, d'autres conjugués ont été mis au point, notamment pour cibler les récepteurs de la transferrine (Wagner *et al.*, 1990), ou le récepteur aux immunoglobulines de l'épithélium de l'appareil

respiratoire (Ferkol *et al.*, 1993).

La principale limitation des vecteurs non-viraux décrits ci-dessus est la dégradation de l'ADN par les lysosomes une fois ce dernier internalisé dans la cellule cible. A long terme, l'utilisation en clinique de ces vecteurs non-viraux devra passer par la mise au point de systèmes permettant d'une part d'éviter la dégradation de l'ADN et permettant d'autre part son maintien dans le noyau de la cellule transduite afin d'obtenir une expression efficace et à long terme du transgène d'intérêt.

Les vecteurs viraux sont, comme leur nom l'indique, basés sur l'utilisation de virus pour réaliser le transfert de gène. Ces virus sont délétés, d'une part pour ne plus se répliquer, d'autre part pour libérer de la place afin d'introduire le transgène au sein du génome viral. Les principaux vecteurs viraux ont été développés à partir de quatre types de virus différents : les rétrovirus, les adénovirus, les virus associés à l'adénovirus et les virus herpes-simplex (tableau n° 2).

Les vecteurs rétroviraux les plus utilisés dérivent du virus de la leucémie murine (MLV). Ces vecteurs ont été construits par délétions des gènes *gag*, *pol* et *env* du rétrovirus permettant l'insertion du transgène. Le vecteur rétroviral est ensuite produit par transfection de la construction rétrovirale dans une lignée cellulaire transcomplémentante fournissant les produits des gènes *gag*, *pol* et *env* (Cosset *et al.*, 1995). La majorité des essais cliniques actuellement réalisés ont utilisé ce type de vecteur viral (Robbins *et al.*, 1998). Cependant, les vecteurs rétroviraux développés à partir du MLV présentent de nombreux inconvénients : la méthode classique de production en cellule transcomplémentante donne des titres viraux relativement faibles, l'intégration du provirus dans le génome de la cellule transduite peut entraîner des mutations, et surtout, ce type de rétrovirus ne peut infecter que des cellules en division. Plus récemment, un nouveau type de vecteur rétroviral, développé à partir des lentivirus a fait son apparition. Il devrait permettre de résoudre les problèmes jusque-là attachés aux vecteurs rétroviraux et empêchant leur utilisation *in vivo* car il infecte les cellules quiescentes.

Les vecteurs adénoviraux permettent de résoudre plusieurs problèmes posés par

l'utilisation de vecteurs rétroviraux. Les deux principaux avantages des vecteurs adénoviraux sont la possibilité de les produire à des titres élevés et leur capacité à infecter un grand nombre de cellules quiescentes. L'adénovirus est un virus à ADN double brin, dont le génome s'étend sur 36 kilobases.

Les expériences de transfert de gène faisant l'objet de cette thèse ont été réalisées à l'aide des vecteurs adénoviraux et lentiviraux. Les caractéristiques de ces vecteurs seront détaillées dans le chapitre suivant.

Bien que ne faisant pas partie des vecteurs utilisés lors de cette thèse, il nous faut mentionner les vecteurs dérivés du virus associé à l'adénovirus (AAV) et du virus herpes-simplex (HSV) car leur application au transfert de gène a fait l'objet de nombreuses études.

L'AAV est un parvovirus à ADN simple brin dont la réplication nécessite un virus helper qui peut-être l'adénovirus ou le virus herpes-simplex. Ce virus est spécifiquement humain, mais il n'entraîne pas de pathologie ce qui permet de penser que son utilisation chez l'homme est relativement sûre. Il a été démontré que le vecteur dérivé de l'AAV permet de transférer de façon stable *in vivo* des cellules quiescentes comme les cellules musculaires (Fisher *et al.*, 1997) ou les cellules du système nerveux central, neurones et cellules gliales (Kaplitt *et al.*, 1994). L'AAV sauvage est capable de s'intégrer de façon stable dans une région spécifique du chromosome 19 de la cellule infectée (Samulski, 1993). Cependant, sous forme recombinante, l'AAV perd cette spécificité d'insertion, et pourrait entraîner des mutations par insertions (Robbins *et al.*, 1998). De plus, l'insertion du virus recombinant semble moins efficace que celle du virus sauvage, principalement à cause du faible taux de synthèse du deuxième brin d'ADN lors de l'infection sans virus helper (Ferrari *et al.*, 1996 ; Fisher *et al.*, 1996). Ainsi, sous réserve d'améliorations permettant de dépasser les limites décrites précédemment, les vecteurs AAV sont potentiellement intéressants pour la clinique humaine. Il faut cependant garder à l'esprit que les vecteurs AAV ne peuvent recevoir que des inserts de petite taille, n'excédant pas 4,8 kilobases.

Les virus herpes-simplex (HSV) sont des virus enveloppés à ADN double brin d'environ 150 kilobases qui se répliquent sous forme épisomale dans le noyau de la cellule

hôte. Pour une utilisation en thérapie génique, ces virus sont rendus défectifs pour la réplication par délétion d'un ou plusieurs gènes très précoces. Ces vecteurs peuvent alors être produits par infection de cellules transcomplémentantes. La taille des inserts contenus dans les vecteurs dérivés des HSV peut aller jusqu'à 30 kilobases environ. Les vecteurs dérivés des HSV sont potentiellement intéressants pour les maladies neurodégénératives de par leur neurotropisme naturel (Fink et Glorioso, 1997). Cependant, il reste de nombreux obstacles à l'utilisation des vecteurs HSV, dont les principaux sont la toxicité et la faible efficacité de transfection (Desnick et Schuchman, 1998).

	Rétrovirus	Adénovirus	AAV	HSV
Titre	Faible	élevé	moyen	moyen
Infection de cellules quiescentes	Non (sauf lentivirus)	oui	oui	oui
Taille de l'insert	Moyenne	moyenne (sauf gutless)	petite	grande
Intégration	Aléatoire	épisomal	aléatoire	épisomal

Tableau n° 2 : récapitulatif des caractéristiques des principaux vecteurs viraux.

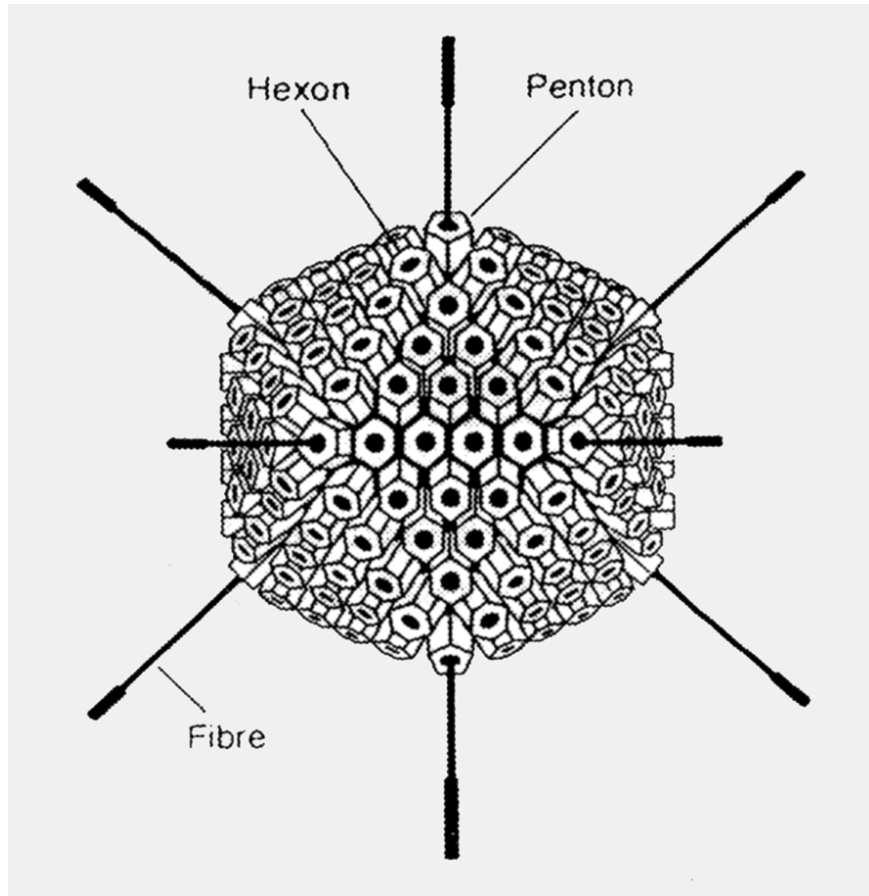
Ce rapide tour d'horizon des vecteurs actuellement disponibles pour réaliser le transfert de gène nécessaire à la thérapie génique laisse apparaître que le vecteur idéal n'existe pas encore et qu'un travail de développement important s'impose pour sa mise au point. Ce vecteur idéal pourrait prendre la forme d'un hybride entre les vecteurs non-viraux, qui ont l'avantage d'une production simple et reproductible, et les vecteurs viraux, qui permettent d'obtenir des fortes efficacités de transfection.

### 3. Le transfert de gène appliqué aux maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives concernent une part non négligeable de la population des pays développés, mais pour l'instant aucun traitement curatif n'a pu être mis au point pour une de ces maladies. Les seuls traitements disponibles sont d'ordre symptomatique, comme la L-DOPA dans le cas de la maladie de Parkinson, mais n'ont aucun effet sur le processus neurodégénératif. Pour d'autres pathologies, comme la maladie de Huntington, il n'existe même pas de réel traitement symptomatique. Pourtant, les stratégies et les candidats potentiels pour la mise au point de traitements ne manquent pas. Cela tient en partie au fait que les maladies neurodégénératives ne concernent, à l'intérieur du système nerveux, qu'un nombre restreint de types cellulaires ou de structures anatomiques. Cela a permis l'identification de molécules capable de remplacer la fonction manquante, le prototype étant les enzymes responsables de la synthèse du neurotransmetteur manquant suite à la neurodégénérescence, ou même d'empêcher cette neurodégénérescence, comme les facteurs neurotrophiques. L'obstacle qui empêche l'utilisation thérapeutique de ces molécules est leur nature protéique. La barrière hématoencéphalique interdit leur administration par voie systémique, et l'injection intracérébrale répétée sur des périodes de temps très longues est difficilement envisageable pour une application clinique.

La thérapie génique se propose de résoudre ce problème en permettant le transfert de gènes codant des protéines d'intérêt pour le traitement des affections neurodégénératives dans le système nerveux central au site même de la neurodégénérescence. Dans ce contexte, les travaux menés sur la maladie de Parkinson ont permis de montrer que l'application du transfert de gène aux maladies neurodégénératives est une voie non seulement envisageable mais également très prometteuse.

Des stratégies de type restauratrices, impliquant le transfert du gène de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de la synthèse de la dopamine, ont montré leur



*Figure 4 : structure du virion adénoviral.*

Le virion présente 20 facettes triangulaires composées chacune de 18 hexons, dont 6 sont communs avec les facettes adjacentes. Les 12 pentons sont disposés au sommet de chaque facette et forment la base de la fibre.

capacité à combler le déficit de ce neurotransmetteur dans des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson développés chez le rat. Ainsi, le transfert du gène de la TH permet des améliorations fonctionnelles, aussi bien en utilisant des méthodes indirectes ou *ex vivo* de transfert de gène, consistant à greffer des cellules préalablement génétiquement modifié *in vitro* (Horellou *et al.*, 1990), qu'en utilisant des méthodes directes de transfert de gène, consistant à injecter *in vivo* des vecteurs viraux recombinant pour la TH (Horellou *et al.*, 1994).

Des stratégies de type neuroprotectrice ont également pu être mises en œuvre à la suite de la découverte de facteurs neurotrophiques, comme le glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), capable de protéger les cellules dopaminergiques dans différentes situations de stress. Plusieurs études ont donc montré les effets neuroprotecteurs du transfert du gène du GDNF dans des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson (Bilang-Bleuel *et al.*, 1997 ; Choi-Lundberg *et al.*, 1997).

De telles stratégies de transfert de gène, par voie indirecte ou *ex vivo*, ou par voie directe ou *in vivo*, et à visée soit restauratrice, soit neuroprotectrice sont envisageables pour la maladie de Huntington.

## **Vecteurs adénoviral et lentiviral**

### **1. L'adénovirus recombinant**

En 1993, 4 publications ont mis en évidence la remarquable capacité de l'adénovirus recombinant à réaliser un transfert de gène direct dans les cellules du système nerveux central de mammifères (Akli *et al.*, 1993 ; Bajocchi *et al.*, 1993 ; Davidson *et al.*, 1993 ; Le Gal

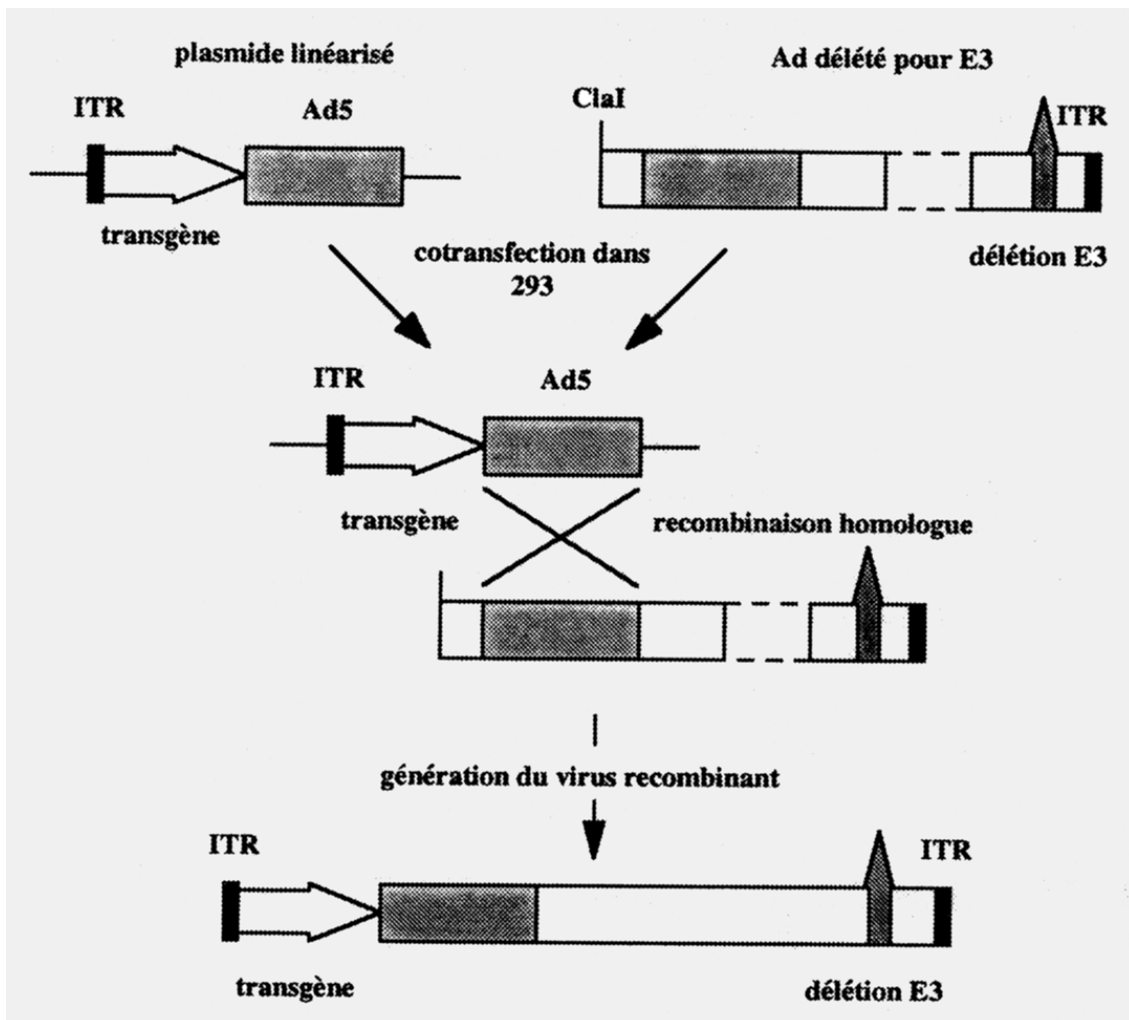


Figure 5 : construction d'un vecteur adénoviral recombinant par recombinaison homologue en cellules 293.

Les cellules 293 sont transfectées par : (i) un plasmide linéarisé contenant le transgène inséré entre l'ITR (inverted terminal repeat) et le gène PIX de l'adénovirus ; (ii) le reste du génome adénoviral, coupé par ClaI. Le plasmide linéarisé et le génome adénoviral possèdent des séquences communes qui permettent la recombinaison homologue.

La Salle *et al.*, 1993). Depuis, de nombreuses études ont confirmé ce résultat et ont montré que l'adénovirus recombinant reste un vecteur de choix pour le transfert direct de gènes rapporteurs ou thérapeutiques dans le système nerveux central.

Les vecteurs adénoviraux utilisés les plus fréquemment sont dérivés de l'adénovirus humain de type 5. Le tropisme naturel de ce virus, dont le récepteur reste à identifier, est l'appareil respiratoire où il est responsable d'affections bénignes. Le virion de l'adénovirus est composé d'une capsidie non enveloppée contenant une molécule d'ADN double brin. La capsidie, qui a un diamètre d'environ 75 nm et une structure icosaédrale, est composée de 240 sous-unités appelées hexons qui forment 20 facettes triangulaires, et de 12 sous-unités appelées pentons et situées au sommet des facettes triangulaires. Chaque penton possède une fibre reliée à sa base (figure 4). Le génome viral s'étend sur 36 kilobases et contient de nombreux gènes divisés en gènes précoces (E1 à E4, pour *early genes* ou gènes précoces) ou tardifs (L1 à L5, pour *late genes* ou gènes tardifs) selon que leur expression intervient avant ou après la réplication de l'ADN viral.

La première étape de l'infection par l'adénovirus est la fixation de la fibre sur son récepteur membranaire. Puis, le virus est internalisé par endocytose via un puit tapissé de clathrine qui va former une vésicule destinée à rejoindre la voie des endosomes. Dans cette voie, les vésicules vont dans un premier temps perdre leur manteau de clathrine, puis acidifier leur contenu à l'aide de pompes à protons. Cette acidification va provoquer la destruction de la capsidie virale et la libération dans le cytoplasme du core du virion qui se fixe alors au complexe des pores nucléaires. Enfin, l'ADN viral est transféré dans le noyau, où il persiste sous une forme épisomale, et la transcription des gènes viraux débute. Cela aboutit, 30 à 40 heures après le début de l'infection, à une lyse de la cellule permettant la libération de 1 000 à 10.000 virions.

L'infection par l'adénovirus sauvage aboutissant à la lyse de la cellule infectée, il est nécessaire, pour pouvoir utiliser l'adénovirus comme vecteur pour le transfert de gène, de déléter des gènes viraux essentiels pour la propagation du virus comme les gènes E1A et E1B. Ceux-ci sont impliqués dans la régulation des promoteurs précoces de l'adénovirus

ainsi que dans la régulation de l'entrée en phase S et de l'apoptose de la cellules infectée (Rao *et al.*, 1992). La délétion des gènes E1A et E1B permet d'obtenir un virus infectieux mais non répliatif (Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990). La propagation d'un tel virus recombinant s'effectue par infection de cellules de la lignée 293 qui apportent en trans les protéines produits des gènes E1A et E1B et autorisent la production à des titres élevés, atteignant  $10^{11}$  à  $10^{12}$  pfu.ml<sup>-1</sup> (plaque forming unit : particule infectieuse).

En plus de la région E1, les adénovirus recombinants dits de première génération, sont délétés dans la région E3 qui n'est pas nécessaire à la propagation du virus dans les cellules de la lignée 293. L'ensemble de ces délétions permet de libérer un espace de 7,5 kilobases pour l'insertion du transgène.

La production d'un adénovirus recombinant se fait par recombinaison homologue après cotransfection de cellules 293 avec d'une part un plasmide contenant une extrémité du génome adénoviral (ITR : inverted terminal repeat), la séquence d'encapsidation, le transgène et le gène de la protéine PIX qui permet la recombinaison homologue, et d'autre part le génome adénoviral dont l'extrémité gauche a été éliminée par restriction (figure 5). La recombinaison homologue conduit à la formation d'un génome viral capable d'être encapsidé ce qui entraîne la production de particules virales recombinantes puis l'apparition d'une plage de lyse. On peut ensuite obtenir un stock viral par purification et amplification du virus contenu dans la plage de lyse.

L'utilisation d'adénovirus recombinants a permis de transduire des cellules quiescentes *in vivo* et d'obtenir une forte expression du transgène par ces cellules. Il a été démontré que l'adénovirus recombinant est capable de transfecter *in vivo* les cellules de l'épithélium pulmonaire (Engelhardt *et al.*, 1993 ; Rosenfeld *et al.*, 1991), les cellules hépatiques (Jaffe *et al.*, 1992), les cellules du muscle squelettique (Ragot *et al.*, 1994 ; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1992) et du muscle cardiaque (Stratford-Perricaudet *et al.*, 1992).

L'injection d'adénovirus recombinant directement dans le SNC permet de transduire une grande variété de type cellulaire. L'injection dans l'hippocampe d'un adénovirus recombinant pour le gène Lac Z (Ad-βGal) permet de transduire des cellules

microgliales, mais également des neurones (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). La colocalisation entre l'expression de  $\beta$ -galactosidase et de tyrosine hydroxylase permet de montrer que l'injection de ce même adénovirus dans la substance noire permet de transduire efficacement les neurones dopaminergiques (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Par la même méthodologie de colocalisation, utilisant la  $\beta$ -galactosidase et la GFAP (glial fibrillary acidic protein), il a été montré que l'injection intrastriatale d'Ad- $\beta$ Gal permet également de transduire les astrocytes (Akli *et al.*, 1993). Enfin, l'injection intracérébroventriculaire entraîne une transduction très efficace des cellules épendymaires (Akli *et al.*, 1993 ; Bajocchi *et al.*, 1993).

L'utilisation de l'Ad- $\beta$ Gal a permis de mettre en évidence une autre caractéristique particulièrement intéressante du vecteur adénoviral. Lors de l'injection intrastriatale, on observe, dans la substance noire, des neurones dopaminergiques transfectés (Akli *et al.*, 1993). De même, l'injection intramusculaire entraîne l'expression de  $\beta$ -galactosidase dans les motoneurones de la moelle épinière (Finiels *et al.*, 1995). L'adénovirus recombinant est donc capable de transfecter les neurones par transport rétrograde. Dans le cas de la moelle épinière, cette propriété offre de nouvelles possibilités de traitements pour les maladies impliquant une dégénérescence motoneuronale, comme la sclérose latérale amyotrophique. En effet, pour ces pathologies, le vecteur adénoviral permet d'envisager un transfert de gène dans les motoneurones à la suite d'injections intramusculaires qui sont peu traumatisantes.

La capacité de l'adénovirus recombinant à transduire les cellules nerveuses étant établie, ce vecteur a été utilisé pour réaliser le transfert de gènes thérapeutiques dans des modèles de maladies neurodégénératives.

Dans le cas de la maladie de Parkinson, il a été démontré que l'adénovirus recombinant permet d'envisager des stratégies de thérapie génique par approches restauratrice ou neuroprotectrice permettant de pallier le manque d'efficacité des traitements actuellement disponibles. Ainsi, l'injection d'un vecteur adénoviral codant l'ADNc de la tyrosine hydroxylase, l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse de la

dopamine, dans le striatum de rats hémiparkinsoniens entraîne l'expression de la tyrosine hydroxylase au sein du striatum dénervé (Corti *et al.*, 1999a ; Horellou *et al.*, 1994). Pour développer un transfert de gène neuroprotecteur dans le cadre de la maladie de Parkinson, un vecteur adénoviral recombinant codant le glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) a été construit. Le GDNF est un facteur neurotrophique qui favorise la survie des neurones dopaminergiques de la substance noire - ceux qui dégèrent lors de la maladie de Parkinson. Il a été montré que le transfert du gène du GDNF par un vecteur adénoviral (Ad-GDNF) permet de protéger ces cellules de la mort induite par une toxine, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Ceci s'est vérifié à la fois lorsque le vecteur est injecté à proximité du soma des neurones dopaminergiques, c'est-à-dire dans la substance noire (Choi-Lundberg *et al.*, 1997), ou à proximité de la cible des neurones dopaminergiques, c'est-à-dire dans le striatum (Bilang-Bleuel *et al.*, 1997). Dans ce dernier cas de figure, la protection des neurones dopaminergiques observée sur le plan histologique est corrélée avec une amélioration fonctionnelle se traduisant par un comportement rotatoire induit par l'amphétamine moindre dans le groupe de rats traités par l'Ad-GDNF comparé au groupe contrôle (Bilang-Bleuel *et al.*, 1997).

Le vecteur adénoviral a été utilisé dans d'autres modèles de pathologies neurodégénératives. Ainsi le transfert du gène NT-3, codant la neurotrophine 3, par injection intramusculaire d'adénovirus recombinant chez la souris mutante *pnn* (progressive motor neuronopathy) permet l'allongement de la durée de vie tout en réduisant la perte des axones moteurs et en améliorant les fonctions neuromusculaires (Haase *et al.*, 1997). Le transfert de gènes de facteurs neurotrophiques (BDNF, GDNF, et CNTF) par adénovirus recombinant permet également de protéger les motoneurones du nerf facial de la dégénérescence induite par une axotomie néonatale (Gimenez y Ribotta *et al.*, 1997 ; Gravel *et al.*, 1997).

Toutes ces études ont cependant mis en évidence les limites du vecteur adénoviral. Au niveau périphérique, l'adénovirus recombinant permet une forte expression du transgène, mais qui chute rapidement à cause de la réponse immunitaire dirigée contre les

cellules transduites (Yang *et al.*, 1996a ; Yang *et al.*, 1994). Le système nerveux central est considéré comme un organe relativement protégé de la réponse immunitaire, de ce fait, la chute de l'expression du transgène suite à l'injection de l'adénovirus recombinant y est plus lente qu'au niveau périphérique. Par exemple, Davidson *et al.* rapportent que, après une injection intrastriatale d'Ad- $\beta$ Gal, le nombre de cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase 8 semaines après l'injection représente 10 à 20 % de celui observé une semaine après l'injection (Davidson *et al.*, 1993). Cette chute de l'expression semble due non seulement à la réaction immunitaire, mais également à l'inflammation induite lors de l'injection des particules virales dans le parenchyme cérébral (Byrnes *et al.*, 1995). Une étude récente menée au laboratoire montre que, 10 jours après une injection intrastriatale d'adénovirus recombinant chez le rat, une dose de  $1,75 \cdot 10^8$  pfu provoque une forte inflammation et une faible expression du transgène, alors qu'une dose deux fois moindre permet une très bonne expression avec une inflammation restreinte (Corti *et al.*, 1999a).

Des modifications du vecteur adénoviral et la mise en œuvre de traitements immunosuppresseurs transitoires devrait permettre de dépasser les limites actuelles du vecteur adénoviral qui, pour le moment, restreignent son usage en essais cliniques. Le vecteur adénoviral dit de troisième génération, portant des délétions supplémentaires de la région E4, permet une persistance à long terme du génome viral dans les hépatocytes de souris immunocompétentes (Dedieu *et al.*, 1997 ; Gao *et al.*, 1996). Cette persistance semble due à une chute significative de l'expression des gènes viraux comparé à ce qui est observé avec l'adénovirus de première génération. Le développement de vecteurs adénoviraux de quatrième génération, également appelés "gutless", permettra d'obtenir un vecteur totalement dépourvu de gènes viraux (Hardy *et al.*, 1997 ; Schiedner *et al.*, 1998). Avec ce type de vecteur, seule la réponse inflammatoire qui survient au moment de l'injection peut provoquer la chute de l'expression. On peut cependant inhiber de façon transitoire cette réponse inflammatoire à l'aide d'agents pharmacologiques (Jooss *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 1996b).

L'adénovirus recombinant reste donc l'un des meilleurs candidats pour le transfert

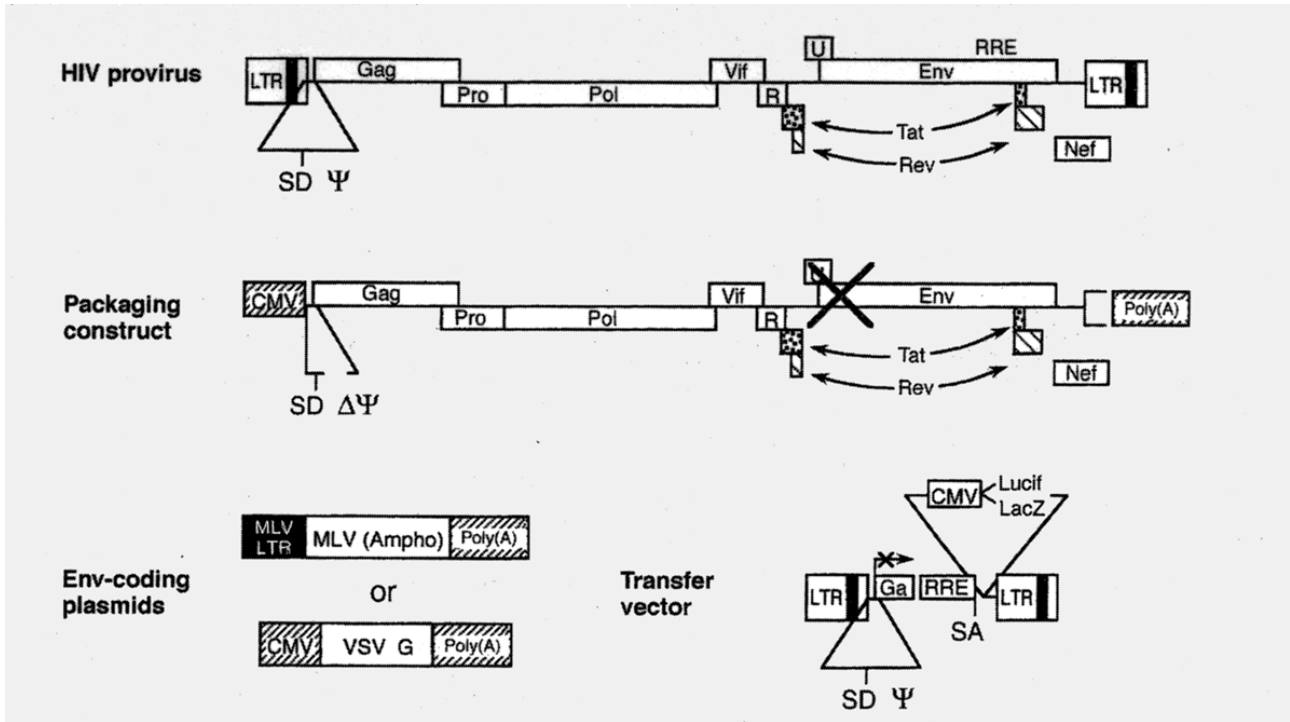


Figure 6 : construction par triple transfection d'un lentivirus recombinant pseudotypé par VSVG.

**HIV provirus** : génome du VIH sauvage. **Packaging construct** : construction permettant l'apport en trans de toutes les protéines requises, sauf env qui est muté ; la séquence d'encapsidation est déléetée. **Env-coding plasmids** : construction permettant l'apport en trans d'une protéine d'enveloppe amphotrope (MLV ou VSVG). **Transfer vector** : génome lentiviral recombinant possédant 2 LTR (long terminal repeat), une séquence d'encapsidation et un transgène sous le contrôle transcriptionnel du promoteur CMV (d'après Naldini *et al.*, 1996).

de gène dans le système nerveux central. Il permet de transduire les neurones et les cellules gliales. Il peut être produit à des titres élevés, ce qui est nécessaire pour l'injection intracérébrale. Il entraîne une expression à relativement long terme du transgène.

Plus récemment, un nouveau vecteur dérivé de lentivirus a été développé. Ce vecteur présente également des qualités qui en font un bon candidat pour le transfert de gène dans le système nerveux central.

## 2. Le lentivirus recombinant

Comme nous l'avons décrit précédemment, les vecteurs qui ont été les plus utilisés en essais cliniques sont dérivés de rétrovirus oncogènes comme le virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV). Ces vecteurs ont la capacité de s'intégrer de façon stable dans le génome de la cellule cible, et ils n'apportent aucun gène viral. Cependant, ces vecteurs présentent un inconvénient majeur : ils ne sont capables de transduire que les cellules en division. Une solution a pu être apportée à ce problème par le développement de vecteurs dérivés de lentivirus qui sont des rétrovirus complexes capables d'infecter des cellules quiescentes.

L'infection par un rétrovirus classique, comme le MMLV, se traduit par la libération dans la cellule du complexe de préintégration qui contient l'ARN viral et des protéines. Ces protéines catalysent la rétrotranscription du génome viral en ADN. Ensuite, pour que le génome viral s'intègre au génome de la cellule infectée, il doit se rendre dans le noyau. Cela n'est possible que lors de la mitose, lorsque l'enveloppe nucléaire est fragmentée.

Dans le cas des lentivirus, le complexe de préintégration contient des signaux de localisation nucléaire qui permettent son entrée dans le noyau à travers les pores de l'enveloppe nucléaire (Bukrinsky *et al.*, 1993). Cette propriété lui confère la capacité d'infecter des cellules quiescentes.

Les premiers vecteurs lentiviraux ont été construits à partir du virus de

l'immunodéficience humaine (VIH). Malgré leur capacité à infecter des cellules quiescentes, ces vecteurs présentaient deux inconvénients majeurs. D'une part, le tropisme naturel du virus faisait que ces vecteurs n'étaient capables que d'infecter les lymphocytes CD4+, et cela avec une efficacité relativement faible. D'autre part, lors de la construction du lentivirus recombinant, le risque de générer des virus sauvages par recombinaison n'était pas négligeable (Poznansky *et al.*, 1991 ; Shimada *et al.*, 1991).

La solution de ces problèmes est venue de la production par triple transfection de cellules 293T en utilisant une enveloppe différente de l'enveloppe naturelle du virus (figure 6). Cette méthode repose sur l'utilisation de trois plasmides : un plasmide codant les gènes gag et pol, un plasmide codant un gène env permettant un tropisme large et une forte infectiosité, et enfin un plasmide codant le génome recombinant et délété pour tous les gènes viraux (Naldini *et al.*, 1996). Ces vecteurs lentiviraux sont dits pseudotypés car construits à l'aide d'une protéine d'enveloppe différente de celle du lentivirus de départ. Cela permet d'être à l'abri d'une recombinaison conduisant à un virus répliquatif et d'obtenir un lentivirus recombinant capable d'infecter un large spectre de cellules quiescentes.

Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH et pseudotypés par la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSVG) sont capables de transduire efficacement, entre autres :

- Les neurones, et dans une moindre mesure les cellules gliales, après une injection du vecteur dans le parenchyme cérébral (Blömer *et al.*, 1997 ; Naldini *et al.*, 1996).
- Les cellules hépatiques et les cellules musculaires, après injection directe du vecteur respectivement dans le foie et le muscle (Kafri *et al.*, 1997).
- Les cellules de la rétine, après injection du vecteur dans l'espace sous-rétinien (Miyoshi *et al.*, 1997).
- Les cellules souches hématopoïétiques isolées à partir de sang humain (Case *et al.*, 1999 ; Uchida *et al.*, 1998).

De plus, ces études, réalisées avec des gènes rapporteurs comme la  $\beta$ -galactosidase

ou la GFP (green fluorescent protein), rapportent que l'expression du transgène est stable dans le temps. Elle persiste sans chute notable jusqu'à 24 semaines dans les neurones (Blömer *et al.*, 1997), 22 semaines dans les cellules hépatiques (Kafri *et al.*, 1997), 8 semaines dans les cellules musculaires striées (Kafri *et al.*, 1997), tous ces temps étant les plus longs étudiés par les auteurs.

Bien qu'étant apparu récemment, les vecteurs lentiviraux pseudotypés par VSVG semblent très intéressants, au moins pour transférer des gènes rapporteurs comme la GFP ou la  $\beta$ -galactosidase. Actuellement, peu d'études décrivent le transfert d'un gène thérapeutique par le biais d'un vecteur lentiviral. Goldman *et al.* rapportent le transfert du gène CFTR, dont la mutation entraîne la mucoviscidose, dans des cultures primaires d'épithélium bronchique humain (Goldman *et al.*, 1997). Cependant, l'effet thérapeutique qui est observé lorsque le transfert du gène CFTR est effectué alors que l'épithélium bronchique est en cours de différenciation, disparaît lorsque le transfert de gène a lieu alors que l'épithélium bronchique est totalement différencié (Goldman *et al.*, 1997). En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, le vecteur lentiviral a été utilisé pour transférer le gène de la TH et le gène du GDNF dans des modèles de la maladie de Parkinson développés chez le rat. Confirmant les travaux effectués avec l'adénovirus recombinant, il a été observé une protection des neurones dopaminergiques de la substance noire par le GDNF (Déglon *et al.*, 1998), et une amélioration des symptômes moteurs dans le modèle de rats hémiparkinsoniens après transfert du gène TH (Blömer *et al.*, 1998a). Enfin, le transfert par vecteur lentiviral des gènes Bcl-xL et NGF permet de protéger partiellement les neurones cholinergiques du septum de la dégénérescence induite par une axotomie (Blömer *et al.*, 1998b).

Les études qui ont décrit le transfert d'un gène rapporteur *in vivo* grâce à un vecteur lentiviral rapportent peu ou pas de réactions inflammatoires et immunitaires suite à l'injection du virus recombinant. C'est apparemment le cas dans le SNC (Blömer *et al.*, 1997), dans le foie et dans le muscle squelettique (Kafri *et al.*, 1997). Cependant, même si les

réactions inflammatoires et immunitaires après injection de lentivirus recombinant chez le rat semblent faibles, l'utilisation chez l'homme est pour l'instant compromise par le risque d'apparition de rétrovirus compétents pour la réplication. En effet, bien que ce risque soit très limité, un tel virus pourrait apparaître par recombinaison entre les différents plasmides utilisés lors de la production du vecteur (Naldini, 1998). Le risque de recombinaison empêche également l'utilisation du vecteur lentiviral chez des personnes infectées par le VIH (Naldini, 1998).

Un autre risque lié à l'utilisation du vecteur lentiviral est la mutagenèse insertionnelle. Le provirus recombinant s'intègre en effet au hasard dans le génome de la cellule transduite. Cela peut provoquer des mutations par insertion dans une phase ouverte de lecture ou dans une séquence de régulation de la transcription. On peut cependant considérer ce risque comme mineur car susceptible d'intervenir dans une très petite partie des cellules transduites. Un risque plus important, lié à l'insertion stochastique du provirus, provient de l'activation de proto-oncogènes cellulaires. Les LTR du provirus qui possèdent une activité transcriptionnelle pourraient notamment être à l'origine d'une telle activation qui aboutirait à un processus de tumorigénèse (Klimatcheva *et al.*, 1999). Ainsi, une application clinique du vecteur lentiviral ne pourra voir le jour avant que son innocuité n'ait été démontrée.

### **Quel(s) transgène(s) pour la maladie de Huntington ?**

Les gènes dont le transfert pourrait apporter un bénéfice thérapeutique dans la maladie de Huntington peuvent être classés en deux catégories selon l'objectif poursuivi, stratégie de type restauratrice ou neuroprotectrice.

## 1. Transfert de gène à visée restauratrice

Au cours de la maladie de Huntington, la mort des neurones GABAergiques de projection du striatum provoque une chute du taux de GABA dans certaines régions du cerveau. Dans ce contexte, une thérapie génique restauratrice aura pour but de rétablir les taux de neurotransmetteurs.

Un remplacement par administration systémique de GABA n'est pas envisageable. En premier lieu, l'abondance des systèmes GABAergiques dans le cerveau entraînerait des effets secondaires indésirables. Ensuite, l'effet du GABA serait annulé à cause du fonctionnement en série des neurones GABAergiques de projection du striatum avec ceux du pallidum et de la *pars reticulata* de la substance noire (Isacson *et al.*, 1991). Un remplacement pharmacologique n'est donc envisageable que s'il reste local.

La greffe de cellules génétiquement modifiées pour produire et libérer du GABA pourrait permettre son apport local. Une telle modification génétique peut être obtenue par transfert du gène de la glutamate décarboxylase (GAD), l'enzyme qui catalyse la réaction de décarboxylation du glutamate en GABA (Bu *et al.*, 1992 ; Erlander *et al.*, 1991). Ruppert *et al.* ont montré que, *in vitro*, l'infection de cellules de rat par un rétrovirus recombinant pour l'ADNc de la GAD aboutit à la libération de GABA par ces cellules (Ruppert *et al.*, 1993).

## 2. Transfert de gène à visée neuroprotectrice

De nombreux agents sont des candidats potentiels pour la mise au point d'une thérapie génique neuroprotectrice pour la maladie de Huntington. Parmi ceux-ci, on trouve des facteurs neurotrophiques, des enzymes permettant la détoxification des radicaux libres et des protéines anti-apoptiques.

***Protéines anti-apoptotiques :***

Comme nous l'avons vu précédemment, un mécanisme de mort apoptotique a pu être mis en évidence dans les modèles expérimentaux de la maladie de Huntington et chez les patients (Dragunow *et al.*, 1995 ; Portera-Cailliau *et al.*, 1995). On peut donc penser que les protéines anti-apoptotiques seraient capables d'arrêter le processus neurodégénératif. Parmi celles-ci, Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> sont les mieux connues (Garcia *et al.*, 1992 ; Kane *et al.*, 1993 ; Parsadanian *et al.*, 1998). D'autre part, il a été montré que les protéines pro-apoptotiques de la famille des caspases peuvent cliver la huntingtine mutée, générant ainsi des fragments protéiques toxiques (Goldberg *et al.*, 1996 ; Wellington *et al.*, 1998). Bloquer l'activité de certaines caspases est donc une des stratégies qui pourraient conduire à la mise au point d'un traitement. Ainsi, il a été démontré que l'inhibition de la caspase-3 empêche la mort de neurones en culture primaire provoquée par la transfection par une séquence codant une polyglutamine (Saudou *et al.*, 1998). *In vivo*, l'inhibition de la caspase-1 chez la souris transgénique décrite par l'équipe de G. Bates (Mangiarini *et al.*, 1996) permet de ralentir la progression des symptômes et augmente la durée de vie des souris (Ona *et al.*, 1999).

***Détoxification des radicaux libres.***

Le processus excitotoxique, qu'il soit un évènement primaire, ou bien secondaire à une chute du métabolisme énergétique, aboutit dans la cellule à l'accumulation de radicaux libres. Cette accumulation est due à l'augmentation du taux intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> et à l'augmentation de la consommation d'ATP, deux évènements qui aboutissent à une production intracellulaire d'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (pour une revue, lire Coyle et Puttfarcken, 1993). S'ils sont présents en quantité trop importante à l'intérieur de la cellule, les radicaux libres vont provoquer des dommages cellulaires irréversibles : destruction des membranes et des protéines, altération du métabolisme mitochondrial, dégradation de l'ADN (Doble, 1999).

Il semble donc possible de lutter contre l'excitotoxicité à l'aide d'agents antioxydants capables de limiter le taux intracellulaire de radicaux libres. Ainsi, il a été démontré chez le rat qu'un traitement préalable par le PBN (alpha-phényl-tert-butyl nitron), une molécule piégeant les radicaux libres dérivés de l'oxygène (Oliver *et al.*, 1990), permet de protéger les neurones du striatum vis-à-vis des lésions excitotoxiques (Nakao *et al.*, 1996a ; Schulz *et al.*, 1995a). Il est également possible de lutter contre les radicaux libres en utilisant les enzymes responsables de leur détoxification, comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) ou la catalase. Ainsi, des travaux menés au laboratoire ont montré que le transfert du gène de la superoxyde dismutase à l'aide d'un adénovirus recombinant permet de protéger les neurones dopaminergiques embryonnaires lors de leur greffe intracérébrale dans un modèle de la maladie de Parkinson (Barkats *et al.*, 1997).

### ***Facteurs neurotrophiques :***

Les facteurs neurotrophiques sont des protéines qui interviennent lors du développement embryonnaire du système nerveux. Ils sont sécrétés par les cibles des neurones en cours de développement et favorisent alors la survie des neurones innervant la cible. Ils sont également capables de protéger diverses catégories neuronales lors de stress variés comme l'hypoxie ou l'excitotoxicité ce qui suggère un potentiel thérapeutique dans le cadre des maladies neurodégénératives (pour une revue, lire Galpern *et al.*, 1997).

Le ciliary neurotrophic factor (CNTF) a montré ses capacités neuroprotectrices dans des modèles excitotoxiques. Anderson *et al.* ont rapporté que, chez le rat, l'administration intrastriatale de CNTF par pompe osmotique permet de protéger les neurones GABAergiques de projection de la mort cellulaire provoquée par l'injection d'acide quinolinique (Anderson *et al.*, 1996). Afin de résoudre le problème de l'administration du CNTF en vue d'une application clinique, un système d'encapsulation de cellules modifiées génétiquement pour produire du CNTF a été développé. Le système de capsule semi-

perméable permet au facteur trophique d'être libéré dans le tissu hôte tout en protégeant les cellules du système immunitaire et en empêchant la prolifération tumorale de ces dernières (pour une revue lire Emerich *et al.*, 1992). Chez le rat, l'implantation intrastriatale de ces capsules productrices de CNTF préalable à une lésion par l'acide quinolinique a confirmé le caractère neuroprotecteur du facteur trophique dans ce modèle excitotoxique. Cette neuroprotection s'est traduite par une meilleure survie des neurones du striatum (Emerich *et al.*, 1997a ; Emerich *et al.*, 1996). La neuroprotection permet également une amélioration du déficit fonctionnel observé lors d'un test comportemental simple comme le comportement rotatoire induit par l'apomorphine (Emerich *et al.*, 1996). Cependant, l'amélioration n'est pas observable avec le test de "paw reaching" qui nécessite l'accomplissement d'un mouvement complexe de la part de l'animal (Emerich *et al.*, 1996). Une étude préclinique a néanmoins été entreprise à l'aide du modèle excitotoxique développé chez le primate. Elle a montré la capacité des cellules encapsulées productrices de CNTF à protéger non seulement les neurones du striatum, mais également ceux du cortex, qui sont sujets à une dégénérescence rétrograde suite à l'injection intrastriatale d'acide quinolinique (Emerich *et al.*, 1997b). Un essai clinique visant à implanter des cellules encapsulées productrices de CNTF et impliquant les équipes de M. Peschanski à Créteil et de P. Aebischer à Lausanne est en cours d'études (Peschanski, 1999).

Le glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) est un autre facteur neurotrophique, isolé dans un premier temps par sa capacité à promouvoir la survie des neurones dopaminergiques du mésencéphale en culture primaire (Lin *et al.*, 1993). Le GDNF a des effets neurotrophiques sur plusieurs populations neuronales et a été proposé comme un bon candidat pour le traitement de plusieurs maladies neuro-dégénératives (pour une revue, lire Arenas, 1996), dont la maladie de Huntington. Un effet neuroprotecteur de l'administration intrastriatale de GDNF a pu être mis en évidence dans les modèles de maladie de Huntington induit par l'acide quinolinique ou par l'acide 3-nitropropionique (Araujo et Hilt, 1997 ; Araujo et Hilt, 1998). L'effet neuroprotecteur du GDNF dans le modèle excitotoxique a été confirmé par deux autres études utilisant une

stratégie *ex vivo* de greffe de cellules génétiquement modifiées pour produire du GDNF (Pérez-Navarro *et al.*, 1999a ; Pérez-Navarro *et al.*, 1996). Cette dernière étude démontre cependant que la neuroprotection est limitée aux neurones de la voie striato-nigrale, et ne concerne pas les neurones de la voie striato-pallidale (Pérez-Navarro *et al.*, 1999a). Une thérapie génique par transfert *in vivo* ou *ex vivo* du gène du GDNF pourrait donc être efficace dans le cas de la maladie de Huntington.

Les facteurs neurotrophiques BDNF, NT-3 et NT-4/5 favorisent la survie et la différenciation des neurones GABAergiques du striatum en culture primaire (Ardelt *et al.*, 1994 ; Mizuno *et al.*, 1994 ; Ventimiglia *et al.*, 1995 ; Widmer et Hefti, 1994). A ce titre, ils sont des candidats intéressants pour mettre en œuvre une stratégie de neuroprotection de ces neurones. Parmi eux, le BDNF présente un intérêt particulier car il a des propriétés neuroprotectrices dans deux modèles *in vitro* de la maladie de Huntington. En effet, le BDNF protège les cellules striatales en culture primaire du stress excitotoxique provoqué par l'ajout de NMDA dans le milieu de culture (Nakao *et al.*, 1995). De plus, le BDNF supprime la mort par apoptose normalement observée après la transfection de neurones du striatum en culture primaire par la séquence codante de la huntingtine mutée (Saudou *et al.*, 1998).

Dans la partie suivante de ce mémoire, nous exposerons les résultats des expériences de transfert de gène que nous avons entreprises. Nous nous sommes intéressé à la greffe de cellules génétiquement modifiées pour exprimer la GAD. Nous avons également étudié le transfert de gènes neuroprotecteurs. A l'aide d'un adénovirus recombinant, nous avons transféré le gène de la SOD à des neurones de striatum en culture primaire et étudié l'effet protecteur de ce transfert de gène. Nous rapportons également les résultats que nous avons obtenus après transfert des gènes du GDNF et du BDNF dans le modèle excitotoxique de la maladie de Huntington obtenu par injection d'acide quinolinique chez le rat.

## RESULTATS

Les résultats issus de ce travail de thèse sont présentés en quatre chapitres relativement indépendants. Le premier chapitre concerne la thérapie génique restauratrice par greffe de cellules productrices de GABA. Le deuxième porte sur les possibilités de traitements neuroprotecteurs par transfert du gène de la superoxyde dismutase qui catalyse la détoxification des radicaux libres. Le troisième s'intéresse aux propriétés neuroprotectrices du transfert par adénovirus recombinant des gènes du BDNF et du GDNF dans un modèle excitotoxique de la maladie de Huntington. Enfin, le dernier chapitre traite des projets en cours de réalisation : développement de nouveaux vecteurs dérivés du lentivirus VIH pour le transfert des gènes du BDNF et du GDNF, application à un modèle de la maladie obtenue par intoxication chronique par l'acide 3-nitropropionique.

Les publications relatives à ces résultats sont incluses à la fin des trois premiers chapitres.

## GREFFE DE CELLULES PROGENITRICES NERVEUSES IMMORTALISEES DE FAÇON CONDITIONNELLE ET GENETIQUEMENT MODIFIEES POUR SUREXPRIMER LA GLUTAMATE DECARBOXYLASE

### OBJECTIFS

L'objectif à l'origine de ce travail est l'étude des mécanismes cellulaires mis en jeu dans les thérapies expérimentales de type restauratrice pour la maladie de Huntington.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, le terme de thérapie restauratrice désigne une stratégie ayant pour but le remplacement des neurones qui dégènèrent lors de la maladie. Ce remplacement semble possible par la greffe de cellules striatales embryonnaires qui permet une reconstruction du circuit cortex-striatum-globus pallidus dans les modèles de Huntington développés chez le rat (Wictorin et Björklund, 1989 ; Wictorin *et al.*, 1989a ; Wictorin *et al.*, 1989b Wictorin *et al.*, 1988 ;). De plus, ce type de greffe permet une amélioration des symptômes moteurs observés dans les modèles de Huntington développés chez le rat et chez le primate (Isacson *et al.*, 1986 ; Palfi *et al.*, 1998). Pour réaliser ces greffes, l'éminence ganglionnaire latérale est disséquée chez l'embryon, puis greffée dans le striatum. On observe alors au sein de la greffe deux types de tissus différents :

- un compartiment de type striatal, riche en acétylcholine estérase (AChE) et en neurones exprimant DARPP-32, et qui a été dénommé "patch-zones" ou "P-zones".

- Un compartiment pauvre en AChE et en neurones exprimant DARPP-32, qui a été dénommé "nonpatch" ou "NP-zones" (pour une revue, lire Björklund *et al.*, 1994b).

Il a été montré que les améliorations fonctionnelles apportées par la greffe de cellules embryonnaires sont dues au composant de types P-zones de la greffe (Nakao *et al.*, 1996b). On y retrouve des neurones présentant les caractéristiques de neurones striataux : expression de glutamate décarboxylase, d'enképhaline, de dynorphine et de

substance P (Björklund *et al.*, 1994b).

L'importance relative des différents composants des "P-zones" pour le succès des greffes n'est pas connue. Pour étudier ce problème, nous avons développé des greffes de cellules génétiquement modifiées pour libérer du GABA.

## METHODOLOGIE ET RESULTATS

Pour étudier la libération de GABA nous avons utilisé des cellules de la lignée HiB5. Ces cellules proviennent de culture primaire d'hippocampe de rat, et ont été immortalisées par l'antigène T thermosensible de SV40. Cultivées dans un environnement permissif, c'est-à-dire à 33°C, ces cellules se divisent et se manipulent comme une lignée classique. Par contre une fois greffées dans le SNC du rat, dont la température est de 39°C, elles arrêtent de se diviser (Renfranz *et al.*, 1991). Elles sont alors capables de se différencier et expriment alors des marqueurs typiques de cellules gliales (GFAP) mais également de cellules neuronales (MAP-2) (Lundberg *et al.*, 1997).

Nous avons modifié génétiquement les cellules HiB5 grâce à un adénovirus recombinant pour le gène de la glutamate décarboxylase (GAD67) qui a été construit au laboratoire (Robert *et al.*, 1997). Cet adénovirus (Ad-GAD) contient l'ADNc de la GAD67 de rat sous le contrôle transcriptionnel du promoteur RSV. *In vitro*, par dosage enzymatique et immunocytochimie, nous avons montré que les cellules HiB5 surexpriment la glutamate décarboxylase après infection par l'Ad-GAD.

Les cellules HiB5 infectées par l'Ad-GAD (HiB5-GAD) ou infectées par un adénovirus contrôle codant la  $\beta$ -galactosidase (HiB5- $\beta$ Gal) ont été greffées dans le striatum de rat préalablement lésé par l'acide iboténique. Cette lésion entraîne la mort de tous les neurones GABAergiques du striatum, facilitant la mise en évidence des cellules HiB5-GAD par immunohistochimie anti-GAD. Ainsi, 2 semaines après greffe, les cellules HiB5 exprimaient le transgène. Cela a été démontré par détection immunohistochimique de la GAD dans le cas des cellules HiB5-GAD, et par réaction X-Gal et détection

immunohistochimique de la  $\beta$ -galactosidase dans le cas des cellules HiB5- $\beta$ Gal. Cette expression était présente au cœur de la greffe, au niveau du site d'injection des cellules. Par contre, à de rares exceptions près, les cellules HiB5 ayant colonisées le striatum n'exprimaient pas le transgène. Ces cellules, préalablement marquées à la thymidine tritiée, ont pu être détectées par autoradiographie. Afin de vérifier si l'absence du transgène était due à une chute de l'expression ou à une disparition du génome adénoviral, nous avons entrepris de détecter ce dernier par PCR *in situ*. Cela a permis de montrer que le génome adénoviral était présent au niveau du site d'injection, mais pas dans les cellules HiB5 colonisant le striatum.

La méthodologie et l'ensemble de ces résultats sont détaillés dans la publication n°1 (pages 83 à 99) qui est en cours de préparation.

## DISCUSSION

### *Devenir des cellules HiB5-GAD et HiB5- $\beta$ Gal.*

Les cellules progénitrices nerveuses immortalisées de façon conditionnelle, comme la lignée HiB5, sont très intéressantes pour développer des stratégies de thérapies géniques *ex vivo*. Ces cellules peuvent être aisément manipulées génétiquement *in vitro* avant d'être greffées. Une fois introduites dans le striatum de rongeur, les cellules HiB5 colonisent l'ensemble de la structure anatomique (Lundberg *et al.*, 1996). C'est donc une situation tout à fait favorable pour apporter localement un neurotransmetteur comme le GABA. Dans ce but, nous avons transduit les cellules HiB5 à l'aide d'un adénovirus recombinant pour la GAD, l'enzyme de biosynthèse du GABA.

Après greffe de ces cellules génétiquement modifiées, nous avons montré que l'expression du transgène et le génome adénoviral ne persistent pas dans les cellules colonisant le striatum, mais restent limités aux cellules localisées dans le site d'injection. Cela pourrait être dû à la division des cellules HiB5, avant intégration dans le parenchyme cérébral de l'hôte, qui conduirait à la perte du génome adénoviral. Il est également

possible que les cellules transduites soient rejetées par le système immunitaire à cause de l'expression de gènes viraux. Cependant, cette dernière hypothèse semble moins probable car les données d'expression *in vitro* montrent que quasiment 100 % des cellules sont transduites. En cas de rejet de ces cellules on devrait donc observer un nombre très restreint de cellules après mise en évidence de la thymidine tritiée.

Les résultats de cette étude indiquent que l'adénovirus recombinant permet de mettre en œuvre une stratégie restauratrice *ex vivo* en utilisant les cellules HiB5. Cependant, il est probable que l'utilisation de vecteurs viraux entraînant l'intégration du transgène au génome de la cellule hôte devrait permettre une meilleure expression, qui ne serait alors plus limitée au site d'injection des cellules, mais que l'on retrouverait également dans les cellules ayant colonisé le parenchyme de l'hôte.

#### *Libération de GABA, application aux modèles de la maladie de Huntington.*

Comme nous le discutons dans la publication n°1, nous n'apportons pas de preuve directe permettant de démontrer de façon certaine la libération de GABA par les cellules HiB5-GAD. Cependant, plusieurs observations laissent penser que la surexpression de la GAD67 est suffisante pour obtenir une libération de GABA : (i) après transduction d'une lignée d'origine fibroblastique par un rétrovirus codant la GAD67, du GABA est libéré dans le milieu de culture (Ruppert *et al.*, 1993) ; (ii) c'est également le cas lorsque des cellules provenant de différentes lignées d'origine nerveuse sont transduites par un virus associé à l'adénovirus recombinant pour la GAD67 (Mi *et al.*, 1999) ; (iii) enfin, la transduction de cultures primaires d'astrocytes par l'Ad-GAD entraîne la libération de GABA dans le milieu de culture (Robert *et al.*, 1997).

Ce type de cellules, modifiées génétiquement pour surexprimer la GAD, représente un outil précieux pour étudier l'effet d'une libération locale de GABA dans certaines pathologies du système nerveux central. Dans le cas de la maladie de Huntington, la mort des neurones GABAergiques de projection du striatum entraîne une chute du taux de GABA au niveau de cette structure, mais également de ses cibles, le globus pallidus et la substance noire pars reticulata. Une thérapie de remplacement par apport périphérique

d'un analogue du GABA ne permet pourtant pas d'améliorer les symptômes (Scigliano *et al.*, 1984 ; Tell *et al.*, 1981 ; Waddington et Cross, 1984). Cela est sans doute en partie dû au fonctionnement en série des circuits GABAergiques : l'action de l'analogue sur le premier neurone du circuit est annulée par son action sur le deuxième neurone du circuit. L'utilisation de greffes de cellules productrices de GABA pourrait permettre de résoudre ce problème en apportant localement le neurotransmetteur au niveau du premier neurone du circuit, sans toucher les autres. Dans cette optique, il faudrait greffer les cellules productrices de GABA dans les structures cibles des projections striatales, le globus pallidus et la substance noire pars reticulata. On peut même imaginer greffer les cellules au niveau de la structure anatomique de sortie de la boucle des ganglions de la base, le thalamus. Ainsi, il a été montré que l'implantation intrathalamique d'un polymère entraînant une libération locale de GABA permet d'améliorer les symptômes moteurs observés dans un modèle de la maladie de Huntington obtenu par injection intrastriale d'acide iboténique chez le rat (Rozas *et al.*, 1996). A cause des capacités limitées du polymère, cette amélioration s'est avérée être transitoire. L'utilisation de cellules productrices de GABA permettra d'étudier sur un plus long terme l'effet d'une libération locale de ce neurotransmetteur dans les modèles animaux de la maladie de Huntington.

D'autres pathologies du SNC pourraient profiter d'une thérapie expérimentale permettant une libération localisée de GABA. C'est le cas de l'épilepsie. Il a déjà été démontré dans des modèles expérimentaux que l'administration locale d'agonistes GABAergiques permet de réduire l'amplitude des crises épileptiques (Faingold *et al.*, 1994 ; Le Gal La Salle *et al.*, 1983). La greffe de cellules productrices de GABA pourrait ainsi apporter une solution thérapeutique pour les formes d'épilepsies focales résistantes au traitement médicamenteux (Le Gal La Salle et Mallet, 1994).

Publication n°1 (en préparation) :

Expression of GAD cDNA after gene transfer in neural progenitor cells  
grafted into the ibotenic acid-lesioned rat striatum.

*Alexis-Pierre Bemelmans, Philippe Horellou, Jean-Jacques Robert, Marie-Claude Geoffroy, Philippe  
Colin et Jacques Mallet.*

## Expression of GAD cDNA after gene transfer in neural progenitor cells grafted into the ibotenic acid-lesioned rat striatum.

*Alexis-Pierre Bemelmans, Phillipe Horellou, Marie-Claude Geoffroy, Jean-Jacques Robert, Phillipe Colin and Jacques Mallet.*

Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs, UMR C9923, Centre National de la Recherche Scientifique, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Bâtiment CERVI, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Correspondence should be addressed to Jacques Mallet, LGN – Bât CERVI, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: 33-1-42 17 75 32. E-mail: [mallet@infobiogen.fr](mailto:mallet@infobiogen.fr)

---

### **Abstract**

Huntington's disease is a progressive neurodegenerative disorder that affects the striatum, where the GABAergic projection neurons are particularly sensitive. We have investigated the possibility of replacing those neurons with conditionally immortalized neural progenitors cells genetically modified so that they produce and release GABA. Gene transfer was achieved using a recombinant adenovirus encoding a glutamate decarboxylase (GAD67) cDNA. *In vitro*, this vector allow us to transduce virtually all the cells subjected to infection with the recombinant adenovirus. The modified cells were then grafted into the ibotenic acid-lesioned rat striatum, a model of Huntington's disease. We report that two weeks post-grafting the cells still express the transgene. This expression was shown to be restricted to the core of the graft, whereas no obvious expression could be seen in the cells that have integrate the host tissue. Those results confirm the efficacy of *ex vivo* gene transfer realized with recombinant adenovirus, and the importance of this strategy to achieve the replacement of missing cells for neurodegenerative disorders.

### **Introduction**

GABA is the major inhibitory neurotransmitter of the mammalian brain. It is implicated in several neurological disorders, such as certain form of epilepsy or Huntington's disease (HD). In this particular pathology, the GABAergic medium sized spiny neurons of the neostriatum are the major

target of a neuronal degeneration (Graveland *et al.*, 1985 ; Reiner *et al.*, 1988) which leads to dramatic cognitive and motor deficits. At the present time, there is no treatment to prevent or slow the neurodegeneration or to efficiently replace the missing neurons. In 1993, the mutation responsible of this autosomal dominant disorder was identified as an unstable expanded CAG repeat in a novel gene encoding a protein which was called huntingtin (The Huntington's disease collaborative research group, 1993). This discovery has led to the identification of several proteins that can interact with the mutated form of huntingtin (Bao *et al.*, 1996 ; Burke *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1995). This later one has been shown to be truncated by proteases and translocated in the nucleus where it aggregates (Reddy *et al.*, 1999). However, the function of huntingtin remain unknown and the exact role of the mutated huntingtin in degeneration of striatal GABAergic projecting neurons is not yet elucidated. The identification of Huntington's disease gene hasn't led to a therapeutic solution for this degenerative disorder (Haque *et al.*, 1997). At best, those findings may allow to explore new protective approaches for the disease. Therefore, alternative approaches based on restoration need to be developed. Interestingly, intrastriatal grafts of fetal striatal cells have been shown to significantly compensate for the behavioral deficit observed in rodent and primate models of HD (Isacson *et al.*, 1984 ; Isacson *et al.*, 1986 ; Palfi *et al.*, 1998). It is not known whether this effect is due to the GABA neurotransmitter only or to other components of the graft, such as the neuropeptides contained in the GABAergic neurons. To explore this issue, we are evaluating the effect of cells genetically modified to produce GABA. To generate such kind of cells, we have used HiB5 cells, a conditionnally immortalized neural cell line. This cell line, originating from primary hippocampal culture immortalized with a temperature sensitive allele of SV40 T antigen, is able to grow *in vitro* at 33°C, but stop dividing once grafted into the rodent central nervous system (Renfranz *et al.*, 1991). To make the HiB5 cells "GABA producing cells", we have used a recombinant adenovirus encoding glutamate decarboxylase (GAD67), the enzyme that catalyses the GABA synthesis.

Here, we report the transduction of HiB5 cells with a recombinant adenovirus encoding GAD67 (Ad-GAD). We show that transduced cells express high levels of GAD *in vitro*, but also *in vivo* after transplantation in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. Thus adenoviral vector appear as an efficient tool for *ex vivo* gene therapy.

## **Material and methods.**

### *In vitro* procedures:

*Recombinant adenoviruses construction.* The Ad-βGal, a gift from Dr M. Perricaudet, has been described previously (Stratford-Perricaudet *et al.*, 1992). The construction of the Ad-GAD is described elsewhere (Robert *et al.*, 1997). Briefly, to generate the Ad-GAD, a rat GAD67 cDNA (Julien *et al.*, 1987) was inserted downstream from the long terminal repeat of the Rous sarcoma virus

promoter into pLTRIX, a shuttle plasmid for adenovirus generation by homologous recombination in 293 cells. Virus titers were  $10^{11}$  pfu.ml<sup>-1</sup> for both Ad-βGal and Ad-GAD stocks.

*Transduction of HiB5 cells.* In all experiments, the same protocol was used to transduce HiB5 cells with recombinant adenoviruses. The HiB5 cell line was maintained in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> / 95% air atmosphere incubator at a permissive temperature (33°C), in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS). For infection, cells were plated at a density of  $4 \cdot 10^4$  cells.cm<sup>-2</sup> and infected the following day for one hour at 37°C in serum free medium, with multiplicities of infection (MOI) ranging from 50 to 500 pfu.cell<sup>-1</sup>. Then, the medium was changed for fresh DMEM containing 10%FCS. For transplantation, some of the transduced cells were then cultivated in presence of 1 mCi.ml<sup>-1</sup> [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (5 Ci.mmol<sup>-1</sup> ; Amersham) during three days. Four days after infection, cells were harvested for GAD activity or transplantation, or fixed for immunocytochemistry.

*Immunocytochemistry.* Cells were fixed twenty minutes with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS). β-galactosidase activity was detected by 2 hours incubation at 37°C in PBS containing: K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (4mM), K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (4mM), MgCl<sub>2</sub> (4mM) and 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-galactoside (X-Gal, 0.4 mg.ml<sup>-1</sup>). GAD immunoreactivity was detected using a rabbit antiserum (AB-108 ; Chemicon), revealed with vectastain ABC kit (Vector), and VIP (Vector) as a chromogen for peroxydase.

*Glutamate decarboxylase activity.* GAD activity was measured according to Brass *et al.* (Brass *et al.*, 1992). Briefly, cell pellets were lysed in a buffer containing 5mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 10 mM EDTA and 0.5% Triton X-100. The reaction mixture was composed of cell lysate adding with 20mM pyridoxal phosphate, 1mM 2-aminoethylisothiuronium bromide, 500 μM glutamate and 1 μCi L[3,4 <sup>3</sup>H] glutamic acid (57 Ci.mmol<sup>-1</sup> ; Amersham). This solution was incubated sixty minutes at 37°C and the reaction was stopped with 0.5 ml of a CuCl<sub>2</sub> suspension. After ten minutes on ice, the suspension was centrifuged (13,000 rpm for three minutes) and the supernatant applied to a column of Dowex AG-1X8 ion exchange resin which was eluted with 2 ml of water. Effluents were collected and mixed to a scintillation cocktail (aqueous counting scintillant ; Amersham) to measure the amount of [<sup>3</sup>H]GABA formed. Protein concentration of cell lysates were estimated by the Bradford method.

Lesion and transplantation:

*Surgery.* Before receiving transplants of HiB5 cells, twenty Sprague-Dawley rats were lesioned according to Wictorin and Björklund (Wictorin *et al.*, 1988). Under equithesin anaesthesia, they received into the right striatum an injection of 18 μg ibotenic acid (IA) equally divided into three sites located at the following coordinates: (1) A=+0.2 ; L=-3.0 ; V=-5.5, (2) A=+0.2 ; L=-3.0 ; V=-4.0, (3) A=+1.5 ; L=-2.5 ; V=-4.6, with the tooth bar set at -2.3 below from the interaural line (A= anterior from bregma ; L= lateral from midline ; V= ventral from the dural surface ; all coordinates are given in millimeters). Ten days after the lesion, the rats received  $5 \cdot 10^3$  HiB5 cells infected at a multiplicity of infection (MOI) of 500 pfu.cell<sup>-1</sup>. For transplantation, cells were diluted at a concentration of 125.000

cells. $\mu\text{l}^{-1}$  in Hank's balanced sodium salt containing 2% FCS. The transplant consists of two deposits of 2  $\mu\text{l}$  each at the following coordinates: (1) A=+0.2 ; L=-3.0 ; V=-4.5, (2) A=+1.5 ; L=-2.5 ; V=-4.7, with the toothbar set at -2.3. The rats were divided into three groups: 6 rats received Ad- $\beta$ Gal infected cells, 8 rats received Ad-GAD infected cells, and 6 rats received Ad-GAD-infected and [ $^3\text{H}$ ]thymidine labelled cells.

*Histological analysis.* To study  $\beta$ -galactosidase and GAD expression, half of the rats in each group were sacrificed one week post-grafting, and the remaining rats were sacrificed one week later. Under deep anaesthesia, rats were perfused with saline followed by 250 ml icecold 4% PFA in PBS. The brains were post fixed for two hours in the same fixative and cryoprotected in 15% saccharose in PBS. They were then cut into 16  $\mu\text{m}$  thick sections with a cryostat through the entire striatum. For X-Gal histochemistry, sections were treated as described above for immunocytochemistry. To characterize the graft, rabbit polyclonal antisera against GAD (1:2000 ; Chemicon), *E Coli*  $\beta$ -Galactosidase (1:5000 ; Cappel) and Glial Fibrillary Acidic Protein (1:1000 ; Dakopatts), and a mouse monoclonal antibody against rat macrophages and microglia (1:300 ; Cedar Lane) were used. The primary antibodies were detected using biotinylated secondary antibodies and avidin-biotin peroxydase complex from vector ABC kit for polyclonal antisera and vector ABC elite kit for monoclonal antibody according to the manufacturer's instructions. Finally, 0.04% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) was used as a chromogen in the presence of 0.012%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . For [ $^3\text{H}$ ]thymidine autoradiography, sections were first processed for immunocytochemistry and dehydrated. Then, the slides were dipped in Ilford K5 emulsion and developed in Kodak D-19 after 5 weeks of exposure.

*In situ* polymerase chain reaction. This experiment was performed according to Bagasra *et al.*, 1995 (Bagasra *et al.*, 1995). Viral DNA was detected in two steps: (i) amplification of a viral DNA fragment by *in situ* PCR, (ii) detection of the amplified fragment by *in situ* hybridization. Briefly, sections were treated with 6  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  proteinase K in PBS at room temperature for 20 minutes. After dehydration, a thin layer of PCR Mix was applied on the sections. The PCR Mix included 1X PCR buffer (10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 200  $\mu\text{M}$  dNTP, 1.25  $\mu\text{M}$  5' primer, 1.25  $\mu\text{M}$  3' primer and 0.1 unit. $\mu\text{l}^{-1}$  Taq polymerase (ATGC, France). The 5' primer (5'-TGGACTGTATTTT TAGGTTGGC-3') and the 3' primer (5'-GAAATGCAAATCTGTGAGGGTA-3') allow the amplification of a 373 base pair fragment in the adenovirus PIX gene using the following PCR protocol: 90 sec denaturation at 92°C and thirty cycles (94°C for 30 sec, 56°C for 60 sec, 72°C for 60 sec) performed on a crocodile III thermal cycler (appligene). The PCR product was then detected by *in situ* hybridization adapted from Wilkinson (Wilkinson, 1994) and using a digoxigenin labelled oligonucleotide (5'-CGGAGGGTGCCAGACTGCGGTATAA-3').

## Results.

### *In vitro* expression of GAD and $\beta$ -galactosidase.

HiB5 cells are conditionally immortalized neural progenitors (CINP) that are easily grown *in vitro* at a permissive temperature (33°C), and can be grafted in the rodent central nervous system without tumor formation (Renfranz *et al.*, 1991). To develop an *ex vivo* gene therapy strategy, we have first characterized transgene expression *in vitro* after adenoviral-mediated gene transfer into HiB5 cells. We have measured the GAD activity of HiB5 cell-extracts, infected with a MOI of 50, 200 or 500 pfu.cell<sup>-1</sup>. Four days after infection, the cells were harvested and lysed before incubation in a reaction mixture containing [<sup>3</sup>H] labelled glutamate (Brass *et al.*, 1992). After a one hour incubation, the quantification of the [<sup>3</sup>H] labelled GABA produced give a reproducible and specific estimation of the GAD activity (Martin, 1986). As shown in figure 1, this activity is detected in Ad-GAD infected cells, and increase linearly with the MOI ( $r^2=0.992$ ). Thus, Ad-GAD is able to drive the expression of a fonctionnal recombinant protein. To further characterize transgenes expression *in vitro*, HiB5 cells were infected at a MOI of 500 pfu.cell<sup>-1</sup> and then processed for either X-Gal staining or GAD immunocytochemistry (figure2). As shown in fig. 2A and 2B, after 4 days, infection with a recombinant adenovirus provides a strong expression of the transgene. If cells are then grown at 37°C, which is a non permissive temperature, an important part of the cells continue to show a strong expression 19 days after exposure to the virus (figure 2C and 2D). At the same time point, in 33°C grown cultures, some cells still express GAD (2E), but a phase contrast micrography shows that the vast majority does not express the transgene (2F): at this temperature, the cells undergo division, and the recombinant adenovirus is progressively lost probably because of its extra chromosomic nature.

### *In vivo* expression of GAD and $\beta$ -galactosidase.

Taking account of the *in vitro* data, we choose to harvest HiB5 cells for transplantation four days after infection at a MOI of 500 pfu.cell<sup>-1</sup> with either Ad-GAD or Ad- $\beta$ Gal. Indeed, at this MOI, a vast majority of the cells express the transgene and no obvious toxicity is detectable (figure 2). The *in vivo* expression was analysed one and two weeks post grafting: a large graft, expressing the transgene, can be seen in each group that were grafted with either Ad-GAD or Ad- $\beta$ Gal infected HiB5 cells (figure 3). The expression of GAD and  $\beta$ galactosidase is always restricted to the core of the graft, but, in some rare cases, in the Ad- $\beta$ Gal group, nuclei containing  $\beta$ galactosidase are detected in the host parenchyma, some distance away from the graft (figure 3C).

### [<sup>3</sup>H]thymidine autoradiography.

Within the core of the graft, a very strong [<sup>3</sup>H]thymidine labelling, colocalized with the GAD immunoreactivity, is detected one week after the graft (figure 4). [<sup>3</sup>H]thymidine labelling is also found in the host parenchyma, however, in this location, no colocalization is found with GAD

immunoreactivity. As shown by darkfield micrography, the number of [<sup>3</sup>H]thymidine labelled nuclei is higher at two weeks after transplantation than at one week. However, the intensity of the staining is lower.

GFAP and OX-42 immunoreactivity.

To study the nature of the cells containing [<sup>3</sup>H]thymidine labelled nuclei and present in the host parenchyma, we have combined immunohistochemistry for GFAP, a marker of astrocytes, or OX-42, a marker of macrophages and microglia, with [<sup>3</sup>H]thymidine autoradiography.

The GFAP staining reveals a large zone presenting a strong immunoreactivity with reactive astrocytes due to the ibotenic acid lesion (figure 5a). In the core of the graft, no GFAP immunoreactivity is detected in Ad-βGal and Ad-GAD groups. In the host parenchyma, some cells show a double staining with GFAP immunoreactivity and [<sup>3</sup>H]thymidine labelling, but the vast majority of [<sup>3</sup>H]thymidine positive cells are GFAP negative.

The lesioned area is also clearly labelled by OX-42 immunoreactivity. In this area, the microglial cells appear with larger cell bodies and thicker processes, and a large proportion of these cells are also seen with a cluster of silver grain clearly surrounding their nuclei (figure 5b). By contrast, the core of the graft is devoided of OX-42 immunoreactivity.

*In situ* polymerase chain reaction.

*In situ* PCR analysis was performed to detect the recombinant adenoviral DNA in transduced HiB5 cells after grafting. The analysis was conducted only on tissue sections from animals of the Ad-βGal group and leads to the detection of clearly labelled cells in the core of the graft (figure 6). Control experiments, conducted without Taq polymerase or without primers in the PCR Mix didn't show any non specific labelling in the graft, nor in the host tissue. Compared with X-Gal histochemistry or βgalactosidase immunoreactivity, this staining is weak, but clearly restricted to the nuclei of the grafted cells, without background or positive results in the host tissue.

## Discussion

In the present article, we have shown that a recombinant adenovirus expressing GAD may be used as a tool for *ex vivo* gene transfer strategy in a rat model of Huntington's disease. In this neurodegenerative disease, striatal GABAergic neurons projecting to substantia nigra pars compacta and to globus pallidus undergo cell death. The relative importance of the GABA loss in striatum, substantia nigra pars compacta and globus pallidus may be approached using transplantation of cells producing GABA. As a first step in this analysis, we have developed a method to express GAD in cells for transplantation in ibotenic acid-lesioned striatum. We have chosen the HiB5 cell line for

transplantation. This cell line is a conditionally immortalized neural progenitors that have been generated by transfection of embryonic E-16 hippocampal neural cells with a thermosensitive allele of SV40 T antigen (Renfranz *et al.*, 1991). These cells present several advantages: (i) they can be expanded in large quantities *in vitro* at 33°C, the permissive temperature, (ii) they stop dividing at 39°C, the rat body temperature without forming tumor, (iii) they migrate into the host brain parenchyma and interact with neurons (Lundberg *et al.*, 1997 ; Renfranz *et al.*, 1991). The cells have been infected with the recombinant adenovirus at the permissive temperature. The highest proportion of cells expressing the transgene were obtained at a MOI of 500 pfu.cell<sup>-1</sup>. At the non permissive temperature (i.e. 37°C for *in vitro* culture), the transgene expression was maintained for at least 19 days, whereas it is lost when the cells divide (i.e. when they are grown at 33°C, the permissive temperature). This suggest that at non permissive temperature, when the cells do not divide, the adenoviruses remain stably expressed, and therefore probably stay in the nucleus in an episomal state. Such a prolonged expression is in agreement with other studies in which recombinant adenoviruses were used to infect neural progenitor cells: (i) human neural progenitor cells were efficiently infected with recombinant adenovirus and have continued to express the transgene at least 8 weeks after intracerebral transplantation (Sabaté *et al.*, 1995) ; (ii) adult rat neuronal progenitor cells were shown to express adenovirus for at least 4 weeks after transplantation (Gage *et al.*, 1995) ; (iii) direct *in vivo* injection of adenovirus in the subventricular zone of adult mice resulted in long-term stable expression in progenitor cells (Yoon *et al.*, 1996).

#### Fate of adenovirus infected HiB5 cells.

Infection of HiB5 cells with either Ad-βGal or Ad-GAD at 500 pfu.cell<sup>-1</sup> did not lead to a major cell death. However, the quantitation of proteins in cellular extracts for GAD activity revealed a decrease in cellular proteins (34% decrease at 500 pfu.cell<sup>-1</sup>). This loss may correspond to a toxicity induced by adenoviral genes. Nevertheless, at lower MOI, adenoviral infection does not seem to compromise cell survival *in vitro* (figure 2), but also *in vivo* (figure 3 and 5c). In grafted HiB5 cells, GAD and β-galactosidase expression is clearly detected one and two weeks post grafting (figure 3 and 4). However, this expression is restricted to the graft implantation site whereas numerous HiB5 cells have migrate into the host tissue. Data provided by Ad-βGal infected cells confirm that expression of the transgene by a cell integrated into the host tissue is a rare event (figure 3b). Indeed migration and integration of HiB5 cells is accompanied of cellular division which stops few days after graft implantation (Lundberg *et al.*, 1997). This division may lead in most of the cases to the loss of adenoviral DNA explaining that only few cells are both integrated into the host tissue and expressing the transgene. Interestingly, it has been shown that 5 days post grafting all HiB5 cells have stopped dividing, as assessed by the negative immunostaining for proliferative cell nuclear antigen (PCNA, a marker of dividing cells) (Lundberg *et al.*, 1997). Therefore, it is reasonable to think that transgene will remain stably expressed in progenitor cells for a longer time. At both one and two weeks, we still detect a majority of cells expressing the transgene in the graft core. This is confirm by *in situ* PCR experiment which provides two evidences: (i) the adenoviral DNA is still present in the graft core two

weeks post-grafting ; (ii) no viral DNA could be detected in the host tissue, confirming the hypothesis that adenovirus might be lost during the cell migration.

[<sup>3</sup>H]thymidine labelling, GFAP and OX-42 immunostaining.

HiB5 cells have already been described as cells able to differentiate in an astroglial like phenotype once grafted in the rodent striatum (Lundberg *et al.*, 1996 ; Lundberg *et al.*, 1997). In the present study, we were able to detect in the host parenchyma a population of cells immunostained for the glial marker GFAP and with their nuclei covered with silver grains (figure 5a) Thus, it appears that infection with recombinant adenovirus does not prevent the differentiation of HiB5 cells in astroglial like cells.

Use of GABA producing cells.

Despite we have no experimental proof of GABA release by Ad-GAD-infected cells, several evidences lead us to think that it is the case. First, studies by us (data not shown) and others (Ruppert *et al.*, 1993) have shown that transfecting a cell line with a GAD67 encoding retrovirus is sufficient to obtain a GABA release in the culture medium. Second astroglial cultures are able to release GABA when infected by Ad-GAD (Robert *et al.*, 1997).

Ad-GAD infected cells are a promising tool to study long term effects of local GABA production in HD models. It has been shown that GABA-releasing polymer matrices can reduce motor impairment in a rat model of HD once implanted in the thalamus (Rozas *et al.*, 1996). However, this effect did not last more than 15 days: the amount of GABA release from the polymer decreased rapidly with time and was evaluated as negligible by the authors after two weeks. We have shown here that after 15 days, the GAD expression remains high and stable *in vivo*. Therefore, the use of Ad-GAD infected neural progenitors will be of great interest to study the long term effects of GABA in rat HD models, and grafting such kind of cells will help to progress toward an *ex vivo* approach of restorative transplantation for Huntington's disease.

## References

Bagasra, O., Seshamma, T., Pomerantz, R., and Hansen, J. (1995). *In situ* & hybridization to detect low-abundance nucleic acid targets. In Current protocols in molecular biology, J. W. Sons, ed. (New York), pp. 14.8.1-14.8.23.

Bao, J., Sharp, A. H., Wagster, M. V., Becher, M., Schilling, G., Ross, C. A., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (1996). Protein-protein interaction of huntingtin involves calmodulin. Proc Natl Acad Sci USA 93, 5037-5042.

Brass, B. J., Nonner, D., and Barrett, J. N. (1992). Differential effects of insulin on choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in neuron-rich striatal cultures. *J Neurochem* 59, 415-424.

Burke, J. R., Enghild, J. J., Martin, M. E., Jou, Y. S., Myers, R. M., Roses, A. D., Vance, J. M., and Strittmatter, W. J. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nature Med* 2, 347-350.

Gage, F. H., Coates, P. W., Palmer, T. D., Kuhn, H. G., Fisher, L. J., Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Suhr, S. T., and Ray, J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11879-83.

Graveland, G. A., Williams, R. S., and DiFiglia, M. (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227, 770-773.

Haque, N. S. K., Borghesani, P., and Isacson, Ö. (1997). Therapeutic strategies for Huntington's disease based on a molecular understanding of the disorder. *Molecular Medicine Today*, 175-183.

Isacson, Ö., Brundin, P., Kelly, P. A. T., Gage, F. H., and Björklund, A. (1984). Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* 311, 458-460.

Isacson, Ö., Dunnett, S. B., and Björklund, A. (1986). Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2728-2732.

Julien, J.-F., Legay, F., Dumas, S., Tappaz, M., and Mallet, J. (1987). Molecular cloning, expression and *in situ* hybridization of rat brain glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Neuroscience Letters* 73, 173-180.

Li, X.-J., Li, S.-H., Sharp, A. H., Nucifaro, F. C., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H., and Ross, C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402.

Lundberg, C., Field, P. M., Ajayi, Y. O., Raisman, G., and Björklund, A. (1996). Conditionally immortalized neural progenitor cell lines integrate and differentiate after grafting to the adult rat striatum. A combined autoradiographic and electron microscopic study. *Brain Res* 737, 295-300.

Lundberg, C., Martinez, S. A., Cattaneo, E., McKay, R. D. G., and Björklund, A. (1997). Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol*, 342-60.

Martin, D. L. (1986). Brain glutamate decarboxylase. In *Neuromethods*, vol 5: neurotransmitter enzymes, A. A. Boulton, G. B. Baker and P. H. Yu, eds. (Clifton, New Jersey: Humana Press), pp. 361-388.

Palfi, S., Conde, F., Riche, D., Brouillet, E., Dautry, C., Mittoux, V., Chibois, A., Peschanski, M., and Hantraye, P. (1998). Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* 4, 963-6.

Reddy, P. H., Williams, M., and Tagle, D. A. (1999). Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* 22, 248-55.

Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., and Young, A. B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5733-5737.

Renfranz, P. J., Cunningham, M. G., and McKay, R. D. G. (1991). Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 66, 713-729.

Robert, J.-J., Boulleret, V., Ridoux, V., Valin, A., Geoffroy, M.-C., Mallet, J., and Le Gal La Salle, G. (1997). Adenovirus-mediated transfer of a functional GAD gene into nerve cells: potential for the treatment of neurological diseases. *Gene Ther* 4, 1237-45.

Rozas, G., Liste, I., Lopez, M. E., Guerra, M. J., Kokaia, M., and Labandeira-Garcia, J. L. (1996). Intrathalamic implants of GABA-releasing polymer matrices reduce motor impairments in rats with excitotoxically lesioned striata. *Exp Neurol* 142, 323-30.

Ruppert, C., Sandrasagra, A., Anton, B., Evans, C., Schweitzer, E. S., and Tobin, A. J. (1993). Rat-1 fibroblasts engineered with GAD65 and GAD67 cDNAs in retroviral vectors produce and release GABA. *J Neurochem* 61, 768-71.

Sabaté, O., Horellou, P., Vigne, E., Colin, P., Perricaudet, M., Buc, C. M., and Mallet, J. (1995). Transplantation to the rat brain of human neural progenitors that were genetically modified using adenoviruses. *Nat Genet* 9, 256-60.

Stratford-Perricaudet, L. D., Makeh, I., Perricaudet, M., and Briand, P. (1992). *J Clin Invest* 90, 626-630.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-83.

Wictorin, K., Isacson, O., Fischer, W., Nothias, F., Peschanski, M., and Björklund, A. (1988). Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid-lesioned striatum--I. Subcortical afferents. *Neuroscience* 27, 547-62.

Wilkinson, D. (1994). Whole mount *in situ* hybridization of vertebrate embryos. In *In situ* hybridization: a practical approach, D. Wilkinson, ed. (Oxford: IRL Press), pp. 75-83.

Yoon, S. O., Lois, C., Alvarez, M., Alvarez, B. A., Falck, P. E., and Chao, M. V. (1996). Adenovirus-mediated gene delivery into neuronal precursors of the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11974-9.

**Figures**

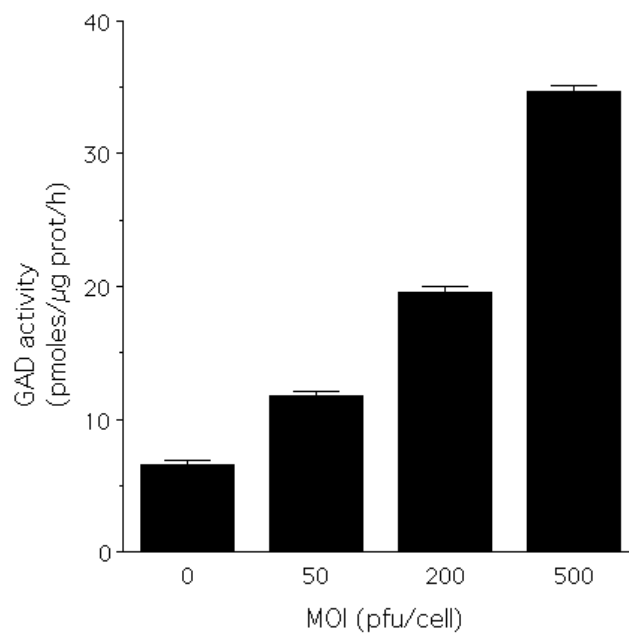


Figure 1: GAD activity of HiB5 cells four days after infection with Ad-GAD. The GAD activity increase in a linear manner with the multiplicity of infection ( $r^2= 0.992$ ).

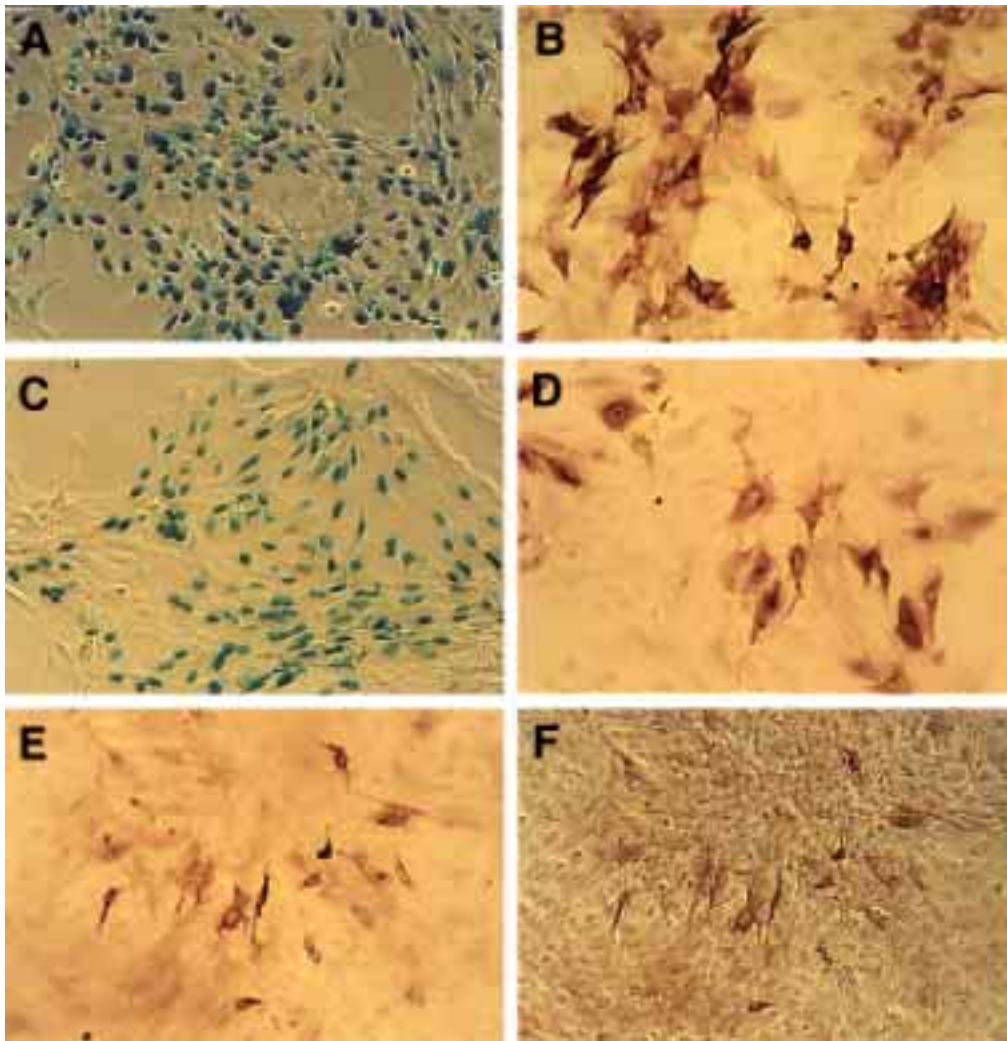


Figure 2: *In vitro* expression of GAD and  $\beta$ -galactosidase. A and C: Ad- $\beta$ Gal infected cells detected by X-Gal reaction. B and D: Ad-GAD infected cells detected by GAD immuno-histochemistry. A-B: HiB5 cells 4 days after infection. C-D: HiB5 cells 19 days after infection, grown at 37°C. scale bar: 300  $\mu$ m.

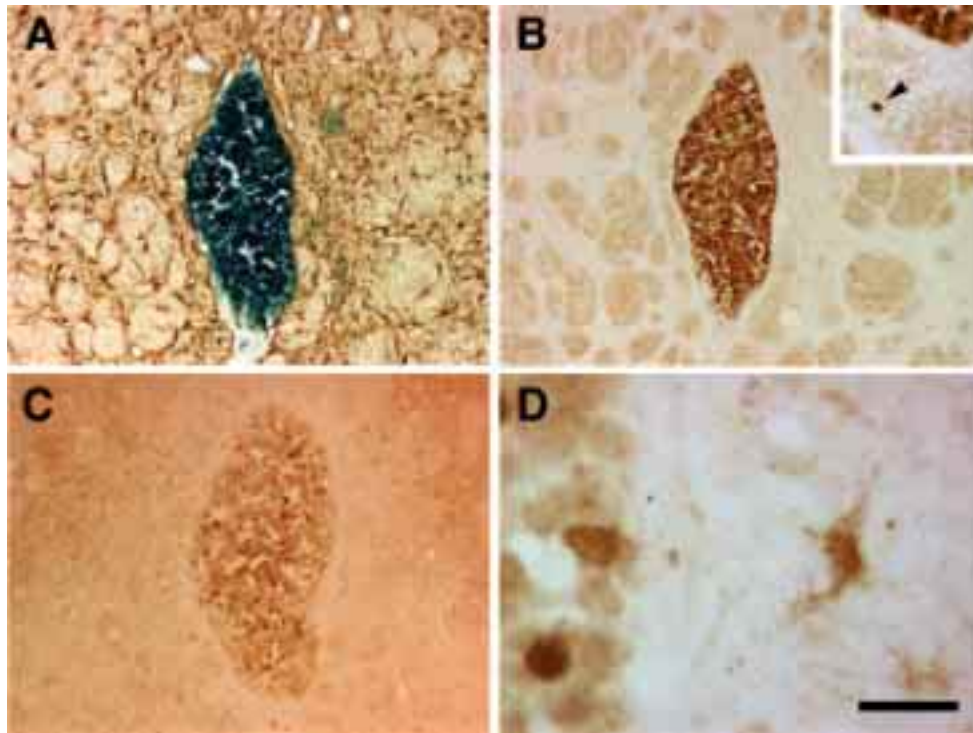


Figure 3: Ad- $\beta$ Gal (A-C) and Ad-GAD (D-E) infected cells two weeks after grafting. A: X-Gal staining of the graft with GFAP immunostaining of the host striatum showing the lesioned area. B:  $\beta$ -galactosidase immunostaining of an adjacent section of A, inset: higher magnification of B showing a stained nuclei (arrowhead) localized in the host tissue. C: graft of Ad-GAD infected HiB5 cells immunostained for GAD ; D: higher magnification of E showing a HiB5 cell integrated in the host parenchyma and expressing GAD. Scale bar: 200  $\mu$ m in A, B and C ; 50  $\mu$ m in B (inset) ; 25  $\mu$ m in D.

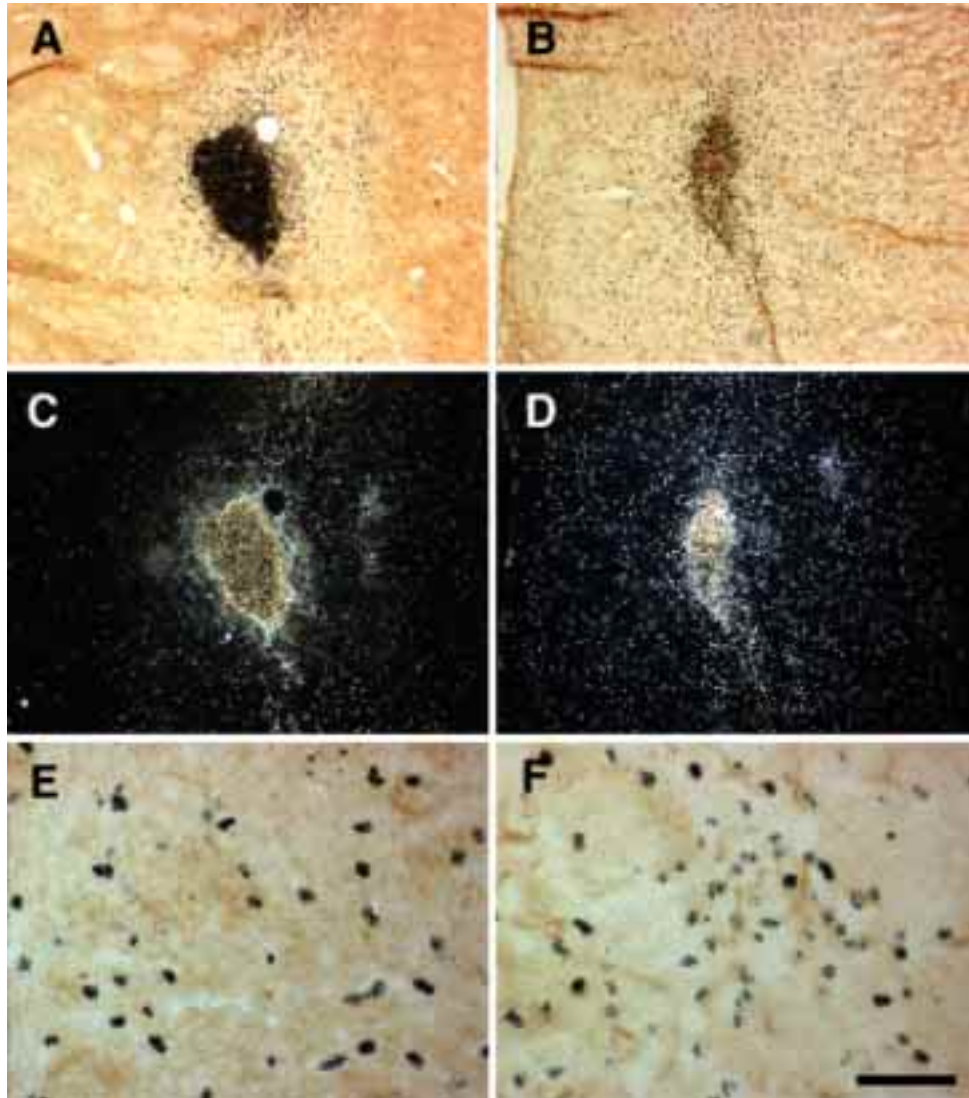


Figure 4:  $^3\text{H}$ -thymidine autoradiography combined with GAD immunostaining of Ad-GAD infected HiB5 cells. A, C and E: one week after grafting. B, D and F: two weeks after grafting ; for the two time points, bright field (A-B) and dark field (C-D) low magnification micrography of the same area are represented. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$  in A, B, C and D ; 50  $\mu\text{m}$  in E and F.

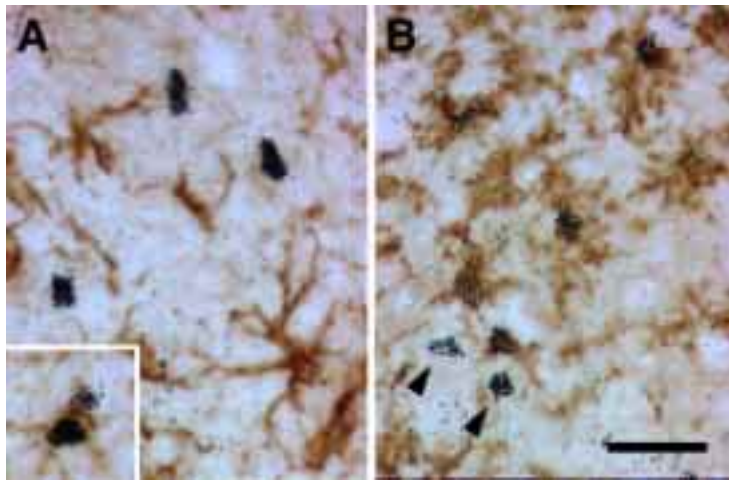


Figure 5: Representative sections showing GFAP (A) or OX-42 (B) immunostaining combined with  $^3\text{H}$ -thymidine autoradiography. A: most of the  $^3\text{H}$ -thymidine stained nuclei are GFAP negative ; insert: a GFAP positive cell double labelled with  $^3\text{H}$ -thymidine. B: a majority of  $^3\text{H}$ -thymidine cells are OX-42 positive ; arrowhead:  $^3\text{H}$ -thymidine labelled cells negative for OX-42 immunostaining. Scale bar: 25  $\mu\text{m}$ .

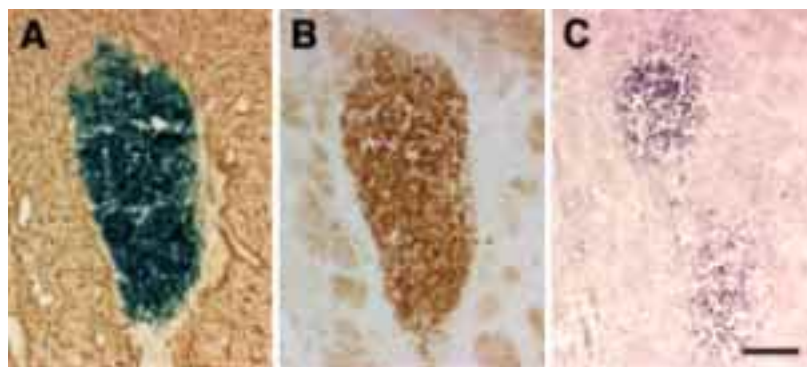


Figure 6: Three adjacent sections of a graft of Ad- $\beta\text{Gal}$ -infected HiB5 cells. HiB5 cells were evidenced by either X-Gal histochemistry (A),  $\beta$ -galactosidase immunostaining (B), or in situ PCR (C). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

## TRANSFERT DU GÈNE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE DANS DES NEURONES DE STRIATUM EN CULTURE PRIMAIRE : EFFET PROTECTEUR VIS-A-VIS DE LA TOXICITE DU GLUTAMATE

### OBJECTIFS

L'excitotoxicité et la baisse du métabolisme énergétique, qui ont tous deux été évoqués pour expliquer la neurodégénérescence lors de la maladie de Huntington, entraînent une augmentation intracellulaire des radicaux libres. L'élimination des radicaux libres pourrait donc permettre de lutter efficacement contre cette neurodégénérescence. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet du transfert du gène de la superoxyde dismutase, une enzyme de la voie de détoxification des radicaux libres, dans des neurones de striatum en culture primaire.

Un adénovirus recombinant codant le gène de la superoxyde dismutase à cuivre-zinc humaine (Ad-hCuZnSOD) a été construit au laboratoire. Cette enzyme catalyse la dismutation de l'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) en  $H_2O_2$  qui est ensuite réduit en  $H_2O$  et en  $O_2$  par la catalase et la glutathion peroxydase. La superoxyde dismutase (SOD) est donc l'enzyme qui permet d'effectuer la première étape de la voie de détoxification des radicaux libres. L'étude de lignées transgéniques a montré qu'une surexpression de cette enzyme entraîne une meilleure résistance neuronale lors de stress excitotoxique ou métabolique. Chan *et al.* rapportent que les cultures primaires de neurones issues de ces lignées sont plus résistantes à la toxicité du glutamate (Chan *et al.*, 1990). De plus, Beal *et al.* ont montré que les lésions striatales induites par l'acide 3-nitropropionique sont moins importantes chez des souris transgéniques surexprimant la CuZnSOD que chez les souris contrôles (Beal *et al.*, 1995).

Nous avons étudié l'effet du transfert du gène de la CuZnSOD dans des neurones de striatum de rat en culture primaire sur la résistance de ces neurones à la toxicité induite par le glutamate.

## METHODOLOGIE ET RESULTATS

Les cultures primaires de striatum ont été obtenues par dissection de l'éminence ganglionnaire latérale d'embryons Sprague-Dawley de 15 jours. Après dissociation mécanique, les cellules ont étéensemencées à la densité de 140.000 cellules par cm<sup>2</sup>, puis cultivées dans un milieu sans sérum supplémenté en hormones. Par détection immunocytochimique des marqueurs neuronaux "microtubule-associated protein",  $\beta$ 3 tubuline, neurofilament de 160 kDa et du marqueur astrocytaire "Glial Fibrillary Acidic Protein", nous avons déterminé que plus de 95 % des cellules de la culture ont un phénotype neuronal.

Trois à quatre jours après la mise en culture, les cellules ont été transduites par l'Ad-hCuZnSOD ou par un adénovirus contrôle codant la  $\beta$ -galactosidase. Trois jours après l'infection, les cultures ont été fixées pour mettre en évidence l'expression des différents transgènes. La  $\beta$ -galactosidase a été détectée par réaction histochimique, et la CuZnSOD humaine grâce à un anticorps polyclonal spécifique de cette enzyme et ne réagissant pas avec la SOD de rat. Plusieurs multiplicités d'infection (MOI) ont été utilisées pour infecter les cultures primaires de striatum. Une MOI de 300 pfu par cellule a conduit à la transduction d'environ 10 % des neurones de striatum en culture primaire.

Afin d'étudier l'effet du transfert du gène de la SOD sur la résistance des neurones, nous les avons soumis à une concentration extracellulaire de glutamate de 2,5 mM une semaine après la mise en culture. Une journée après ce traitement, la survie des cellules a été quantifiée. Dans les cultures contrôles, n'ayant pas été infectées par l'adénovirus recombinant, la survie a été estimée grâce à l'utilisation de deux colorants : la fluorescéine diacétate, qui est métabolisée par les cellules vivantes et devient alors fluorescente lorsqu'elle est excitée à 488 nm, et l'iodure de propidium, qui pénètre dans les cellules mortes et interagit avec l'ADN, ce qui produit une fluorescence rouge après excitation à 514 nm. Cette technique a permis de déterminer une chute de 55 % de la viabilité des neurones de striatum en culture primaire à la suite de l'exposition au glutamate. Des cultures préalablement transduites par l'Ad- $\beta$ Gal ont été soumises au même traitement. Le

comptage des cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase dans les cultures contrôles et dans celles exposées au glutamate a montré une chute de 55 % de la viabilité de ces cellules, similaire à celle observée pour les cellules non-infectées. Par contre, les cellules infectées par l'Ad-hCuZnSOD et exprimant la SOD humaine étaient totalement protégées de la neurotoxicité induite par le glutamate.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication n° 2 (pages 105 à 109).

## DISCUSSION

La protection des neurones de striatum en culture par l'Ad-hCuZnSOD met plusieurs faits en évidence. Premièrement, l'infection par l'Ad-hCuZnSOD entraîne l'expression de SOD humaine dans les neurones en culture primaire. Ensuite, la surexpression de SOD protège totalement les neurones de la toxicité induite par une forte dose de glutamate. Enfin, ce résultat implique que la mort cellulaire induite par le glutamate est due, au moins en partie, à la formation de radicaux libres.

La surexpression de la SOD, qui permet de neutraliser le catabolisme de l'ion superoxyde, représente donc un moyen efficace pour lutter contre les processus de mort cellulaire induits par les radicaux libres. Plusieurs études ont montré que, pour être efficace, la superoxyde dismutase doit être présente à l'intérieur même de la cellule à protéger (Greenlund *et al.*, 1995 ; Lafon-Cazal *et al.*, 1993). Le transfert du gène de la superoxyde dismutase est donc un moyen efficace pour obtenir une surproduction intracellulaire de cette enzyme, suffisante pour obtenir une protection des neurones de striatum en culture primaire vis-à-vis de la toxicité induite par une forte dose de glutamate.

Plusieurs publications ont montré que l'utilisation d'agents pharmacologiques capables d'inhiber la formation des radicaux libres permet de prévenir la mort des neurones GABAergiques de projection du striatum dans des modèles excitotoxiques de la maladie de Huntington développés chez le rat (Nakao *et al.*, 1996a ; Schulz *et al.*, 1995a ;

Schulz *et al.*, 1995b). Le transfert du gène de la superoxyde dismutase *in vivo* est donc un moyen séduisant pour lutter contre l'excitotoxicité à laquelle les neurones GABAergiques de projection du striatum sont sujets. Cependant, comme c'est le cas *in vitro*, la superoxyde dismutase doit être intracellulaire pour exercer son action antioxydante. Ainsi, à la suite d'une administration intrastriatale d'Ad-hCuZnSOD, on ne peut espérer protéger de l'excitotoxicité et de l'augmentation subséquente des radicaux libres que les cellules qui ont été transduites par l'adénovirus.

L'injection intracérébrale de vecteur adénoviral permet de transduire un grand nombre de cellules. De plus, nous avons développé au laboratoire des protocoles d'injections en sites multiples qui entraînent une forte expression du transgène dans une part majoritaire du striatum (Horellou *et al.*, 1994). Cependant le nombre de cellules transduites, même s'il est important, reste minoritaire comparé à l'ensemble des cellules composant le striatum. Une étude récente menée au laboratoire montre que, après injection intrastriatale d'un adénovirus recombinant pour le gène de la tyrosine hydroxylase, on retrouve environ 10.000 cellules transduites dans le striatum pour une dose initiale de  $0,87 \cdot 10^8$  pfu (Corti *et al.*, 1999a). En fait, d'après l'expérience acquise au laboratoire, il apparaît difficile d'augmenter cette dose de façon importante sans risquer de provoquer une forte inflammation qui compromet l'expression du transgène. Ainsi, le nombre maximal de cellules transduites à la suite de l'injection intrastriatale du vecteur adénoviral est relativement faible comparé au nombre total de cellules dont est composé le striatum.

Dans ce contexte, l'utilisation de l'Ad-hCuZnSOD dans des modèles *in vivo* de la maladie de Huntington ne permettrait de protéger qu'une petite partie des neurones GABAergiques de projection du striatum. Cela est d'autant plus vrai que l'adénovirus recombinant transduit les neurones mais également les cellules gliales (Akli *et al.*, 1993 ; Davidson *et al.*, 1993 ; Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

Ainsi, le transfert du gène de la superoxyde dismutase apparaît comme une stratégie prometteuse pour lutter contre les dommages subits par les neurones

GABAergiques de projection du striatum lors d'un processus excitotoxique ou d'une chute du métabolisme énergétique. Cependant, pour qu'une application *in vivo* puisse voir le jour, des outils nouveaux doivent être mis au point. On pourrait par exemple envisager une stratégie neuroprotectrice utilisant une superoxyde dismutase modifiée pour pouvoir être produite en grande quantité puis libérée par les cellules transduites, avant d'être captée par les cellules environnantes. Un vecteur contenant le gène d'une telle enzyme présenterait alors l'avantage de pouvoir être utilisé dans un but neuroprotecteur par transfert de gène direct ou *in vivo*, mais également *in vitro* pour modifier génétiquement des cellules destinées à la greffe (stratégie *ex vivo*).

Publication n°2 (NeuroReport Vol 7, pages 497-501) :

An adenovirus encoding CuZnSOD protects  
cultured striatal neurones against glutamate toxicity.

*Martine Barkats, Alexis-Pierre Bemelmans, Marie-Claude Geoffroy, Jean-Jacques Robert, Isabelle Loquet, Philippe Horellou, Frédéric Revah et Jacques Mallet.*

SUPEROXIDE dismutase (SOD), a key enzyme in the detoxification of free radicals, catalyses the dismutation of superoxide  $O_2^{\bullet-}$  to oxygen and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). It is therefore a promising candidate for gene transfer therapy of neurological diseases in which free radicals are thought to be involved. We have constructed a recombinant adenoviral vector containing the human copper-zinc SOD cDNA. Using this vector we were able to drive the production of an active human copper-zinc SOD protein (hCuZnSOD) in various cell lines and primary cultures. Infection of striatal cells with a recombinant adenovirus expressing the hCuZnSOD protected these cells from glutamate-induced cell death.

**Key Words:** Superoxide dismutase ; Recombinant adenovirus ; Striatal neurones ; Glutamate ; Excitotoxicity ; Oxidative stress.

## An adenovirus encoding CuZnSOD protects cultured striatal neurones against glutamate toxicity.

Martine Barkats,  
Alexis-Pierre Bemelmans,  
Marie-Claude Geoffroy,  
Jean-Jacques Robert, Isabelle Loquet<sup>1</sup>,  
Philippe Horellou, Frédéric Revah<sup>1</sup> and  
Jacques Mallet<sup>CA</sup>

Laboratoire mixte Rhône-Poulenc-RORER/CNRS  
C9923, Génétique Moléculaire de la  
Neurotransmission et des Processus  
Neurodégénératifs, CERVI, Hôpital de la Pitié  
Salpêtrière, 75013 Paris, <sup>1</sup>Gencell Rhône-  
Poulenc-RORER, 94403 Vitry sur Seine,  
France.

<sup>CA</sup>Corresponding Author

---

### Introduction

Accumulating evidence indicates that excessive formation of free radicals may be involved in the pathophysiology of many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis<sup>1-3</sup>. Oxidative stress is also implicated in acute brain disorders such as ischemia and traumatic damage<sup>4</sup>. Both enzymatic and non-enzymatic systems can down-regulate the levels of oxidants in the brain<sup>5</sup>. Free radicals are quenched by cellular chemical scavengers (such as ascorbic acid in the cytosol or  $\alpha$ -tocopherol in membranes), and by an enzyme pathway system consisting of superoxide dismutase (SOD) and catalase/oxidase. SOD catalyses the dismutation of superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) to form  $H_2O_2$ , which is in turn reduced to water and molecular oxygen by catalase and glutathione peroxidase. SOD is therefore the first step in the enzyme cascade responsible for the detoxification of oxygen-derived free radicals, and increasing intracellular levels of SOD may be able to protect neurones against damage by free radicals. A protective effect of endogenous SOD against oxidative damage has been reported in various studies where SOD was overexpressed in transfected cells or transgenic animals. *In vitro*, primary cultures of neurones isolated from copper-zinc SOD (CuZnSOD) transgenic mice were found to be more resistant to glutamate toxicity than

controls<sup>6</sup>, and sympathetic neurones microinjected with CuZnSOD were partially protected against the effects of growth factor deprivation<sup>7</sup>. *In vivo*, transgenic mice overexpressing CuZnSOD displayed a lower vulnerability than non-transgenic controls to focal cerebral ischaemic injury<sup>8</sup>, MPTP- and metamphetamine-induced neurotoxicities<sup>9,10</sup>, and cerebral infarct after cold injury.<sup>11</sup>

These observations suggest that gene transfer of SOD, leading to overproduction of the enzyme in neurones, may have applications for protection against several forms of neurotoxic insults. An efficient method of gene transfer into brain cells has been developed using recombinant adenoviruses, which are able to infect postmitotic cells, and in particular neurones.<sup>12</sup> The adenoviral vector has also been shown to be a powerful tool for overproducing proteins of therapeutic interest in neurones *in vitro* and *in vivo*, opening the way to the development of new therapeutic strategies for neurological diseases. We have constructed an adenoviral vector carrying the human CuZnSOD gene (Ad-hCuZnSOD), to be used as a neuroprotecting tool. We report an analysis of whether infection of striatal cells with Ad-hCuZnSOD could reduce the vulnerability of these cells to glutamate-induced injury, as excitotoxicity is involved in a wide range of neurological diseases, and is linked to oxidative stress.<sup>1</sup>

## Materials and Methods

**Construction of recombinant adenoviruses:** The production of recombinant adenovirus expressing the  $\beta$ -galactosidase gene was described previously,<sup>13</sup> and a similar strategy was used to obtain a virus expressing the human CuZnSOD gene (Ad-hCuZnSOD). Briefly, a 622-base pair hCuZnSOD cDNA (a gift from Dr Guy Rouleau, Mc Gill University, Canada) was first inserted between the *Pst*I and *Hind*III sites of a Bluescript plasmid (Stratagene) containing the polyadenylation sequence of SV40 in the *Xho*I site. The gene was then prepared as a blunt-ended *Kpn*I/*Sac*I fragment and inserted downstream from the long terminal repeat of the Rous sarcoma virus (LTR RSV) promoter in a shuttle vector containing the inverted terminal repeat (ITR) of the adenoviral genome, encapsidation sequences, and adenoviral sequences allowing homologous recombination with the correct part of the viral genome (phCuZnSOD). After linearization by *Xmn*I digestion, phCuZnSOD and the large *Cla*I fragment of Ad-5 DNA were used to co-transfect the transformed human kidney cell line 293 using the calcium phosphate-DNA precipitation method. The transfected cells were overlaid with agar, and plaques were screened for the presence of the recombinant adenovirus, using enzyme restriction analysis and PCR. Viral stock was prepared by expansion of the recombinant adenovirus in the cell line 293, and purification by ultracentrifugation in a CsCl gradient, followed by dialysis. Virus titers were determined by plaque assays on 293 cells and expressed as plaque forming units (pfu) ml<sup>-1</sup>. Ad-hCuZnSOD was obtained at a titer of 3.10<sup>10</sup> pfu ml<sup>-1</sup>.

**Assay of hCuZnSOD enzymatic activity:** Mouse NS20Y neuroblastoma cells were infected with Ad-hCuZnSOD at a multiplicity of infection (MOI) of 50 and 100 pfu cell<sup>-1</sup>. Controls were not infected. Human CuZnSOD and host mouse CuZnSOD were identified by gel electrophoresis followed by nitroblue tetrazolium (NBT) staining. In each case a NP-40 extract was prepared from 500 000 NS20Y cells 48 hours after infection, loaded on a 15% non-denaturing polyacrylamide gel, and electrophoresis was performed for 3 hours at 100 V. SOD was localized by soaking the gel for 20 min in 0.3 mM NBT and 0.26 mM riboflavine, followed by immersion for 20 min in 90 mM tetramethylethylenediamine (TEMED).<sup>14</sup>

**Cell culture and infection protocol:** Striatal cultures were obtained from E15 Sprague-Dawley rat embryos (Iffa-Credo, France). The lateral ganglionic eminence was dissected out and mechanically dissociated. Cells were seeded on 24-well multiwells at a density of 250 000 cells per well in serum free medium: DMEM containing penicillin (100 units ml<sup>-1</sup>) and streptomycin (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; Gibco) and supplemented with 2 mM glutamine, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> transferrin, 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>

insulin, 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> putrescine, 5 ng ml<sup>-1</sup> sodium selenite and 6.3 ng ml<sup>-1</sup> progesterone (all from Sigma). More than 95% of the cells in culture were of neuronal phenotype, as assessed by cellular morphology and immunocytochemical labelling of microtubule associated protein,  $\beta$ 3 tubulin, 160 Kd neurofilament protein and GFAP (data not shown). Infections were performed after 3 or 4 days *in vitro* by changing culture medium for fresh medium containing the virus (Ad- $\beta$ Gal or Ad-hCuZnSOD) at a MOI of 100 or 300 pfu cell<sup>-1</sup>.

**Glutamate toxicity:** After 6 days *in vitro*, cultures were tested for sensitivity to glutamate. A stock solution of glutamate (Na-salt, Sigma) in DMEM was added directly to the wells to a final concentration of 2.5 mM. The stock solution was prepared in DMEM. Cell viability was determined 24 h later.

**Intravital staining of the culture (FDA/PI method):** Cells were washed with Locke's solution (154 mM NaCl, 5.6 mM KCL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.6 mM D-glucose and 8.6 mM HEPES ; pH 7.4) and incubated for 5 min at 37°C with a fluorescein diacetate (FDA, 15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) and propidium iodide (PI, 15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) mixture. The medium was then replaced with fresh Locke's solution and cultures were immediately examined under a fluorescence microscope at 488 nm (FDA) and 514 nm (PI).<sup>15</sup> FDA is deesterified only in living cells to produce a green-yellow fluorescence. Neuronal injury facilitates the entry of PI into the cells, and its interaction with DNA produces a red fluorescence. Viable and injured cells were counted from 3 representative fields for each well (2 photographs per field). The percentage of viable cells was computed by assessing the FDA/(PI+FDA) ratio for the 3 fields.

**X-Gal cytochemistry and hCuZnSOD immunocytochemistry:** To visualize transgene expression, cells were first fixed for 30 minutes at 4°C in phosphate buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde.  $\beta$ -galactosidase was detected by incubating the cells for 2 hours at 37°C in an X-Gal solution consisting of potassium ferricyanide (4mM), potassium ferrocyanide (4mM), MgCl<sub>2</sub> (4mM) and X-Gal (0.4 mg ml<sup>-1</sup>, Euromedex) in PBS. For SOD immunostaining, mouse NS20Y neuroblastoma cells were incubated for one hour with PBS containing horse non specific serum (NSS) and 0.2% Triton X-100, and then 48 hours at 4°C with a monoclonal anti-hCuZnSOD antibody (Sigma) diluted 1/500 in PBS with goat NSS and 0.2% Triton X-100, followed by staining using the vectastain Elite ABC system (Vector laboratories). For striatal neurones, cells were incubated for one hour in PBS with 10% pig NSS and 0.2% Triton X-100, and then 48 hours at 4°C with a polyclonal anti hCuZnSOD antibody (Valbiotech) diluted 1/500 in PBS containing 10% pig NSS and 0.2% Triton X-100, followed by one hour incubation with biotinylated anti-sheep/goat Ig

(1/400, Amersham) and one hour incubation with streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (1/250, Amersham). Both mouse and rat cells were treated with VIP peroxidase substrate (Biosys, France) and hydrogen peroxide. The viability of infected cells was estimated by counting cells expressing the transgene as revealed by X-Gal staining or anti hCuZnSOD immuno-chemistry in glutamate-treated and untreated cultures.

## Results

A recombinant adenoviral vector expressing the hCuZnSOD gene under the control of a LTR-RSV promoter was obtained. We checked its ability to direct production of a functional enzyme. The enzymatic activity of human CuZnSOD in infected mouse NS20Y neuroblastoma cells was visualized after non-denaturing gel electrophoresis, by nitro blue tetrazolium staining. This assay is based on the generation of superoxide ions reduced by riboflavin, which converts colorless nitro blue tetrazolium into blue formazan.<sup>14</sup> Scavenging of  $O_2^{\bullet-}$  by CuZnSOD inhibits color development, giving rise to a colorless band at the position of the enzyme in the gel. Thus, hCuZnSOD was detected in infected cells (Fig. 1). Endogenous mouse SOD and hCuZnSOD can be discriminated by their different mobilities in the gel (Fig. 1). The band intermediate between mouse and human CuZnSOD presumably corresponds to a heterodimeric form of SOD composed of a human and a mouse subunit. The intensity of the hCuZnSOD band increased with the multiplicity of infection (Fig. 1) from 50 to 100 pfu cell<sup>-1</sup>.

Human CuZnSOD was also detected by immunochemistry 48 hours after infection with Ad-hCuZnSOD in NS20Y neuroblastoma cells (Fig. 2), in PC12 cells and in primary culture cells of striatum (Fig. 3C,D), cortex, cerebellum and mesencephalon (results not shown), using an antibody able to discriminate between the endogenous rodent SOD and the exogenous human form of the enzyme. The immunoreactive cells were uniformly stained, showing that the recombinant protein was present throughout the cytoplasm. The efficiency of infection with Ad-hCuZnSOD varied among the different cell types. A MOI of 300 pfu cell<sup>-1</sup> for striatal neurones in primary culture led to approximately 10% of cells expressing the transgene. We investigated the neuroprotective capacities of Ad-hCuZnSOD against glutamate toxicity in striatal cells. Cells were infected with Ad- $\beta$ Gal or Ad-hCuZnSOD at a MOI of 100 and 300 pfu cell<sup>-1</sup>. The expression of  $\beta$ -galactosidase or hCuZnSOD in striatal cells was detected by X-Gal staining or hCuZnSOD immunochemistry respectively (Fig. 3). No  $\beta$ -galactosidase activity was detected in Ad-hCuZnSOD infected or control cells, and no hCuZn-

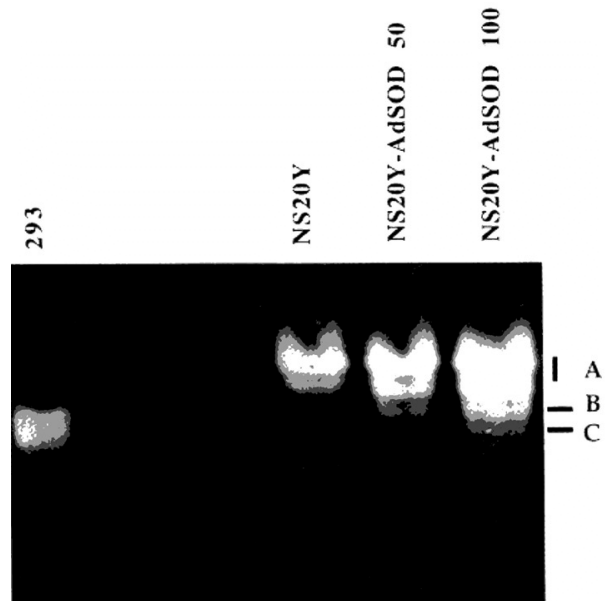


FIG. 1. Enzymatic activity of hCuZnSOD in mouse NS20Y neuroblastoma cells non infected (lane 2) or infected with 50 and 100 pfu cell<sup>-1</sup> (lanes 3 and 4 respectively). The position of human CuZnSOD activity band is shown for uninfected human 293 cells (lane 1). (A) mouse CuZnSOD ; (B) hybrid heterodimer ; (C) human CuZnSOD.

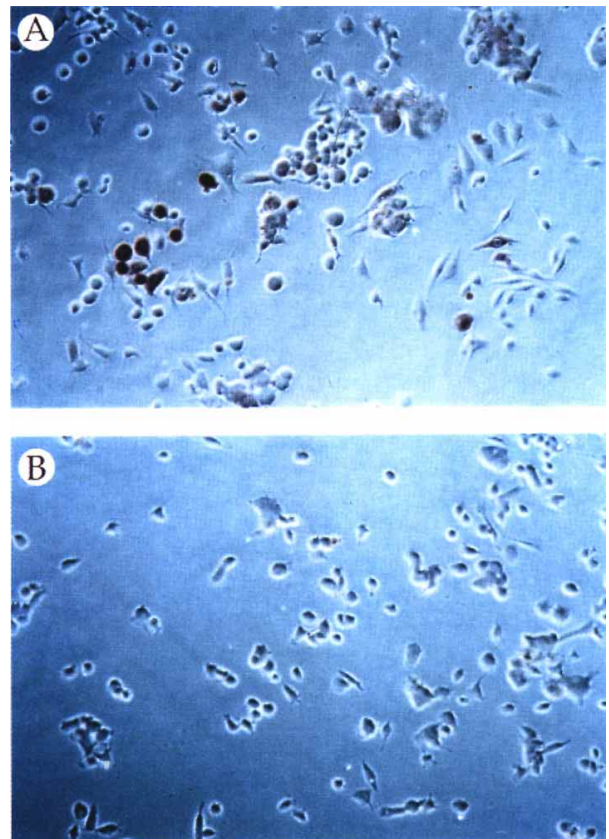


FIG. 2. Immunodetection of hCuZnSOD in cell line NS20Y. Cells were fixed for immunostaining 48 hours after infection with Ad-hCuZnSOD. (A) infected cells ; (B) uninfected cells.

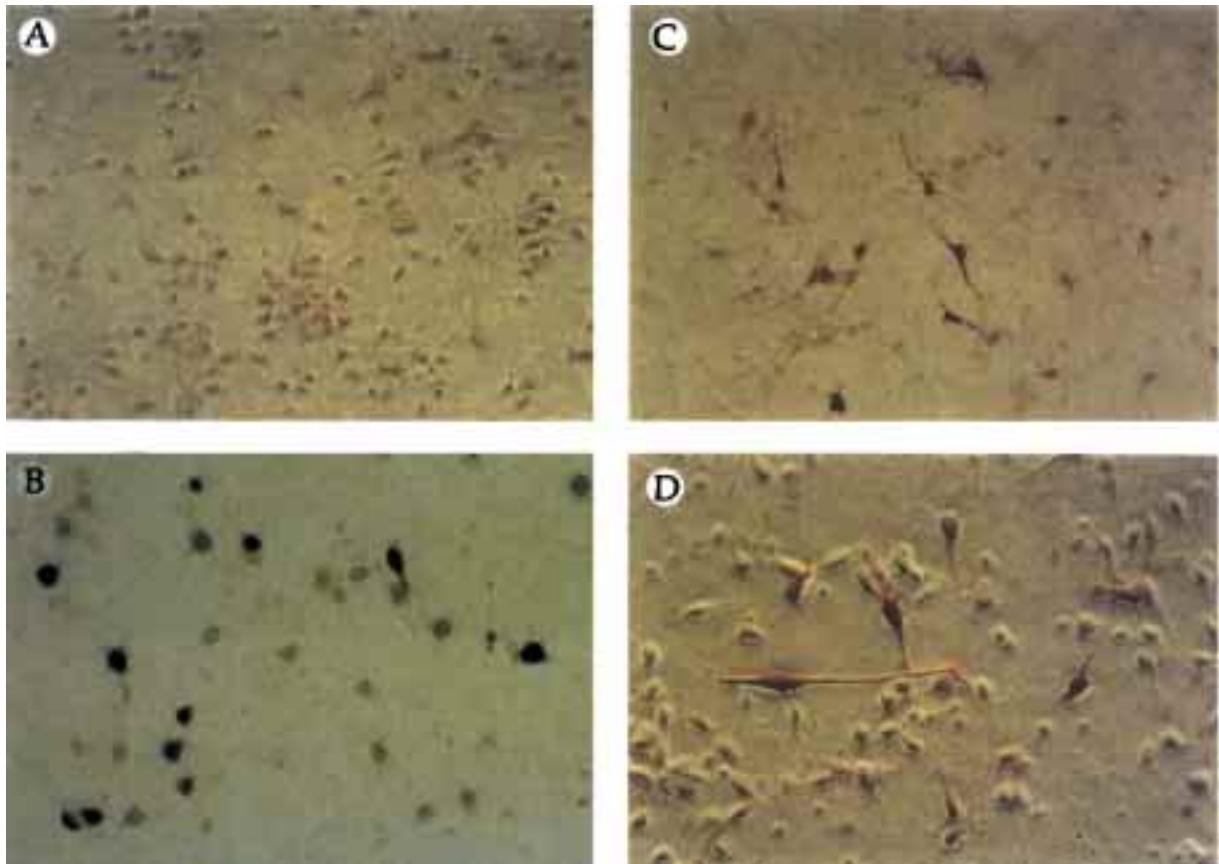
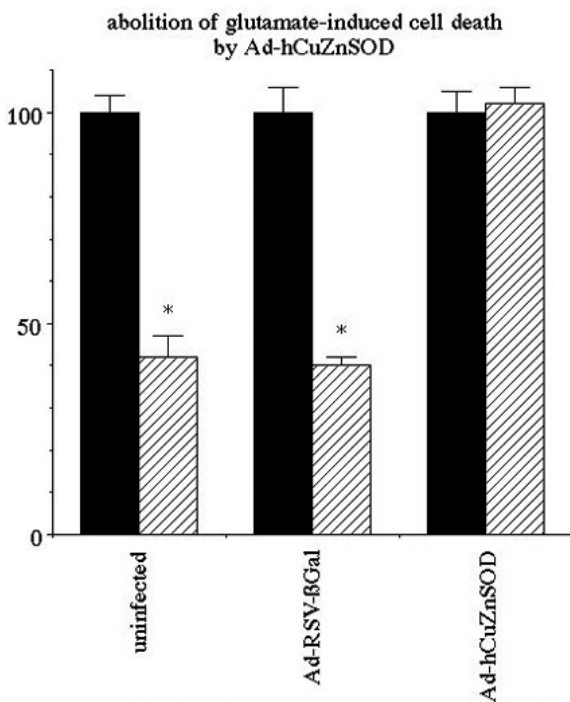


FIG. 3. Expression of transgenes in striatal neurones *in vitro*. Striatal cells were infected with Ad-βGal or Ad-hCuZnSOD at a MOI of 300 pfu cell<sup>-1</sup> after 4 days *in vitro* and cells were fixed 3 days later to test transgene expression. (A) uninfected cells (x20), (B) Ad-βGal infected cells (x40), (C-D) Ad-hCuZnSOD infected cells (respectively x20 and x40)



SOD was detected in Ad-βGal infected or control cells (data not shown).

High doses of glutamate (2.5 mM for 24 hours) applied to control primary cultures of striatum led to death of 55% of cells, as evidenced by a decrease in fluorescein diacetate staining and a parallel increase in propidium iodide staining (Fig. 4). Infection of striatal cells with Ad-hCuZnSOD (100 pfu cell<sup>-1</sup>) conferred protection against glutamate-induced toxicity. No mortality following glutamate application was

FIG. 4. Striatal neurones were infected with Ad-βGal or Ad-hCuZnSOD at a MOI of 100 pfu cell<sup>-1</sup> after 4 days *in vitro*. Three days after infection, cells were exposed (▨) or not exposed (■) to 2.5 mM glutamate for 24 h and stained for β-galactosidase or hCuZnSOD. βGal and hCuZnSOD expressing cells were counted in 15 microscope fields for each well, and results were expressed as a percentage of the control value (i.e. the number of βGal and hCuZnSOD positive cells in culture not subjected to glutamate toxicity ± s.e.m.). Triplicate sister cultures were subjected to each condition and the experiment was repeated three times. \*: P<0.002 (Student's *t*-test). Celler survival in control cultures (uninfected cells) was determined by the FDA/PI method.

observed among Ad-hCuZnSOD-infected cells, as demonstrated by counting cells immunoreactive for hCuZnSOD in glutamate-treated and untreated cultures (Fig. 4). This protective effect was due to the CuZnSOD transgene and not to viral infection *per se*: 55% of the  $\beta$ Gal positive cells (Ad- $\beta$ Gal infected cells) died after glutamate treatment, a mortality rate identical to that for uninfected cells in control cultures. Thus adenoviral-mediated overexpression of the hCuZnSOD gene protects striatal neurones in primary culture against glutamate-induced toxicity.

## Discussion

Studies demonstrating the reduced vulnerability of hCuZnSOD transgenic mice to numerous toxic insults have indicated the neuroprotecting potential of CuZnSOD. However, the use of such an enzyme to prevent neuronal death is hampered by its inability to cross cell membranes. For instance, NMDA-dependent superoxide production *in vitro* leads to neurotoxicity, and this cell death cannot be blocked by extracellular SOD.<sup>16</sup> Similarly, in an *in vitro* model of hypoxia (in which glutamic acid is implicated as the proximal cause of neurodegeneration), superoxide dismutase protects neurones only when taken up intracellularly under depolarizing conditions.<sup>17</sup> Finally, CuZnSOD delays apoptosis of sympathetic neurones deprived of growth factor, but only when the enzyme is microinjected into cells, and not when added to the extracellular medium.<sup>7</sup> These results demonstrate that CuZnSOD has to accumulate intracellularly to be able to protect injured cells. Thus, an appropriate vector is required to accomplish efficient CuZnSOD delivery to neurones. We show that adenoviral-mediated gene transfer is an efficient way to produce hCuZnSOD in neuronal cells. The exogenous enzyme is functional, as shown by activity tests in non-denaturing polyacrylamide gel. Furthermore, the intracellular levels of CuZnSOD are sufficient to protect neurones from glutamate-induced cell death.

Glutamate neurotoxicity can be mediated by the activation of glutamate receptors, or by the inhibition of cystine uptake (through the cystine/glutamate antiporter system): both mechanisms lead to the formation of free radicals. The stimulation of both ionotropic and metabotropic receptors is known to induce a rise in the cytosolic concentration of calcium which may enhance the production of free radicals by the activation of (1) a phospholipase yielding superoxide by the release and subsequent metabolism of arachidonic acid and (2) a protease which in turn accelerates the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxydase, a cellular source of superoxide.<sup>18</sup> Moreover, the activation of glutamate receptors may also trigger nitric oxide (NO) production,<sup>19</sup> yielding the peroxynitrite radical through

its reaction with superoxide. Glutamate toxicity involving inhibition of cystine uptake, leading to glutathione depletion and free radical generation, has also been described in neuronal cell lines<sup>20,21</sup> and in cells in primary culture.<sup>22</sup>

Independent of the possible mechanisms of glutamate toxicity, the glutamate-mediated production of free radicals is prevented in striatal cells infected by Ad-hCuZnSOD. This observation has two implications. First it suggests that in the striatal neurone model we used, superoxide radicals are involved in glutamate neurotoxicity, as they are in cerebellar<sup>16</sup> and cortical cells.<sup>6</sup> Secondly, our data show that Ad-hCuZnSOD is a potential therapeutic tool to prevent neurodegeneration associated with glutamate neurotoxicity. Interestingly, a recent report published during the preparation of this paper showed that Ad-hCuZnSOD could protect sympathetic neurones against NGF deprivation-induced death *in vitro*.<sup>23</sup> Thus Ad-hCuZnSOD displays a neuroprotective effect against both glutamate toxicity and growth factor-dependent neuronal death. Adenovirus-mediated hCuZnSOD gene transfer may therefore have therapeutic applications for a wide range of neurodegenerative disorders.

## Conclusion

A high dose of glutamate applied to striatal neurones in primary culture leads to a cell death rate of 55% due to glutamate-induced oxidative stress. A recombinant adenovirus encoding hCuZnSOD is able to direct the production of this enzyme in striatal cells, and thereby to protect them against glutamate toxicity by detoxifying free radicals.

## References

1. Coyle JT and Puttfarcken P *Science* **262**, 689-695 (1993).
2. Götz ME, König G, Riederer P *et al. Pharmac Ther* **63**, 37-122 (1994).
3. Behl C, Davis JB, Lesley R *et al. Cell* **77**, 817-827 (1994).
4. Chan PH *Brain Path* **4**, 59-65 (1994).
5. Yu BP *Physiol Rev* **74**, 139-162 (1994).
6. Chan PH, Chu L, Chen SF *et al. Acta Neurochirurgica* **51**, 245-247 (1990).
7. Greenlund LJ, Deckwerth TL, and Johnson EM Jr *Neuron* **14**, 303-315 (1995).
8. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T *et al. P N A S* **88**, 11158-11162 (1991).
9. Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V *et al. J Neuroscience* **12**, 1656-1667 (1992).
10. Cadet JL, Sheng P, Ali S *et al. J Neurochem* **62**, 380-383 (1994).
11. Chan PH, Yang GY, Chen SF *et al. Ann Neurol* **29**, 482-486 (1991).
12. Le Gal La Salle G, Robert J-J, Berrard S *et al. Science* **259**, 988-990 (1993).
13. Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M *et al. J Clin Invest* **90**, 626-630 (1992).
14. Beauchamp C and Fridovitch I *Anal Biochem* **44**, 276-287 (1971).
15. Didier M, Heaulme M, Soubrié P *et al. J Neuro Res* **27**, 25-35 (1990).
16. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M *et al. Nature* **364**, 535-537 (1993).
17. Rosenbaum DM, Kalberg J and Kessler JA *Stroke* **25**, 857-862 (1994).
18. Choi DW *Neuron* **1**, 623-634 (1988).
19. Dawson VL, Dawson TM, London ED *et al. P N A S* **88**, 6368-6371 (1991).
20. Kato S, Negishi K, Mawatari K *et al. Neuroscience* **48**, 903-914 (1992).
21. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A *et al. Neuron* **2**, 1547-1558 (1989).
22. Murphy TH, Schnaar RL and Coyle JT *FASEB J* **4**, 1624-1633 (1990).
23. Jordan J, Ghadge GD, Prehn JHM *et al. Molec Pharmac* **47**, 1095-1100 (1995).

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Rhône-Poulenc Rorer, the European Science Foundation and the Human Science Frontier Program. M.B. and A.-P.B. are supported by fellowships from respectively the Fondation IPSEN and the Fondation Marcel Merieux.

Received 28 september 1995 ;  
accepted 21 november 1995

## TRANSFERT DU GENE DU BDNF ET DU GENE DU GDNF DANS UN MODELE EXCITOTOXIQUE DE LA MALADIE DE HUNTINGTON DEVELOPPE CHEZ LE RAT

### OBJECTIFS

Des vecteurs adénoviraux de première génération codant des facteurs neurotrophiques ont été construits au laboratoire. Nous avons testé les effets neuroprotecteurs du transfert du gène du GDNF et du gène du BDNF dans un modèle excitotoxique de la maladie de Huntington obtenu par injection intrastriatale d'acide quinolinique chez le rat.

Le BDNF ("brain-derived neurotrophic factor") est un facteur trophique de la famille des neurotrophines. Il favorise la survie et la différenciation des neurones GABAergiques de striatum en culture primaire, et il protège ces neurones dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de la maladie de Huntington (introduction bibliographique, page 74).

Le GDNF ("glial cell line-derived neurotrophic factor") appartient à la famille du "transforming growth factor  $\beta$ ". Ce facteur trophique prévient la mort de différentes populations neuronales, comme les neurones dopaminergiques de la substance noire (Beck *et al.*, 1995 ; Sauer *et al.*, 1995 ; Tomac *et al.*, 1995), les motoneurones (Henderson *et al.*, 1994 ; Oppenheim *et al.*, 1995), les cellules de Purkinje (Mount *et al.*, 1995). Le GDNF est exprimé dans le striatum au cours du développement, mais également chez l'adulte. Il pourrait donc avoir un rôle trophique sur les neurones GABAergiques de projection du striatum. Il a donc été testé dans des modèles de la maladie de Huntington développés chez le rat. Ainsi, il a été montré que l'injection intracérébrale de GDNF sous forme de protéine recombinante permet de protéger les neurones du striatum de la dégénérescence induite par l'acide quinolinique ou par l'acide 3-nitropropionique (Araujo et Hilt, 1997 ; Araujo et Hilt, 1998).

Dans le cadre d'une application clinique du BDNF ou du GDNF un apport par transfert de gène serait souhaitable, car il permettrait une disponibilité locale de la protéine

thérapeutique sur une longue durée à la suite d'une injection intracérébrale.

## METHODOLOGIE ET RESULTATS

### *Transfert du gène du BDNF.*

Dans un premier temps, nous avons vérifié la fonctionnalité du BDNF transgénique après transduction de différents types cellulaires *in vitro* par l'adénovirus codant le BDNF (Ad-BDNF). Nous avons montré que des cellules HeLa transduites par l'Ad-BDNF sécrètent une grande quantité de BDNF transgénique - jusqu'à 8 ng de BDNF par jour pour 500.000 cellules infectées à une multiplicité d'infection de 80 pfu par cellule. Le BDNF favorise la survie et la différenciation des neurones de striatum en culture primaire. Il entraîne notamment une augmentation de l'expression de la calbindine par ces cellules (Mizuno *et al.*, 1994 ; Ventimiglia *et al.*, 1995). Pour vérifier l'activité biologique du BDNF transgénique, nous avons transduit des neurones de striatum en culture primaire par l'Ad-BDNF. Cela a conduit à un doublement du nombre de cellule exprimant la calbindine par rapport aux cultures contrôles non-infectées ou infectées par un adénovirus codant la  $\beta$ -galactosidase (Ad- $\beta$ Gal).

Nous avons ensuite étudié l'effet neuroprotecteur de l'Ad-BDNF dans le modèle de rat lésé par l'acide quinolinique. Les animaux ont en premier lieu reçu une injection intrastriatale soit d'Ad-BDNF soit d'Ad- $\beta$ Gal à la dose de  $0,5 \cdot 10^8$  pfu, soit de PBS, utilisé pour diluer le virus (groupe "véhicule"). Deux semaines après ce traitement, les rats ont été lésés par injection intrastriatale de 120 nmoles d'acide quinolinique. Un mois après cette lésion, les animaux ont été sacrifiés pour l'analyse histologique. L'étendue de la lésion a été déterminée sur des coupes de cerveaux après immunohistochimie anti-DARPP-32. DARPP-32 ("dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 kDa") est une protéine membranaire qui est associée aux récepteurs de la dopamine et qui permet de marquer spécifiquement les neurones GABAergiques de projection du striatum (Ouimet *et al.*, 1984). Nous avons quantifié le volume de la lésion induite par l'acide quinolinique dans les

différents groupes d'animaux. Cela a mis en évidence que le traitement préalable par l'Ad-BDNF entraîne une protection du striatum qui se traduit par une diminution du volume de la lésion de 55 % par rapport au groupe de rats traités par l'Ad- $\beta$ Gal, et de 75 % par rapport au groupe de rats ayant reçu une injection de PBS. A l'aide du système d'analyse d'image *Biocom*, nous avons quantifié la survie des neurones GABAergiques de projection du striatum par comptage des cellules exprimant DARPP-32. Par comparaison du striatum traité et du striatum contralatéral non traité pour chaque animal, nous avons pu déduire le taux de survie des cellules DARPP-32 :  $69 \pm 4$  % pour le groupe "Ad-BDNF" contre  $54 \pm 7$  % pour le groupe "Ad- $\beta$ Gal" ( $P=0,04$ ) et  $55 \pm 10$  % pour le groupe "véhicule" ( $P=0,12$ ).

Enfin, afin de nous assurer que la protection des neurones GABAergiques de projection du striatum est corrélée à la surexpression du BDNF, nous avons étudié l'expression du BDNF transgénique *in vivo*. Par hybridation *in situ*, nous avons détecté une grande quantité de cellules exprimant le BDNF six semaines après l'injection intrastriatale de l'Ad-BDNF. Nous avons également sacrifié des rats deux semaines après une injection intrastriatale d'Ad-BDNF ou d'Ad- $\beta$ Gal ou de PBS pour quantifier le BDNF exogène *in vivo* au temps où la lésion par l'acide quinolinique a été réalisée. Après dissection, les striata ont été lysés et leur contenu en BDNF a été quantifié par ELISA. Nous avons ainsi pu montrer que les striata de rats injectés par l'Ad-BDNF à la dose de  $0,5 \cdot 10^8$  pfu contiennent environ trois fois plus de BDNF que les striata contrôles ( $16,6 \pm 2,7$  pg de BDNF par mg de protéines contre  $6 \pm 1,3$  ;  $P < 0,01$ ).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que le transfert de gène direct de la neurotrophine BDNF protège les neurones GABAergiques de projection du striatum dans le modèle excitotoxique de la maladie de Huntington obtenu par injection intrastriatale d'acide quinolinique chez le rat. Ces résultats ont fait l'objet de la publication n°3 (reproduite pages 121 à 135).

#### *Transfert du gène du GDNF.*

Un adénovirus codant le GDNF (Ad-GDNF) a été construit et caractérisé au laboratoire (Bilang-Bleuel *et al.*, 1997). Nous avons utilisé cet Ad-GDNF dans les mêmes

conditions que l'Ad-BDNF pour étudier son effet neuroprotecteur dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique.

Des rats ont été traités par une injection intrastriatale d'Ad-GDNF ou d'Ad-βGal à la dose  $0,5 \cdot 10^8$  pfu ou une injection de PBS. De la même manière que pour l'étude de l'effet neuroprotecteur de l'Ad-BDNF, les rats ont été lésés deux semaines plus tard à l'aide de 120 nmoles d'acide quinolinique, puis sacrifiés après un mois. L'étude morphométrique de la lésion induite par l'acide quinolinique a alors été entreprise. Elle a permis de mettre en évidence une diminution du volume de lésion due au traitement par l'Ad-GDNF. Cependant, cette diminution (45 % comparée au groupe "Ad-βGal") s'est révélée être moins importante que celle obtenue avec l'Ad-BDNF (55 % comparé au groupe "Ad-βGal"), et statistiquement non significative (tableau n° 3).

Ce résultat étant moins probant que celui obtenu avec l'Ad-BDNF, l'étude de la survie des neurones GABAergiques de projections du striatum par comptage des cellules exprimant DARPP-32 n'a pas été entreprise.

Traitement	volume de lésion (mm <sup>3</sup> )
Ad-βGal (n=7)	3,8 ±0,8 (P=0,20 versus Ad-GDNF)
PBS (n=8)	6,2 ±1,7 (P=0,06 versus Ad-GDNF)
Ad-GDNF (n=8)	2,1 ±1,7

Tableau n° 3 : mesure du volume de la lésion induite par l'acide quinolinique à la suite d'une injection intrastriatale d'acide quinolinique : effet neuroprotecteur de l'Ad-GDNF.

*Effet comportemental du transfert des gènes du BDNF et du GDNF dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique.*

Afin de déterminer si la neuroprotection apportée par le transfert du gène du BDNF et, dans une moindre mesure, du gène du GDNF est corrélée à une amélioration fonctionnelle, nous avons mis en œuvre une étude comportementale des animaux après la lésion par l'acide quinolinique. Pour juger de la protection sur le plan fonctionnel, nous avons utilisé le comportement rotatoire, induit par l'amphétamine ou l'apomorphine, et le

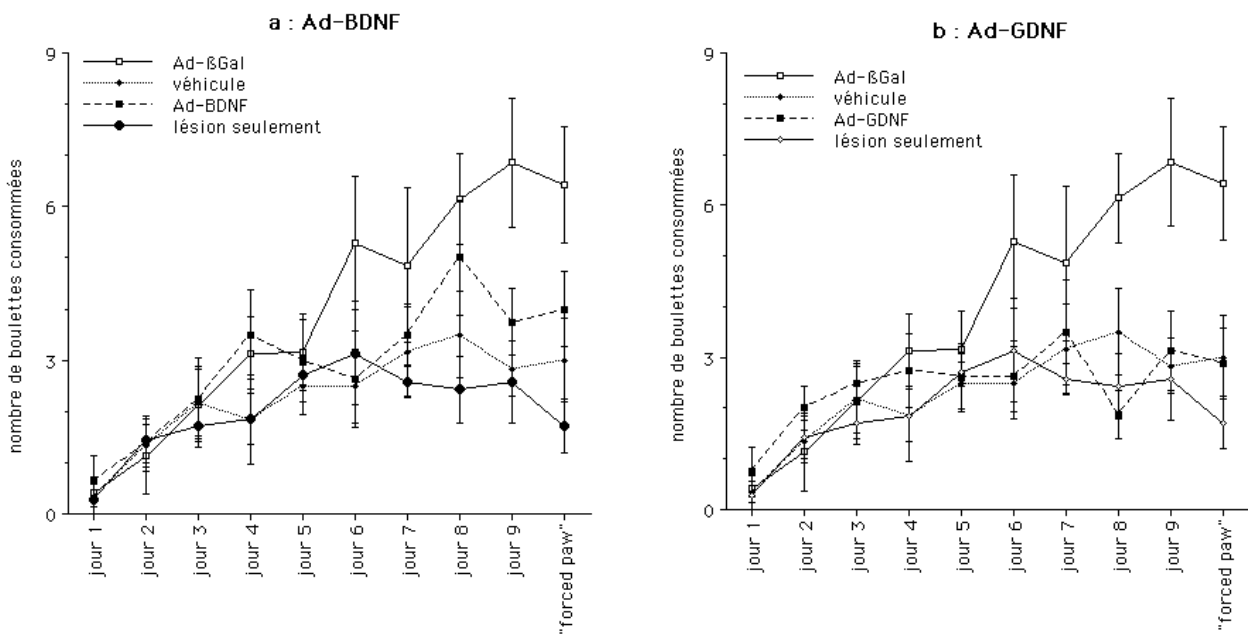


Figure 7 : effet du transfert des gènes du BDNF et du GDNF sur la lésion induite par l'acide quinolinique : test de "paw reaching".

Après une restriction alimentaire entraînant une perte de poids d'environ 10 à 15 %, les animaux sont placés dans l'appareil et peuvent alors attraper jusqu'à 21 boulettes de nourriture placées sur deux escaliers, un pour le membre antérieur droit, l'autre pour le gauche. Après 15 minutes, les rats sont retirés de l'appareil, et les boulettes consommées sont comptabilisées. Le test est effectué 10 jours de suite au cours desquels les rats apprennent la tâche. Le dixième jour (forced paw), un seul escalier est chargé en nourriture, obligeant ainsi le rat à utiliser son côté lésé.

7 A : résultat des groupes "Ad-BDNF" et contrôles. 7 B : résultat des groupes "Ad-GDNF" et contrôles. Sont représentés uniquement le nombre de boulettes consommées correspondant au côté lésé.

test de "paw reaching".

Une première expérience a été entreprise selon le protocole suivant :

- jour 0 : traitement des rats par injection intrastriatale d'adénovirus recombinant à la dose de  $0,5 \cdot 10^8$  pfu. Cinq groupes de rats ont été constitués : Ad-BDNF, Ad-GDNF, Ad- $\beta$ Gal, PBS (groupe "véhicule") et un groupe ne subissant aucune chirurgie (groupe "lésion seulement").

- Jour 14 : lésion de tous les animaux par injection intrastriatale de 210 nmoles d'acide quinolinique. Comparativement aux expériences précédentes, une quantité plus importante de toxine a été utilisée afin d'induire des lésions plus étendues, permettant une meilleure reproductibilité des tests comportementaux.

- Jour 28 à 37 : test de "paw reaching".

- Jour 44, 46 et 48 : analyse du comportement rotatoire induit par une dose de 1 mg d'apomorphine par kg.

- Jour 52 : analyse du comportement rotatoire induit par une dose de 5 mg d'amphétamine par kg.

Le test de paw reaching permet de juger la capacité des rats à réaliser une tâche complexe avec les membres antérieurs. Les rats, qui sont en restriction alimentaire, doivent attraper des boulettes de nourriture placées sur un escalier. Plus ils attrapent de boulettes, meilleures sont leur capacité motrice (Montoya *et al.*, 1991). Une description détaillée du test de "paw reaching" est fourni en annexe. Les résultats du test de "paw reaching" sont représentés sur la figure 7. Quoique statistiquement non significative, le test de "paw reaching" a montré une légère amélioration du groupe "Ad-BDNF" comparé aux groupes contrôles "véhicule" ( $P < 0,15$  aux jours 7, 8, 9 et 10 du test) et "lésion seulement" ( $P < 0,15$  aux jours 7, 8 et 9 ;  $P = 0,01$  au jour 10 ; figure 7a). En ce qui concerne le groupe GDNF, le test de "paw reaching" ne permet pas de mettre en évidence une amélioration due au traitement préalable par l'Ad-GDNF :  $P = 0,9$  et  $0,21$  au jour 10 comparé respectivement aux groupes contrôles "véhicule" et "lésion seulement" (figure 7b). De

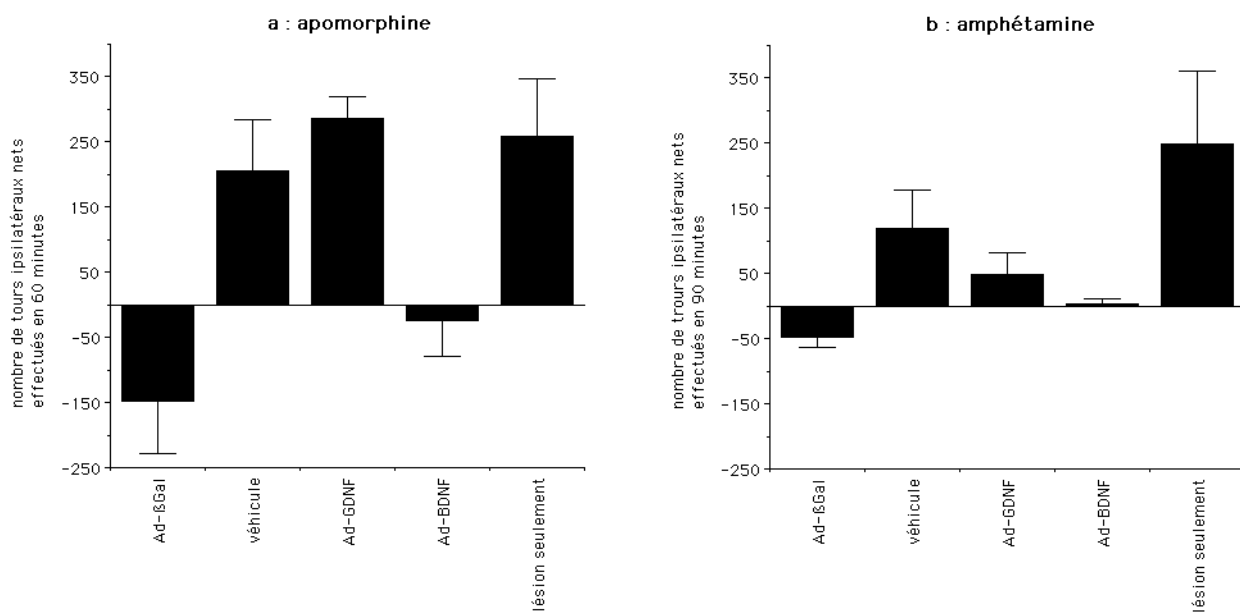


Figure 8 : effet du transfert des gènes du BDNF et du GDNF sur la lésion induite par l'acide quinolinique : comportement rotatoire induit par l'apomorphine et l'amphétamine.

Pour déterminer le comportement rotatoire induit par l'apomorphine, les rats ont reçu une dose de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  par injection sous-cutanée, puis ont été placés dans un rotamètre. Les tours effectués par les animaux ont été comptabilisés sur une période de 60 minutes. Les rats ont été soumis trois fois au test avec des intervalles de 48 heures entre chaque session. Les résultats des trois sessions ont été additionnés. Le graphe 8 A représente la moyenne des tours ipsilatéraux nets de chaque groupe (nombre de tours ipsilatéraux-nombre de tours contralatéraux).

Le comportement rotatoire induit par l'amphétamine a été mesuré sur une période 90 minutes, après injection intrapéritonéale d'une dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Le graphe 8 B représente la moyenne des tours ipsilatéraux nets de chaque groupe (nombre de tours ipsilatéraux-nombre de tours contralatéraux).

manière surprenante, ce sont les animaux préalablement traités par l'Ad- $\beta$ Gal qui ont montré les meilleures performances dans le test de "paw reaching". Cette amélioration de performance est statistiquement significative comparée à tous les autres groupes (pour les jours 9 et 10,  $P < 0,05$  comparé au groupe "Ad-BDNF" qui est le plus performant des groupes autres que "Ad- $\beta$ Gal").

Le test de comportement rotatoire en apomorphine a été effectué en trois sessions espacées par un intervalle de 2 jours. En effet, les rats ayant été soumis à une lésion excitotoxique striatale unilatérale présentent un comportement rotatoire ipsilatéral en réponse à un agoniste des récepteurs dopaminergiques comme l'apomorphine. Effectuer des sessions répétées à des intervalles courts permet de sensibiliser les animaux à l'action de l'apomorphine et d'augmenter ainsi le comportement rotatoire (Norman *et al.*, 1990 ; Schwarcz *et al.*, 1979). Les résultats des trois sessions ont été compilés et sont présentés dans la figure 8a. Ces résultats sont en bonne corrélation avec ceux du test de "paw reaching". On observe un comportement rotatoire proche de zéro ( $24 \pm 53$  tours pour 60 minutes) pour le groupe "Ad-BDNF" alors que les animaux des groupes "véhicule" et "lésion seulement" effectuent respectivement  $200 \pm 78$  tours ( $P=0,02$ ) et  $258 \pm 88$  tours ( $P=0,01$ ). Pour le groupe Ad-GDNF, le comportement rotatoire ( $285 \pm 35$ ) est similaire aux groupes "véhicules" et "lésion seulement". Une fois de plus, c'est pour le groupe Ad- $\beta$ Gal que l'on observe les meilleures performances :  $-147 \pm 81$  tours pour 60 minutes.

Le test de comportement rotatoire en amphétamine a donné des résultats sensiblement équivalents lorsque l'on compare les différents groupes (figure 8b). La seule différence notable est observée pour le groupe "Ad-GDNF" qui présente un comportement rotatoire un peu plus faible que les groupes "véhicule" ( $P=0,38$ ) et "lésion seulement" ( $P=0,03$ ). Cet effet du traitement préalable par l'Ad-GDNF pourrait être dû à l'action protectrice du GDNF sur les neurones dopaminergiques de la substance noire. En effet, il a été démontré que le transfert du gène du GDNF par injection intrastriatale d'adénovirus recombinant permet de réduire le comportement rotatoire induit par l'amphétamine à la suite d'une lésion rétrograde des neurones dopaminergiques de la substance noire (Bilang-Bleuel *et al.*, 1997).

En résumé, les résultats comportementaux semblent être en accord avec les résultats histologiques obtenus lors des expériences précédentes. Les animaux prétraités par l'Ad-GDNF présentent des performances sensiblement équivalentes aux animaux contrôles. A contrario, les animaux prétraités par l'Ad-BDNF ont des performances meilleures que les groupes contrôles "véhicule" et "lésion seulement". Cependant, le comportement des animaux du groupe "Ad- $\beta$ Gal" empêche de valider les résultats de cette expérience. L'analyse histologique qui est en cours permettra certainement d'expliquer le comportement des animaux du groupe "Ad- $\beta$ Gal".

## DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats démontrent que le transfert du gène du BDNF, et dans une moindre mesure du gène du GDNF, permet de protéger les neurones GABAergiques de projections du striatum dans le modèle de lésion excitotoxique par l'acide quinolinique.

Les mécanismes d'actions possibles du BDNF et du GDNF sur les neurones GABAergiques du striatum seront exposés plus loin dans la discussion générale de ce mémoire.

Les premiers résultats comportementaux, que nous avons exposés plus haut, sont encourageants. En effet, il montre que la neuroprotection obtenue par transfert du gène du BDNF est corrélée à une amélioration des animaux dans les tests moteurs. Cette amélioration est surtout sensible dans les tests de comportement rotatoire induit par l'apomorphine et l'amphétamine (figure 8).

Le test de "paw reaching" permet de mesurer l'habileté du rat avec ses membres antérieurs, en l'absence d'agents pharmacologiques. Le rat doit effectuer une tâche complexe, ce test rend donc compte non seulement des fonctionnalités motrices de l'animal, mais également de sa capacité à planifier un mouvement complexe. Le fait que les

animaux prétraités par l'Ad-BDNF ont des performances légèrement meilleures que les animaux "véhicule" et "lésion seulement" laisse penser que les neurones du striatum sont protégés de la dégénérescence, et conservent également leur fonction grâce au transfert du gène du BDNF.

Les résultats comportementaux des animaux prétraités par l'Ad-GDNF sont plus décevants. Malgré la protection relative que nous avons observée sur le plan histologique, les animaux du groupe Ad-GDNF ont réalisé des performances similaires aux rats des groupes "véhicule" et "lésion seulement" lors des tests comportementaux. Lors des expériences précédentes, l'analyse histologique semblait mettre en évidence une protection par le transfert du gène du GDNF, qui restait à la limite, mais en dehors, du seuil de signification statistique (tableau n° 3). L'effet neuroprotecteur du GDNF sur les neurones de projection du striatum dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique a déjà été mis en évidence, à la fois par injection de GDNF recombinant (Araujo et Hilt, 1997) et par greffe de cellules produisant du GDNF (Pérez-Navarro *et al.*, 1996). Le transfert du gène du GDNF devrait donc permettre d'observer cette protection sur le plan comportemental grâce aux tests de "paw reaching" et de comportement rotatoire. Cependant, une étude parue récemment permet de fournir un début d'explication aux mauvaises performances du groupe "Ad-GDNF" dans les tests comportementaux. Dans cette étude, Pérez-Navarro *et al.* décrivent une protection des neurones de projection du striatum dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique grâce à la greffe de cellules génétiquement modifiées pour produire du GDNF (Pérez-Navarro *et al.*, 1999a). Ces auteurs ont de plus utilisé une technique de marquage rétrograde par le fluorogold des neurones de la voie indirecte striato-pallidale et des neurones de la voie directe striato-nigrale. Cela a permis de mettre en évidence que seuls les neurones de cette dernière voie sont protégés par la greffe de cellules productrices de GDNF (Pérez-Navarro *et al.*, 1999a). Ainsi, on peut penser que protéger uniquement les neurones de cette voie n'est pas suffisant pour obtenir une amélioration comportementale des animaux, au moins pour les tests de "paw reaching" et de comportement rotatoire induit par l'apomorphine.

La seule amélioration sensible pour le groupe Ad-GDNF a été mise en évidence lors de l'étude du comportement rotatoire induit par l'amphétamine. Ce phénomène a déjà été décrit par Araujo et Hilt dans le même modèle après une injection intracérébroventriculaire de GDNF recombinant. Cependant, il est connu que le GDNF induit un bourgeonnement des terminaisons des neurones dopaminergiques de la substance noire (Lin *et al.*, 1993). Comme l'amphétamine agit en stimulant la libération de la dopamine par les terminaisons dopaminergiques, il est possible que l'effet observé lors de l'administration d'amphétamine soit dû à l'action du GDNF à la fois sur les neurones de projection du striatum et sur les neurones dopaminergiques de la substance noire.

Comme nous l'avons exposé précédemment, l'amélioration comportementale des animaux du groupe "Ad-BDNF" devra être validée par l'analyse histologique des cerveaux de ces animaux. Cette analyse sera également nécessaire pour expliquer les résultats observés dans le groupe "Ad-βGal". En effet, les résultats des tests comportementaux indiquent que c'est le traitement préalable par l'Ad-βGal qui permet la meilleure protection des neurones de projection du striatum (figures 7 et 8). Sans attendre les données histologiques, nous pouvons déjà fournir un début d'explication à ce phénomène. Des expériences menées par la suite au laboratoire ont montré que le stock d'Ad-βGal que nous avons utilisé lors de l'étude comportementale était fortement contaminé par des particules adénovirales compétentes pour la réplication (RCA). Il a été montré que les RCA peuvent être générées lors de la construction de l'adénovirus recombinant par recombinaison homologue en cellules 293 (Löchmuller *et al.*, 1994). Il est probable que l'injection intrastriatale d'une solution adénovirale fortement contaminée par des RCA induit une réaction inflammatoire très importante, qui pourrait par la suite inhiber la lésion par l'acide quinolinique.

Lors d'expériences plus anciennes, nous avons déjà remarqué une possibilité d'interaction entre l'inflammation provoquée par la chirurgie lors de l'injection du vecteur adénoviral et la lésion par l'acide quinolinique. En effet lorsque cette lésion est pratiquée moins d'une semaine après l'injection du vecteur, nous avons pu observer une protection

totale vis-à-vis de la lésion induite par l'acide quinolinique, aussi bien pour les groupes d'animaux ayant reçu un adénovirus facteur trophique ou contrôle, que pour le groupe "véhicule". Ainsi, l'effet protecteur du transfert du gène du BDNF dans ce modèle n'apparaît que lorsqu'on laisse un intervalle de temps suffisant entre le traitement neuroprotecteur et la lésion. Cela permet de s'affranchir du biais introduit par l'inflammation induite par la première injection intracérébrale.

Afin de mieux caractériser l'effet neuroprotecteur du transfert du gène du BDNF et du gène du GDNF, nous étudions actuellement cet effet à l'aide d'un autre modèle de Huntington et d'un autre vecteur, dérivé du lentivirus VIH. Les résultats préliminaires de ces projets en cours sont exposés dans le chapitre suivant.

Publication n°3 (Human Gene Therapy, sous presse) :

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-mediated protection of striatal  
neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease,  
as demonstrated by adenoviral gene transfer

*Alexis-Pierre Bemelmans, Philippe Horellou, Laurent Pradier, Isabelle Brunet, Philippe Colin et  
Jacques Mallet.*

## Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer.

Alexis-Pierre Bemelmans<sup>1</sup>, Philippe Horellou<sup>1</sup>, Laurent Pradier<sup>2</sup>, Isabelle Brunet<sup>1</sup>, Philippe Colin<sup>1</sup> and Jacques Mallet<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs, UMR C9923, Centre National de la Recherche Scientifique, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Bâtiment CERVI, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. <sup>2</sup>GenCell Rhône-Poulenc Rorer, Centre de Recherches de Vitry-Alfortville, 13 Quai Jules Guesde, 94403 Vitry-sur-Seine, France.

Correspondence should be addressed to Jacques Mallet, LGN – Bât CERVI, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: 33-1-42 17 75 32. E-mail: mallet@infobiogen.fr

*Running title: BDNF gene transfer in the rodent CNS*

### ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a genetic disorder leading to the degeneration of striatal GABAergic output neurons. No treatment is currently available for this devastating disorder, although several neurotrophic factors, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), have been shown to be beneficial for striatal neuron survival. We analyzed the effect of adenovirus-mediated transfer of the BDNF gene in a model of HD. Using a stereological procedure, three groups of rats were given an intrastriatal injection of adenovirus encoding BDNF,  $\beta$ -galactosidase or sham surgery. Two weeks after treatment, the animals were lesioned with quinolinic acid (QUIN), a toxin which induces striatal neuron death by an excitotoxic process. One month after the lesion, histological study revealed that striatal neurons were protected only in rats treated with the BDNF adenovirus. Volume measurements showed that the QUIN-induced lesions were 55% smaller in the BDNF adenovirus-treated group than in the  $\beta$ -galactosidase adenovirus-treated group ( $p < 0.05$ ), and the sham-treated group ( $p < 0.05$ ). To determine the survival of striatal GABAergic output neurons after the QUIN-induced lesion, we immunostained brain sections with DARPP-32, an antibody specific for striatal output neurons. Prior treatment with the BDNF adenovirus resulted in a cell survival of 64%, whereas that after  $\beta$ -galactosidase treatment was 46% ( $p < 0.05$ ), showing that the BDNF adenovirus protected the striatal neurons. These results indicate that transfer of the BDNF gene is of therapeutic value for Huntington's disease.

### OVERVIEW SUMMARY

Huntington's disease results from a progressive neurodegenerative process affecting primarily the neostriatum. The GABAergic output neurons are the

most sensitive cell type in this anatomical structure. Recently, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was shown to be a potent neurotrophic factor for striatal GABAergic neurons *in vitro* and *in vivo*. We investigated whether BDNF protected striatal neurons in a rodent model of Huntington's disease, by testing the effect of a recombinant adenovirus producing this neurotrophin in rats injected with quinolinic acid. BDNF was produced for at least six weeks after intrastriatal injection of the adenoviral vector. Most importantly, recombinant BDNF reduced the size of the quinolinic acid-induced lesion in the striatum and protected striatal GABAergic output neurons from the excitotoxic damage. Thus, *in vivo* BDNF gene transfer has potential for the neuroprotective treatment of Huntington's disease.

### INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant genetic disorder involving the neurodegeneration of primarily the striatal GABAergic output neurons (i.e. medium-sized spiny neurons). This results in excessive involuntary movements (chorea) accompanied by cognitive deficits and personality changes. In 1993, it was shown that HD is caused by the expansion of a polymorphic CAG/polyglutamine repeat located in the IT15 gene (The Huntington's Disease Research Collaborative Group, 1993). The protein encoded by IT15, huntingtin, is present throughout the central nervous system and in peripheral tissues, but neurodegeneration is restricted to striatal GABAergic output neurons (Sharp *et al.*, 1995 ; Trottier *et al.*, 1995). It is now established that expansion of the polyglutamine tract causes the intranuclear aggregation of the mutant huntingtin, known as neuronal intranuclear inclusion (Davies *et al.*, 1997 ; Ordway *et al.*, 1997). Inclusions are found in the brains of both patients (DiFiglia *et al.*, 1997) and transgenic mice bearing the mutated HD gene (Davies *et al.*, 1997), but their

contribution to the pathogenicity of the mutant huntingtin is unclear (Saudou *et al.*, 1998 ; Sisodia, 1998). Nevertheless, in two recent studies, it has been suggested that the expanded polyglutamine repeat-induced cell death might be due to activation of caspases, a family of pro-apoptotic proteins (Ona *et al.*, 1999 ; Sanchez *et al.*, 1999). Although these recent findings constitute progress towards the elucidation of the pathological mechanism, they have not yet led to any obvious treatment, and HD remains an incurable disease.

Several strategies are currently being explored to develop treatments for HD, including both restorative and preventive approaches. The restorative strategy involves the intracerebral grafting of fetal striatal cells and is undergoing clinical trials in France and the USA (Horellou and Mallet, 1998 ; Kopyov *et al.*, 1998). The development of a preventive treatment to protect neuronal cells from the neurodegenerative process would be of great value for a clinical application by preventing the onset of symptoms. Animal models that allow to test possible treatments have been set up. These are based on excitotoxic cell death, which is thought to be involved in the pathological development of HD. Thus, several models involve the use of excitotoxins to induce neuronal cell death mimicking the pattern of neurodegeneration observed in HD (DiFiglia, 1990). Quinolinic acid (QUIN) has been widely used in models of HD. QUIN acts on the NMDA receptor and if injected intrastrially, it reproduces the cell loss and neurochemical deficits of HD (Beal *et al.*, 1986). In this model of HD, various neurotrophic factors have been shown to be effective for the protection of striatal GABAergic output neurons. Nerve growth factor (NGF) (Martinez-Serrano and Björklund, 1996), ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Anderson *et al.*, 1996 ; Emerich *et al.*, 1997) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Araujo and Hilt, 1997) protect striatal GABAergic neurons from excitotoxic cell death *in vivo*. Several observations have suggested that brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a member of the neurotrophin family, protects striatal GABAergic output neurons. In striatal primary culture, BDNF increases the survival, soma size and branching point number of GABA-expressing neurons (Mizuno *et al.*, 1994 ; Ventimiglia *et al.*, 1995 ; Widmer and Hefti, 1994). The neuroprotective effect of BDNF has also been demonstrated in two *in vitro* models of HD: firstly, BDNF protects striatal cells exposed to an excitotoxic stress in culture (Nakao *et al.*, 1995) ; secondly, BDNF abolishes the apoptosis observed in striatal cells transfected with the coding sequence of the mutant huntingtin (Saudou *et al.*, 1998). Thus, determining the protective potential of BDNF in *in vivo* models of HD is of major importance.

In this study, we tested the effect of BDNF using a recombinant adenovirus. This vector was injected into the striatum of rats. Lesions were then produced two weeks later in the same area with QUIN.

The adenovirus-mediated transfer of the BDNF gene led to the strong expression of this neurotrophin gene in the rodent striatum, and the recombinant BDNF protected the striatal GABAergic output neurons from excitotoxic cell death induced by QUIN.

## METHODS

### *In vitro adenoviral gene transfer.*

Ad-BDNF and Ad-βGal stocks were obtained as previously described (Gimenez y Ribotta *et al.*, 1997 ; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1992). For *in vitro* infection, HeLa cells were plated at a density of  $5.10^5$  cells per well in 6-well culture plates and infected as described below. The culture medium (Dulbecco's modified eagle medium containing 10% fetal calf serum) was removed and cells were infected with either Ad-BDNF or Ad-βGal at a multiplicity of infection (MOI) ranging from 20 to 80 plaque-forming units (pfu) per cell in 0.5 ml of serum-free medium for one hour. After which, the culture medium was added back to the cells. Three days later, cells were extensively rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and were then incubated for 24 hours in fresh medium. The amount of BDNF in the culture medium was determined with the BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Primary striatal cultures were obtained by dissection of E14 rat fetuses lateral ganglionic eminence and subsequent culture in serum free condition, as previously described (Barkats *et al.*, 1996). This method of culture allow to obtain purified neurons (>95%) as demonstrated by immunocytochemistry against glial fibrillary acidic protein and neurofilament (Weiss *et al.*, 1986). The primary cells were plated in 12-well culture plates at a density of  $2.10^5$  cells per well and incubated for three days. They were then infected at a MOI of 100 pfu per cell as described for HeLa cells. Four days after infection, cells were fixed for 20 minutes with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. Immunological detection of calbindin was performed as described below in "Histological procedures". The anti-calbindin monoclonal antibody (Sigma) was used at a 1:5000 dilution. For each well, calbindin-positive cells were counted on twelve randomly selected microscope fields.

### *In vivo adenoviral gene transfer in a rat model of HD.*

Recombinant adenoviruses were diluted in PBS. Female Sprague-Dawley rats (Charles River, France) under ketamine/xylazine anesthesia, were injected in the left striatum with a total amount of  $5 \times 10^7$  pfu ( $0.25 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ ) in three equal aliquots of 1  $\mu\text{l}$  each in the head of the caudate putamen, at the following coordinates: 1.2 mm anterior to bregma ; 2.5 mm lateral to bregma ; 5, 4.6 and 4.2 mm ventral to the dural surface. Sham-treated rats were injected with PBS only. Two weeks later, QUIN (120 nmoles in 2  $\mu\text{l}$  PBS) was injected at a rate of  $0.4 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  at the same site (1.2 mm anterior to bregma ; 2.5 mm lateral to bregma ; 4.6 mm ventral to the dural surface).

#### *Quantification of BDNF in vivo.*

BDNF levels were determined on striatal lysates from rats injected as described above. Rats were sacrificed by chloral hydrate injection, striata were dissected and homogenized at 4°C in 500 µl of a lysis buffer containing 137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 1% NP40, 10% Glycerol, 1mM PMSF, 10 µg.ml<sup>-1</sup> aprotinin, 1 µg.ml<sup>-1</sup> leupeptin, and 0.5 mM Vanadate. After 15 minutes centrifugation at 13,000 g, BDNF was measured in the supernatant using BDNF Emax Immunoassay system (Promega).

#### *Histological procedures.*

Four weeks after the QUIN lesion, the rats were killed by deep anesthesia with chloral hydrate and transcardial perfusion with 100 ml of 0.9% NaCl, followed by 250 ml of ice cold 4% PFA in PBS. Brains were postfixed in the same fixative for one hour and were cryoprotected by immersion in 15% saccharose dissolved in PBS. Brains were then cut into 16-µm thick coronal sections with a cryostat and were stored at -80°C.

For *in situ* hybridization, an oligonucleotide probe complementary to the coding sequence of the FLAG peptide (Brizzard *et al.*, 1994) was synthesized (5'CTT CTA GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC GCC3') and radioactively labeled using <sup>35</sup>S dATP and terminal deoxynucleotidyl transferase (Promega) according to the manufacturer's instructions. For hybridization, sections were dehydrated and incubated overnight at 42°C in 50% formamide, 1x Denhardt's solution, 4x SSC, 100mM dithiothreitol, 10% dextran sulfate, 250 µg.ml<sup>-1</sup> *E coli* tRNA, 250 µg.ml<sup>-1</sup> poly A<sup>+</sup> RNA, 250 µg.ml<sup>-1</sup> salmon sperm DNA and 0.2 pmole of labeled oligonucleotide per section. Sections were then rinsed twice in 1x SSC for 15 minutes at 53°C, twice in 0.5x SSC for 15 minutes at 53°C, and once in 0.5x SSC for 15 minutes at room temperature. They were then dehydrated and dipped in Ilford K5 emulsion. Sections were exposed for two month, then developed in Kodak D19 developer, lightly counterstained with cresyl violet and mounted.

β-galactosidase activity was detected enzymatically by incubating the sections with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside as previously described (Barkats *et al.*, 1996). After two hours of incubation, the sections were counterstained with neutral-red and mounted.

For immunohistochemical detection of DARPP-32, endogenous peroxidase activity in the sections was quenched with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol. Subsequently, sections were preincubated in PBS containing 10% normal horse serum. Mouse monoclonal anti-DARPP-32 antibody (generously donated by Drs Greengard and Hemmings) was diluted 1:20,000 in the preincubation solution. The sections were incubated overnight at room temperature, and the primary antibody was detected using the Vectastain *Elite*

ABC kit (Vector Labs) according to the manufacturer's instructions. Peroxidase activity was detected with Vector SG substrate kit (Vector Labs).

#### *Lesion volume measurement and cell counting.*

Lesion volume and striatal volume were determined by camera lucida drawings of DARPP-32 immunostained sections taken every 400 µm from 2.2 mm anterior to bregma to 1.0 mm posterior to bregma.

The lesion and striatal areas of each section were integrated to obtain lesion and striatal volumes. Cells were counted on three sections located at the antero-posterior level where the lesion area was maximal. Using the PC-based Biocom software coupled to a Leitz microscope (Hirsch *et al.*, 1992), ipsi- and contralateral striata were encircled through a 4x objective, and, in this defined area, DARPP-32-positive cells were counted in 15 randomly selected square fields of 4x10<sup>4</sup> µm<sup>2</sup> through a 10x objective. This enabled us to deduce the total number of cells from the measurements of area and cell density.

#### *Statistical analysis.*

All values are expressed as means ±SEM. Groups were compared with Statview software by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé's post-hoc test, except for the data in Figures 6a and 6b for which an unpaired Student's *t*-test was used. In all analyses, the null hypothesis was rejected at the 0.05 level.

## RESULTS

### *Recombinant adenovirus harboring BDNF produces a functional protein.*

The recombinant vectors used in this study, Ad-BDNF and Ad-βGal, were derived from a human type 5 adenovirus with the E1 and E3 regions deleted. They encode rat BDNF and *E coli* β-galactosidase, respectively. The BDNF cDNA was inserted upstream from the coding sequence of FLAG (Brizzard *et al.*, 1994). This construct yields a BDNF-FLAG fusion protein which made it possible to distinguish the recombinant BDNF from the endogenous BDNF (Figure 1).

We investigated whether Ad-BDNF directed the synthesis of the BDNF protein by infecting Hela cells with various doses of Ad-BDNF. Four days after infection, the amount of BDNF in culture media was determined by ELISA assay. The smallest multiplicity of infection (MOI) used, 20 plaque-forming units (pfu) per cell, was sufficient for BDNF to be detected. Moreover, the amount of BDNF increased linearly with the MOI ( $r^2=0.975$ ;  $p=0.0001$ ), up to 18.5 ng of BDNF/5x10<sup>5</sup> cells/day for 80 pfu per cell, the highest MOI tested (Figure 2a).

We next assayed the biological activity of the recombinant BDNF. Primary striatal cultures obtained by dissection of the lateral ganglionic eminence of E 14 rat

fetuses were infected with either Ad-BDNF or Ad- $\beta$ Gal on day three (after plating). They were fixed on day seven and processed for calbindin immunohistochemistry. Calbindin-positive cells were counted and twice as many such cells were detected in the Ad-BDNF infected cultures as in the Ad- $\beta$ Gal-infected or non-infected cultures (Figure 2b).

#### *Experimental paradigm of the in vivo study.*

We tested the neuroprotective effect of BDNF using an excitotoxic rodent model of HD. Female Sprague-Dawley rats were assigned to three groups: Ad-BDNF treatment (n=10), Ad- $\beta$ Gal treatment (n=8) and sham treatment (n=8). As described in the methods, each rat received a stereotaxic injection in the neostriatum of Ad-BDNF, Ad- $\beta$ Gal or vehicle (PBS). Two weeks after treatment, two rats from the Ad-BDNF group were killed for evaluation of recombinant BDNF expression. At the same time, the remaining animals received a QUIN injection (120 nmoles) in the neostriatum. Four weeks later, the animals were killed and the lesion was studied histologically.

#### *In vivo expression of recombinant BDNF.*

*In vivo* expression of the BDNF transgene was analyzed by *in situ* hybridization six weeks after Ad-BDNF injection. An antisense oligonucleotide probe directed against the FLAG peptide coding sequence detected the BDNF-FLAG transcript in a large region of the neostriatum, surrounding the injection site (Figures 3b and 3d). The BDNF-FLAG transcript was also detected in the corpus callosum, mimicking the pattern of  $\beta$ -galactosidase staining in Ad- $\beta$ Gal-treated rats (Figures 3e and 3f). Expression of the transgene was stable over the time period studied because the amount of BDNF-FLAG mRNA in rats killed four weeks after the lesion were similar to those in two rats killed at the time of the QUIN lesion (data not shown). The BDNF-FLAG transcript was not detected on the contralateral side or in the striatum of Ad- $\beta$ Gal-treated rats.

To determine if recombinant BDNF expression, evidenced by anti-FLAG *in situ* hybridization, corresponds to an overexpression of BDNF in the striatum, the level of this protein was measured *in vivo*. Rats were injected in the striatum with either Ad-BDNF (n=5) or Ad- $\beta$ Gal (n=3) or vehicle (n=2). Two weeks later, animals were sacrificed, striata were dissected, and BDNF content of striatal lysates was quantified using an ELISA assay. The level of BDNF increased from  $6 \pm 1.3$  pg of BDNF/mg of protein in vehicle- and Ad- $\beta$ Gal-injected striata to  $16.6 \pm 2.7$  pg of BDNF/mg of protein in Ad-BDNF-injected striata ( $p < 0.01$ ).

#### *BDNF gene transfer reduces QUIN lesion size.*

The lesion induced by QUIN injection was examined on DARPP-32 immunostained sections. DARPP-32 (dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 Kd) is a marker for the soma and axons of striatal GABAergic output neurons (Ouimet *et al.*, 1984). The QUIN-induced lesion was defined as the

area devoid of immunoreactivity. Four weeks after QUIN injection, the rats were killed, cryostat serial sections encompassing the whole striatum were prepared, and one series of sections was processed for the immunohistochemical detection of DARPP-32. Lesions appeared smaller in the Ad-BDNF-treated group than in the Ad- $\beta$ Gal- and sham-treated groups (Figure 4). The lesion area was quantified for each rat by camera lucida drawings of sections taken every 400 micrometers through the neostriatum. Areas were then integrated to obtain striatal and lesion volume. This quantification (Figure 5a) showed that lesion volume for the Ad-BDNF-treated group ( $1.69 \pm 0.34$  mm<sup>3</sup>) was 55% smaller than that for the Ad- $\beta$ Gal-treated group ( $3.8 \pm 0.87$  mm<sup>3</sup>) and 75% smaller than that for the sham-treated group ( $6.24 \pm 1.76$  mm<sup>3</sup>). The lesions of the Ad-BDNF-treated group were significantly smaller than those of the other two groups ( $p < 0.05$ ), whereas the Ad- $\beta$ Gal and sham treated groups were not significantly different ( $p = 0.26$ ).

We studied the overall effect of the lesion on the striatum by determining the volume of this structure. Absolute striatal volume was measured (Figure 5b) and it was found that the QUIN lesion caused a shrinkage of the neostriatum that was more pronounced, although non significant ( $p = 0.11$ ), in the Ad- $\beta$ Gal-treated group ( $20.27 \pm 0.89$  mm<sup>3</sup>) than in the Ad-BDNF-treated group ( $22.27 \pm 0.75$  mm<sup>3</sup>). In the sham-treated group, the shrinkage was intermediate ( $21.01 \pm 1.35$  mm<sup>3</sup>;  $p = 0.43$  vs Ad-BDNF treatment;  $p = 0.66$  vs Ad- $\beta$ Gal treatment). Taken together, these results suggest that in the Ad-BDNF- and Ad- $\beta$ Gal-treated groups, the neostriatum shrinkage was due not only to the QUIN lesion, but also partly to the adenovirus injection which is associated with a certain degree of toxicity.

Histological processing may cause differences between animals. Therefore, the relative lesion volume, defined as the percentage of the total striatum occupied by the lesion, was calculated for each rat. The relative lesion volume in the Ad-BDNF-treated group was significantly smaller than those of the Ad- $\beta$ Gal- ( $p < 0.05$ ) and sham-treated groups ( $p < 0.05$ ; figure 5c). This confirmed the results obtained by absolute lesion volume measurement. The Ad- $\beta$ Gal and sham-treated groups were again not statistically different ( $p = 0.21$ ).

#### *Rescue of DARPP-32-positive neurons by BDNF gene transfer.*

The effect of recombinant BDNF on the QUIN lesion was examined at the cellular level by quantifying the survival of DARPP-32-positive neurons. For each rat, at the rostrocaudal level where the area of the QUIN lesion was maximal, three sections were selected and DARPP-32-positive neurons were counted on these sections on the ipsi- and contralateral sides. Cell density and striatal area were calculated for each rat and expressed as a percentage of the intact side (Figure 6). As previously observed with camera lucida drawings, the shrinkage of the neostriatum was more pronounced in the

Ad- $\beta$ Gal-treated group ( $87 \pm 1.5\%$ ) than in the Ad-BDNF-treated group ( $92.5 \pm 2\%$ ;  $p=0.03$  vs Ad- $\beta$ Gal treatment) whereas shrinkage in the sham-treated group ( $92 \pm 3\%$ ;  $p=0.49$  vs Ad-BDNF treatment) was similar to that in the Ad-BDNF-treated group (Figure 6b). In contrast, cell density measurements showed that DARPP-32-positive cells were only protected in the Ad-BDNF group ( $69 \pm 4\%$ ) and not in Ad- $\beta$ Gal ( $54 \pm 7\%$ ;  $p=0.04$  vs Ad-BDNF treatment) and sham ( $55 \pm 10\%$ ;  $p=0.12$  vs Ad-BDNF treatment) groups (Figure 6a). The total cell number was deduced from area and cell density measurement in each animal. Ad-BDNF was found to have significantly protected the medium spiny projection neurons of the neostriatum. We found that 46% ( $\pm 5\%$ ) of cells survived in Ad- $\beta$ Gal-treated animals, whereas 64% ( $\pm 4\%$ ) survived in Ad-BDNF-treated animals (Figure 6c,  $p=0.01$ ). In terms of total cell number, comparison between sham- and Ad-BDNF-treated animals resulted in a  $p$  value of 0.19. This lack of significance could be explained by the QUIN lesion variability which appeared much more pronounced in the sham-treated animals than in the adenoviral-treated animals.

## DISCUSSION

In this article, we have described the effective *in vivo* transfer of the BDNF gene using a recombinant adenovirus vector. In a rodent excitotoxic model of HD, we demonstrated that the adenovirus-mediated transfer of BDNF protected the medium-sized spiny neurons of the neostriatum, the principal target of neurodegeneration in HD. This is the first *in vivo* evidence that BDNF is of value for HD treatment.

### *Effect of BDNF gene transfer in vitro.*

BDNF has been reported to promote the differentiation of GABAergic neurons. In particular, it increases the number of calbindin immunoreactive cells in primary striatal cultures (Mizuno *et al.*, 1994; Ventimiglia *et al.*, 1995). Consistent with these observations, we found that the infection of primary striatal cultures with Ad-BDNF resulted in an increase in the number of calbindin-immunoreactive neuronal cells (Figure 2b). Thus, striatal cells produced the protein encoded by the transgene after adenovirus-mediated gene transfer. This result also demonstrated that the addition of the FLAG peptide to the carboxy-terminal part of the recombinant BDNF did not affect its biological activity.

### *Effect of BDNF gene transfer in an in vivo model of HD.*

Several observations suggest that BDNF is an important factor for mature striatal neurons and that it should therefore be considered as a putative therapeutic agent for HD. Endogenous BDNF and the mRNA coding for its high-affinity receptor TrkB have been detected in the adult neostriatum (Altar *et al.*, 1994;

Conner *et al.*, 1997). The endogenous BDNF is transported to the cortical nerve terminals by anterograde transport (Altar *et al.*, 1997), and the TrkB receptor is primarily located in the post-synaptic densities (Wu *et al.*, 1996). Moreover, BDNF has been reported to be implicated in the induction of the DARPP-32 phenotype in the developing striatum (Ivkovic *et al.*, 1997).

We tested the therapeutic value of BDNF for HD using an excitotoxic model of the disease obtain by intrastriatal injection of QUIN. This procedure reproduces the cell loss observed in HD and can be used to evaluate experimental treatments by comparing QUIN-induced lesion in treated and non-treated animals. Thus, this model of HD is highly relevant for testing experimental therapy, and we have shown here that the prior treatment by intracerebral injection of an adenovirus expressing the BDNF gene protected the striatal neurons from the QUIN-induced lesion. More recently, transgenic models of HD have been developed. In these models, despite the reduced life span and the behavioral abnormalities, there is no clear neuronal cell death (Price *et al.*, 1998) which makes them difficult to use for testing a neuroprotective approach. Nevertheless, they could be taken into account to test the ability of BDNF to prevent the neuronal dysfunction which occurs in these models.

The mechanism by which BDNF protects against excitotoxic insult is unknown. However, it has been suggested that the protection results from the action of BDNF on the transcription of calcium-binding proteins (Nakao *et al.*, 1995). Studies *in vitro* have shown that BDNF increases the expression of calbindin, calretinin and parvalbumin (Mizuno *et al.*, 1994; Ventimiglia *et al.*, 1995; Widmer and Hefti, 1994). Calbindin levels in BDNF knockout mice are also lower than normal (Jones *et al.*, 1994). As excitotoxicity challenged with an NMDA agonist, such as QUIN, are known to increase intracellular calcium concentration (reviewed in Choi, 1994), upregulation of the expression of calcium-binding protein levels may rescue striatal cells from excitotoxic cell death by increasing their capacity to buffer intracellular calcium (Mattson *et al.*, 1991).

The neuroprotective effect of Ad-BDNF treatment reported in this study could also be explained by the anti-apoptotic property of BDNF. Apoptotic cell death has been implicated in both HD and the QUIN-induced rat model of HD (Portera-Cailliau *et al.*, 1995; Ona *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1999). Although the effect of BDNF on anti-apoptotic proteins is not documented, BDNF was shown to counteract apoptosis in several models of neurodegeneration (Bhave *et al.*, 1999; Kaal *et al.*, 1997). In particular, in an *in vitro* model of HD, the apoptosis observed after transfection of primary striatal neurons with a polyglutamine construct was abolished when BDNF was added in the culture medium (Saudou *et al.*, 1998).

### *Efficiency of adenovirus-mediated transfer of the BDNF gene.*

The transfer of the BDNF gene in the QUIN

model of HD has previously been reported. However, although neural rescue tended to be greater in BDNF-treated animals, Martinez-Serrano and Björklund have described that the effects were not significant for several parameters, including lesion size and DARPP-32 neuron survival (Martinez-Serrano and Björklund, 1996). In another study by Frim *et al.*, it has been reported that exogenous BDNF has no effect on the excitotoxic lesion (Frim *et al.*, 1993). The lack of agreement of these two reports with our results may be due to differences in the gene transfer procedure.

In these studies, the BDNF gene was delivered by an *ex vivo* gene transfer method involving retroviral vectors. However, different types of transplanted cells were used for the two studies. Frim *et al.* used transplants of immortalized fibroblast cells, whereas Martinez-Serrano and Björklund used transplants of conditionally immortalized neural progenitor cells. The two studies confirm the importance of the local production of BDNF in that the immortalized fibroblasts remained at the injection site (i.e. the corpus callosum) and did not protect the neostriatum (Frim *et al.*, 1993), whereas conditionally immortalized neural progenitor cells migrated throughout the neostriatum, giving a mild protection (Martinez-Serrano and Björklund, 1996).

In this report, we used a gene transfer procedure consisting of the direct intracerebral injection of a recombinant adenoviral vector. This procedure leads to strong expression of the transgene in a large area around the injection site (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Thus, in the paradigm of neuroprotection by BDNF in the QUIN lesion model, the *in vivo* gene transfer method used here appears to be more efficient than *ex vivo* gene transfer. This may be because more BDNF is produced *in situ* after *in vivo* gene transfer, resulting in better diffusion of the factor. We and others have also demonstrated that the neuroprotection provided by the adenovirus-mediated transfer of genes encoding neurotrophic factors is not restricted to the transfected cells, but extends to neighboring cells (Baumgartner and Shine, 1997 ; Bilang-Bleuel *et al.*, 1997 ; Castel-Barthe *et al.*, 1996).

*Potential of adenoviral vectors for gene transfer.*

## REFERENCES

- ALTAR, C. A., CAI, N., BLIVEN, T., JUHASZ, M., CONNER, J. M., ACHESON, A. L., LINDSAY, R. M., and WIEGAND, S. J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* **389**, 856-60.
- ALTAR, C. A., SIUCIAK, J. A., WRIGHT, P., IP, N. Y., LINDSAY, R. M., and WIEGAND, S. J. (1994). *In situ* hybridization of trkB and trkC receptor mRNA in rat forebrain and association with high-affinity binding of [<sup>125</sup>I]BDNF, [<sup>125</sup>I]NT-4/5 and [<sup>125</sup>I]NT-3. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1389-405.
- ANDERSON, K. D., PANAYOTATOS, N., CORCORAN, T. L., LINDSAY, R. M., and WIEGAND, S. J. (1996). Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7346-51.

Consistent with previous studies (Bilang-Bleuel *et al.*, 1997), we report herein that a first generation adenoviral vector drove the *in situ* production of a therapeutic protein. However, this vector appeared to have a toxic effect on the cerebral parenchyma after intracerebral injection (Byrnes *et al.*, 1995). In our study, the striatum was slightly, but not significantly, smaller in Ad-βGal-treated animals than in sham-treated animals (Figures 5b and 6b). The striatal size measured for Ad-BDNF-treated animals suggests that the recombinant BDNF protects against both the QUIN lesion and adenoviral toxicity. The reasons for adenoviral toxicity are unclear, but several mechanisms, including the production of viral proteins and antigen-mediated cytotoxicity, are thought to be involved (Byrnes *et al.*, 1995 ; Byrnes *et al.*, 1996). Use of new-generation adenoviruses, which are less toxic and less immunogenic (Dedieu *et al.*, 1997), or of lentiviral vectors, which are efficient agents for gene transfer in the CNS (Blömer *et al.*, 1997), is likely to increase the therapeutic value of neurotrophic gene transfer. This type of vector, which should allow safe and sustained transgene expression, will be of particular value for testing transfer of the BDNF gene in preclinical animal models of HD such as 3-nitropropionic acid chronic intoxication of primates. These models will permit the evaluation of potential clinical benefits of BDNF gene transfer in restorative or neuroprotective approaches for HD over the longer term.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr M. Ghee for critical reading of the manuscript and Drs Greengard and Hemmings for giving us the DARPP-32 antibody. This work was funded by the European Community BIOMED2 Program (BMH 4.CT 96-1012), Centre National pour la Recherche Scientifique, Conseil Régional d'Ile-de-France, Association Française contre les Myopathies, and Rhône-Poulenc Rorer. A.-P. B. was supported by Fondation Marcel Mérier and Association Huntington France.

- ARAUJO, D. M., and HILT, D. C. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the excitotoxin- induced behavioral and neurochemical deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience* **81**, 1099-110.
- BARKATS, M., BEMELMANS, A.-P., GEOFFROY, M.-C., ROBERT, J.-J., LOQUET, I., HORELLOU, P., REVAH, F., and MALLET, J. (1996). An adenovirus encoding CuZnSOD protects cultured striatal neurones against glutamate toxicity. *NeuroReport* **7**, 497-501.
- BAUMGARTNER, B. J., and SHINE, H. D. (1997). Targeted transduction of CNS neurons with adenoviral vectors carrying neurotrophic factor genes confers neuroprotection that exceeds the transduced population. *J. Neurosci.* **17**, 6504-11.
- BEAL, M. F., KOWALL, N. W., ELLISON, D. W., MAZUREK, M. F., SWARTZ, K. J., and MARTIN, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* **321**, 168-71.
- BHAVE, S. V., GHODA, L., and HOFFMAN, P. L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J. Neurosci.* **19**, 3277-86.
- BILANG-BLEUEL, A., REVAH, F., COLIN, P., LOCQUET, I., ROBERT, J. J., MALLET, J., and HORELLOU, P. (1997). Intra-striatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8818-23.
- BLÖMER, U., NALDINI, L., KAFRI, T., TRONO, D., VERMA, I. M., and GAGE, F. H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol.* **71**, 6641-9.
- BRIZZARD, B. L., CHUBET, R. G., and VIZARD, D. L. (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* **16**, 730-5.
- BYRNES, A. P., RUSBY, J. E., WOOD, M. J. A., AND CHARLTON, H. M. (1995). Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neuroscience* **66**, 1015-24.
- BYRNES, A. P., MACLAREN, R. E., and CHARLTON, H. M. (1996). Immunological instability of persistent adenovirus vectors in the brain: peripheral exposure to vector leads to renewed inflammation, reduced gene expression, and demyelination. *J. Neurosci.* **16**, 3045-55.
- CASTEL-BARTHE, M. N., JAZAT-POINDESSOUS, F., BARNEOUD, P., VIGNE, E., REVAH, F., MALLET, J., and LAMOUR, Y. (1996). Direct intracerebral nerve growth factor gene transfer using a recombinant adenovirus: effect on basal forebrain cholinergic neurons during aging. *Neurobiol. Dis.* **3**, 76-86.
- CHOI, D. W. (1994). Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 162-71.
- CONNER, J. M., LAUTERBORN, J. C., YAN, Q., GALL, C. M., and VARON, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.* **17**, 2295-313.
- DAVIES, S. W., TURMAINE, M., COZENS, B. A., DIFIGLIA, M., SHARP, A. H., ROSS, C. A., SCHERZINGER, E., WANKER, E. E., MANGIARINI, L., and BATES, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-48.
- DEDIEU, J.-F., VIGNE, E., TORRENT, C., JULLIEN, C., MAHFOUZ, I., CAILLAUD, J. M., AUBAILLY, N., ORSINI, C., GUILLAUME, J. M., OPOLON, P., DELAERE, P., PERRICAUDET, M., and YEH, P. (1997). Long-term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J. Virol.* **71**, 4626-37.
- DIFIGLIA, M. (1990). Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci.* **13**, 286-9.
- DIFIGLIA, M., SAPP, E., CHASE, K. O., DAVIES, S. W., BATES, G. P., VONSATTEL, J. P., and ARONIN, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-3.

- EMERICH, D. F., WINN, S. R., HANTRAYE, P. M., PESCHANSKI, M., CHEN, E. Y., CHU, Y., MCDERMOTT, P., BAETGE, E. E., and KORDOWER, J. H. (1997). Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* **386**, 395-9.
- FRIM, D. M., UHLER, T. A., SHORT, M. P., EZZEDINE, Z. D., KLAGSBRUN, M., BREAKEFIELD, X. O., and ISACSON, O. (1993). Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions. *NeuroReport* **4**, 367-70.
- GIMENEZ Y RIBOTTA, M., REVAH, F., PRADIER, L., LOQUET, I., MALLET, J., and PRIVAT, A. (1997). Prevention of motoneuron death by adenovirus-mediated neurotrophic factors. *J. Neurosci. Res.* **48**, 281-5.
- HIRSCH, E., LEJEUNE, O., COLLIOT, G., CORKIDI, G., and TAJANI, M. (1992). Computer methods in nuclei cartography. In *Methods in Neurosciences*, P. Coon, (ed.: Academic Press), pp. 62-79.
- HORELLOU, P., and MALLET, J. (1998). Neuronal grafts for Huntington's disease. *Nat. Med.* **4**, 669-70.
- IVKOVIC, S., POLONSKAIA, O., FARINAS, I., AND EHRLICH, M. E. (1997). Brain-derived neurotrophic factor regulates maturation of the DARPP-32 phenotype in striatal medium spiny neurons: studies *in vivo* and *in vitro*. *Neuroscience* **79**, 509-16.
- JONES, K. R., FARINAS, I., BACKUS, C., and REICHARDT, L. F. (1994). Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* **76**, 989-99.
- KAAL, E. C., JOOSTEN, E. A., and BAR, P. R. (1997). Prevention of apoptotic motoneuron death *in vitro* by neurotrophins and muscle extract. *Neurochem. Int.* **31**, 193-201.
- KOPYOV, O. V., JACQUES, S., LIEBERMAN, A., DUMA, C. M., and EAGLE, K. S. (1998). Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients. *Exp. Neurol.* **149**, 97-108.
- LE GAL LA SALLE, G., ROBERT, J.-J., BERRARD, S., RIDOUX, V., STRATFORD-PERRICAUDET, L. D., PERRICAUDET, M., and MALLET, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* **259**, 988-90.
- MARTINEZ-SERRANO, A., and BJÖRKLUND, A. (1996). Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J. Neurosci.* **16**, 4604-16.
- MATTSON, M. P., RYCHLIK, B., CHU, C., and CHRISTAKOS, S. (1991). Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **6**, 41-51.
- MIZUNO, K., CARNAHAN, J., and NAWA, H. (1994). Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev. Biol.* **165**, 243-56.
- NAKAO, N., BRUNDIN, P., FUNA, K., LINDVALL, O., and ODIN, P. (1995). Trophic and protective actions of brain-derived neurotrophic factor on striatal DARPP-32-containing neurons *in vitro*. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* **90**, 92-101.
- ONA, V. O., LI, M., VONSATTEL, J. P., ANDREWS, L. J., KHAN, S. Q., CHUNG, W. M., FREY, A. S., MENON, A. S., LI, X. J., STIEG, P. E., YUAN, J., PENNEY, J. B., YOUNG, A. B., CHA, J. H., AND FRIEDLANDER, R. M. (1999). Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* **399**, 263-7.
- ORDWAY, J. M., TALLAKSEN, G. S., GUTEKUNST, C. A., BERNSTEIN, E. M., CEARLEY, J. A., WIENER, H. W., DURE, L. T., LINDSEY, R., HERSCH, S. M., JOPE, R. S., ALBIN, R. L., and DETLOFF, P. J. (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* **91**, 753-63.
- OUMET, C. C., MILLER, P. E., HEMMINGS JR, H. C., WALAAS, S. I., and GREENGARD, P. (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J. Neurosci.* **4**, 111-24.

- PORTERA-CAILLIAU, C., HEDREEN, J. C., PRICE, D. L., and KOLIATSOS, V. E. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.*, **15** 3775-87.
- PRICE, D. L., SISODIA, S. S., and BORCHELT, D. R. (1998). Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* **282**, 1079-83.
- SANCHEZ, I., XU, C. J., JUO, P., KAKIZAKA, A., BLENIS, J., and YUAN, J. (1999). Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* **22**, 623-33.
- SAUDOU, F., FINKBEINER, S., DEVYS, D., and GREENBERG, M. E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **95**, 55-66.
- SHARP, A. H., LOEV, S. J., SCHILLING, G., LI, S. H., LI, X. J., BAO, J., WAGSTER, M. V., KOTZUK, J. A., STEINER, J. P., LO, A., HEDDREEN, J., SISODIA, S., SNYDER, S. H., DAWSON T. M., RYUGO, D. K. and ROSS, C. A. (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* **14**, 1065-74.
- SISODIA, S. S. (1998). Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell* **95**, 1-4.
- STRATFORD-PERRICAUDET, L. D., MAKEH, I., PERRICAUDET, M., and BRIAND, P. (1992). Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J. Clin. Invest.* **90**, 626-30.
- THE HUNTINGTON'S DISEASE RESEARCH COLLABORATIVE GROUP (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-83.
- TROTTIER, Y., DEVYS, D., IMBERT, G., SAUDOU, F., AN, I., LUTZ, Y., WEBER, C., AGID, Y., HIRSCH, E. C., and MANDEL, J. L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat. Genet.* **10**, 104-10.
- VENTIMIGLIA, R., MATHER, P. E., JONES, B. E., AND LINDSAY, R. M. (1995). The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons *in vitro*. *Eur J. Neurosci.* **7**, 213-22.
- WEISS, S., PIN, J. P., SEBEN, M., KEMP, D. E., SLADDECZEK, F., GABRION, J., and BOCKAERT, J. (1986). Synaptogenesis of cultured striatal neurons in serum-free medium: a morphological and biochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 2238-42.
- WIDMER, H. R., and HEFTI, F. (1994). Neurotrophin-4/5 promotes survival and differentiation of rat striatal neurons developing in culture. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1669-79.
- WU, K., XU, J. L., SUEN, P. C., LEVINE, E., HUANG, Y. Y., MOUNT, H. T., LIN, S. Y., and BLACK, I. B. (1996). Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **43**, 286-90.

## FIGURES

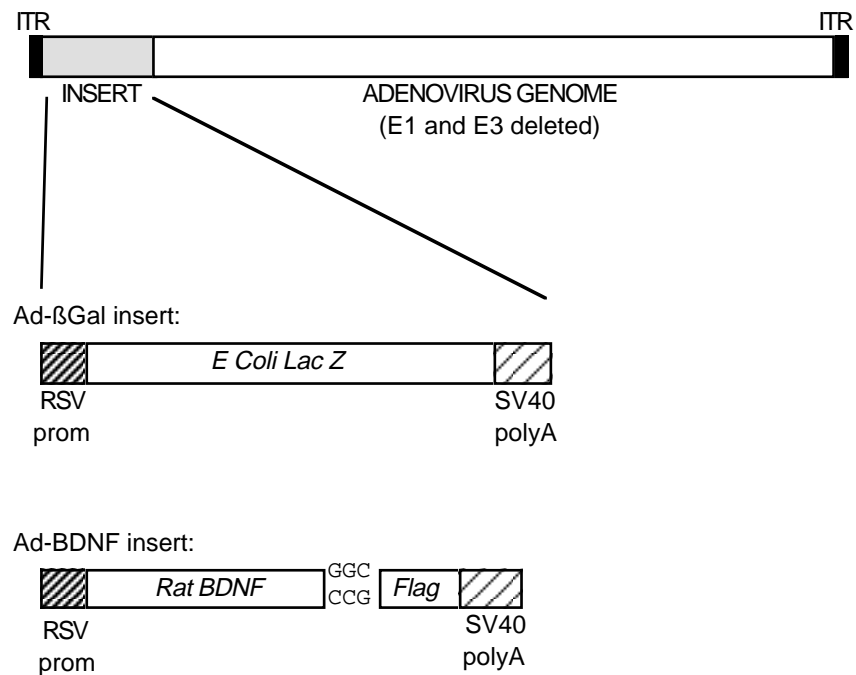


Figure 1: Map of the adenoviral constructs. *E. coli Lac Z* and rat BDNF genes are under the transcriptional control of the Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter. The rat BDNF gene is fused with the coding sequence (30 base pairs) of the FLAG peptide. BDNF and FLAG are separated by a glycine codon.

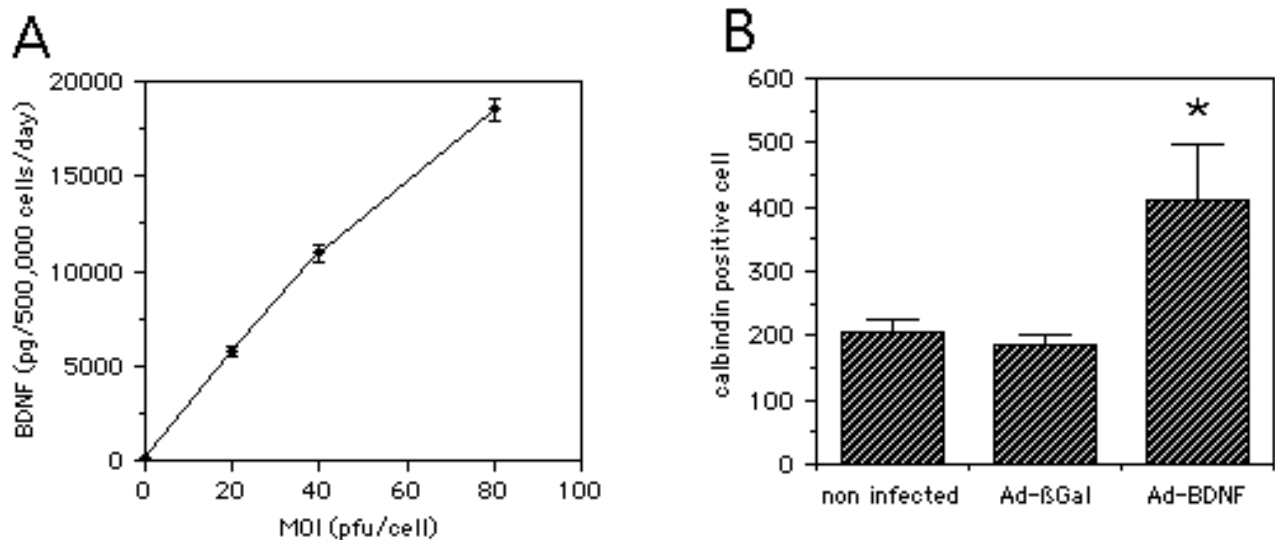


Figure 2: *In vitro* expression of recombinant BDNF. *a*, BDNF amount in the culture medium three days after infection of HeLa cells with various doses of Ad-BDNF. The quantity of BDNF detected increased linearly with MOI ( $r^2=0.975$ ,  $p=0.0001$ ). *b*, Effect of recombinant BDNF release on calbindin-positive cells after Ad-BDNF infection of primary striatal cultures. Four days after the infection with Ad-βGal or Ad-BDNF of primary striatal cells from sister cultures, calbindin-positive cells were detected. Values are means for total calbindin-positive cell counts determined for each well on 12 randomly selected microscope fields through a 10x objective. Similar results were obtained from three independent experiments. \*,  $p<0.001$  vs non-infected or Ad-βGal-infected cells.

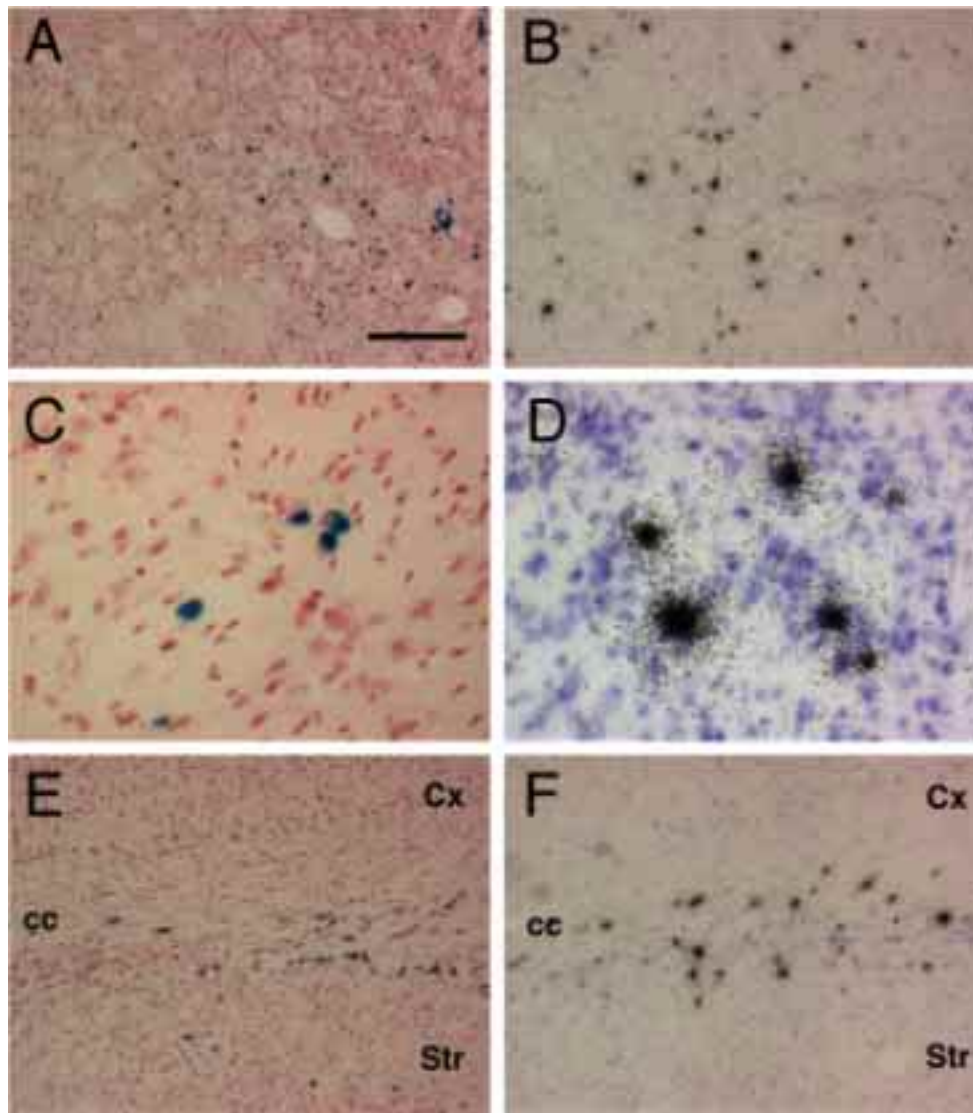


Figure 3:  $\beta$ -galactosidase (*a, c, e*) and recombinant BDNF (*b, d, f*) levels six weeks after a single intrastriatal injection of Ad- $\beta$ Gal or Ad-BDNF respectively.  $\beta$ -galactosidase activity was detected enzymatically with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside as a substrate, resulting in a blue color. Recombinant BDNF mRNA was detected by anti-FLAG *in situ* hybridization (see Methods). Transgene expression was detected throughout the caudate putamen (*a, b*) and the corpus callosum (*e, f*). *c-d*, higher magnification of  $\beta$ -galactosidase- and recombinant BDNF- containing cells, respectively. Due to the nuclear localizing sequence, only the nucleus of  $\beta$ -galactosidase-containing cells is stained, and these cells therefore appear much smaller than the cells containing recombinant BDNF. Cx: cortex ; cc: corpus callosum ; Str: striatum. Scale Bar: 200  $\mu$ m in *a, b, e* and *f* ; 50  $\mu$ m in *c* and *d*.

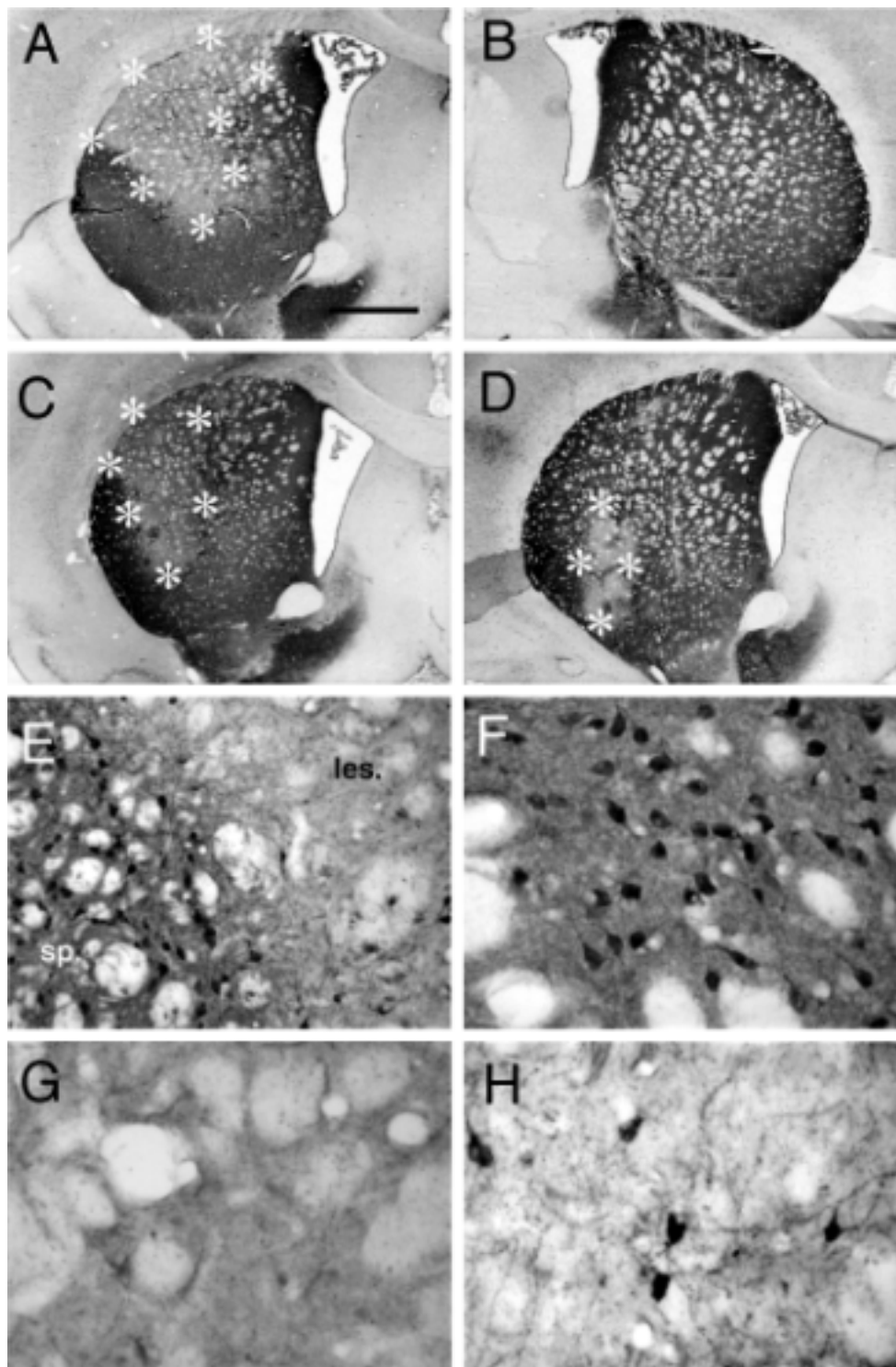


Figure 4: Representative photomicrographs showing DARPP-32-immunostained sections of sham- (*a*), Ad- $\beta$ Gal- (*c*, *e*, *g*), Ad-BDNF- (*d*, *f*, *h*) injected, or intact (*b*) striatum. *a*, *c*, *d*, The QUIN-induced lesion (indicated by asterisks) was clearly identified by the absence of DARPP-32 staining. The lesion was smaller in Ad-BDNF-treated animals than in Ad- $\beta$ Gal- or sham-treated animals. *e*: higher magnification of the boundary between the spared (*sp.*) and QUIN lesioned (*les.*) areas. *f*: higher magnification of the spared part of the neostriatum. *g*, *h*: higher magnification of the lesioned areas shown in *c* and *d* respectively. Scale bar: 1 mm in *a*, *b*, *c* and *d*; 200  $\mu$ m in *e*; 100  $\mu$ m in *f*, *g* and *h*.

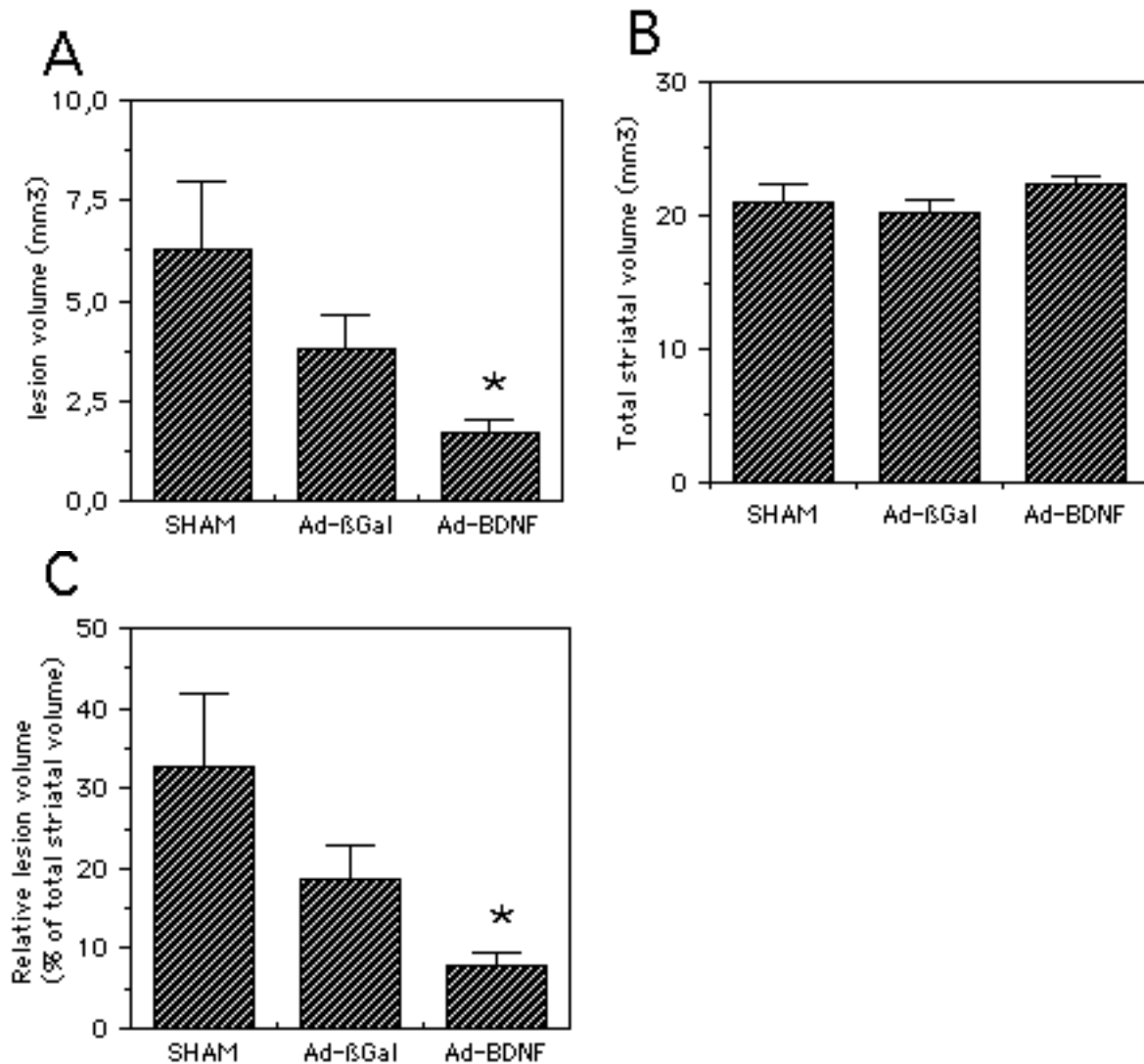


Figure 5: Quantification of lesion and striatal volume based on DARPP-32 immunostained sections. *a*, Absolute lesion volume deduced by integration of lesioned areas determined every 400  $\mu\text{m}$  across the neostriatum. *b*, Total striatal volume (lesioned + spared areas) expressed in  $\text{mm}^3$ , and determined on the same sections as for *a*. *c*, Relative lesion volume, expressed as a percentage of whole neostriatum volume. \* $p < 0.05$  versus Ad- $\beta\text{Gal}$ - and sham-treated groups.

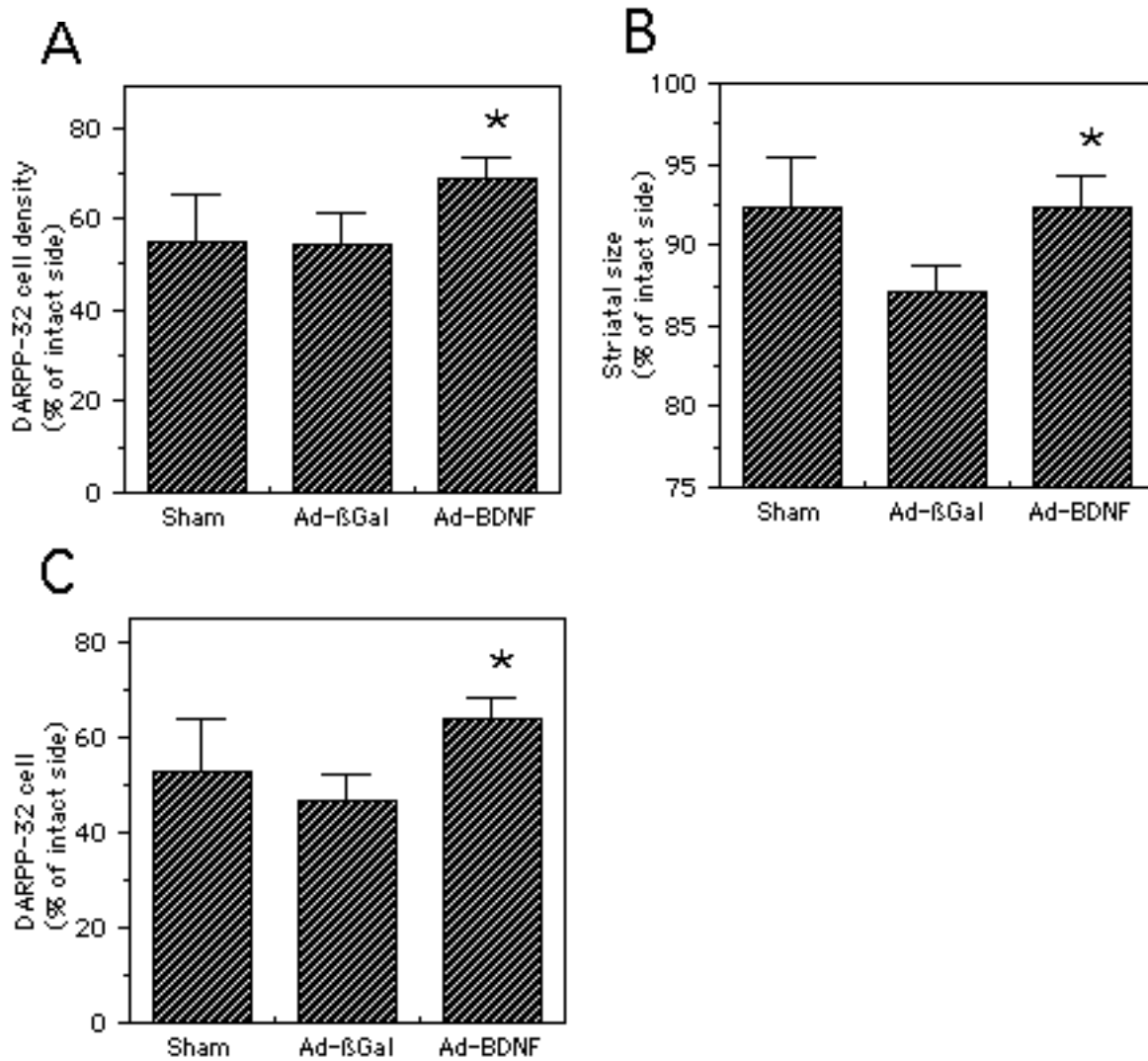


Figure 6: Rescue of DARPP-32-positive cells by adenovirus-mediated transfer of the BDNF gene. *a*, Density of the DARPP-32 cell population evaluated for each rat from three sections selected at the rostrocaudal level where lesion area was maximal. *b*, evaluation of the striatal size on the same three sections. *c*, Total number of cells in the DARPP-32-positive population, deduced from cell density and striatal area values. Data are expressed as a percentage of the intact side. \* $p < 0.05$  versus Ad-βGal. In *a* and *b* comparisons were made using Student's *t*-test.

## CONSTRUCTION DE VECTEURS LENTIVIRAUX RECOMBINANTS POUR LE BDNF ET LE GDNF, EFFET NEUROPROTECTEUR DANS LE MODELE DE LESION STRIATALE INDUITE PAR L'INJECTION SYSTEMIQUE D'ACIDE 3-NITRO-PROPIONIQUE

### CONSTRUCTION DE VECTEURS LENTIVIRAUX

Nous avons entrepris de construire des vecteurs lentiviraux recombinant pour le BDNF et le GDNF. En collaboration avec le laboratoire de P. Charneau, nous avons utilisé un vecteur lentiviral dérivés du VIH. Ce vecteur contient une séquence centrale (située entre le "Central Polypurine Tract" et le "Central Termination Sequence") qui est commune à tous les lentivirus et détermine un mécanisme de rétrotranscription différent de celui des oncorétrovirus classique. En conséquence, le produit final de la rétrotranscription des lentivirus est un ADN linéaire double brin possédant une structure dite "triplex central" où trois brins se chevauchent sur une centaine de nucléotides. Le rôle du "triplex central" semble déterminant dans l'étape d'import nucléaire du complexe de préintégration proviral.

Les ADNc du BDNF et du GDNF de rat ont été isolés par PCR à partir des plasmides préalablement construits pour la génération des adénovirus recombinants. L'utilisation de la PCR a permis de flanquer les ADNc des sites de restrictions nécessaires à leur intégration dans le plasmide contenant le génome lentiviral recombinant (respectivement *Bam*HI/*Eco*RI et *Bam*HI/*Sna*BI pour l'ADNc BDNF et l'ADNc GDNF). Dans ce plasmide, les ADNc du BDNF et du GDNF sont sous le contrôle transcriptionnel du promoteur CMV. La séquence codante de la GFP (green fluorescent protein) est placée en aval de l'ADNc, précédée d'un IRES (internal ribosome entry site) permettant sa traduction. Ainsi, les cellules transduites par cette construction expriment à la fois le transgène thérapeutique (BDNF ou GDNF) et un transgène rapporteur (GFP). Après sous-clonage dans ce vecteur, les séquences codantes du BDNF et du GDNF ont été vérifiées

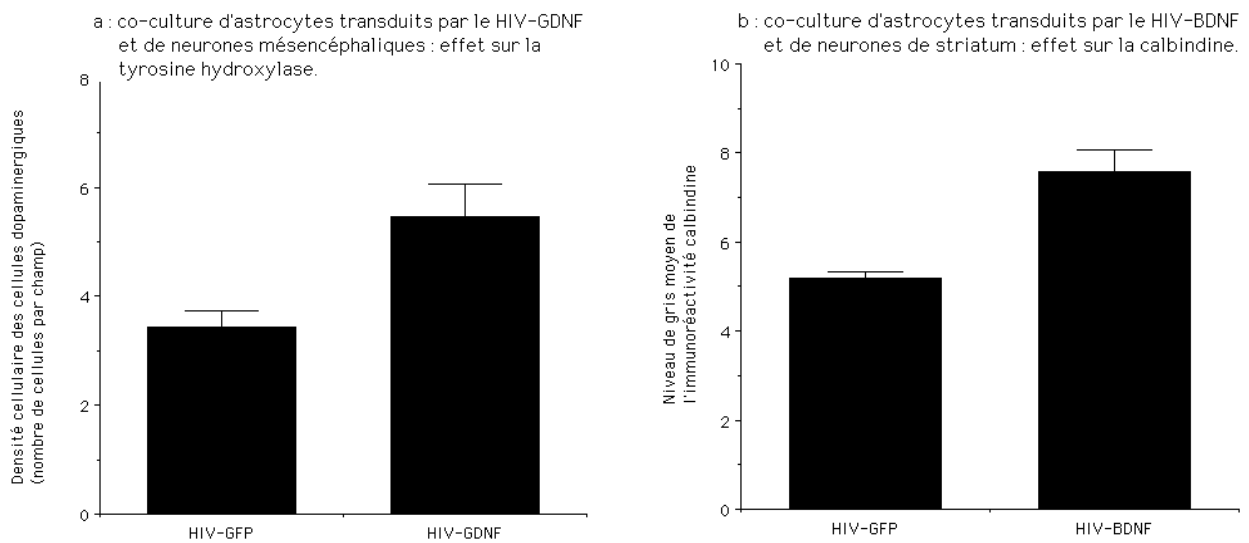


Figure 9 : efficacité fonctionnelle des facteurs trophiques transgéniques produits après transduction par le HIV-BDNF et le HIV-GDNF.

9 A : des neurones dopaminergiques embryonnaires de rats ont été cultivés sur une couche d'astrocytes transduits par le HIV-GFP ou le HIV-GDNF. Après une semaine de culture, les cellules ont été fixées, et les neurones dopaminergiques ont été mis en évidence à l'aide d'un anticorps primaire anti-tyrosine hydroxylase et d'un anticorps secondaire fluorescent. Le nombre de neurones dopaminergiques a ensuite été quantifié à l'aide du logiciel d'analyse d'image *SAMBA*. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de cellules par champ.

9 B : des neurones embryonnaires de striatum de rats ont été cultivés sur une couche d'astrocytes transduits par le HIV-GFP ou le HIV-BDNF. Après une semaine de culture, les cellules ont été fixées, et les neurones immunoréactifs pour la calbindine ont été détectés à l'aide d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy3. La densité importante de ces cellules n'a pas permis d'entreprendre leur comptage. La fluorescence moyenne a donc été quantifiée à l'aide du logiciel *SAMBA*. Les résultats sont exprimés en niveau de gris moyen pour chaque condition de culture.

afin de s'assurer que l'amplification par PCR n'avait pas introduit de mutation. Les vecteurs lentiviraux recombinants pour le BDNF (HIV-BDNF) ou pour le GDNF (HIV-GDNF) ont ensuite été produits par triple transfection dans la lignée cellulaire 293T, à l'aide de l'enveloppe VSV (figure 6), puis purifiés par ultracentrifugation. Les titres des stocks de vecteurs ont été estimés par dosage de la protéine P24.

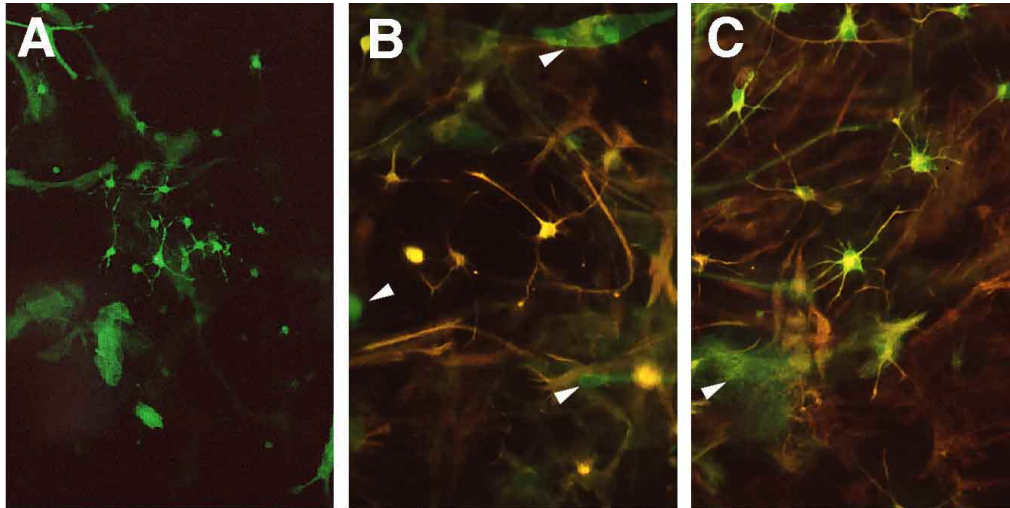
Nous avons vérifié que la transduction de cellules par ces vecteurs entraîne la production d'un facteur trophique transgénique fonctionnel par ces cellules. Nous avons transduit des astrocytes embryonnaires de rats en culture primaire par le HIV-BDNF ou le HIV-GDNF à raison de 200 ng de vecteur pour  $10^6$  cellules. Une semaine plus tard, le surnageant de ces cultures a été recueilli afin de doser par ELISA la quantité de facteur trophique produite. Les astrocytes transduits par le HIV-BDNF produisent 31,4 ng de BDNF/ $10^6$  cellules/24 heures et les astrocytes transduits par le HIV-GDNF produisent 61,4 ng de GDNF/ $10^6$  cellules/24 heures. Les astrocytes transduits par un lentivirus contrôle codant uniquement la GFP (HIV-GFP), ou non transduits, ne produisent pas de quantités détectables de BDNF ou de GDNF.

Nous avons ensuite vérifié l'efficacité fonctionnelle des facteurs trophiques transgéniques. Des neurones mésenchymaux embryonnaires de rats ont été mis en culture sur une couche d'astrocytes primaires préalablement infectés par le HIV-GDNF ou le HIV-GFP. Une semaine plus tard, les cultures ont été fixées, et les neurones dopaminergiques mis en évidence par immunomarquage de la tyrosine hydroxylase. La densité des cellules "tyrosine hydroxylase positives" a été estimée grâce au logiciel d'analyse d'image *SAMBA*. Cela a permis de mettre en évidence que la transduction des astrocytes par le HIV-GDNF favorise la survie des neurones dopaminergiques ( $P < 0,01$  comparé aux cultures transduites par le HIV-GFP, figure 9a). L'efficacité fonctionnelle du BDNF transgénique a été vérifiée de la même manière par co-culture d'astrocytes transduits et de neurones embryonnaires de striatum de rat. La quantification de l'immunoréactivité calbindine de ces cultures a démontré que la transduction des astrocytes par le HIV-BDNF induit l'expression de la calbindine ( $P < 0,005$  comparé aux cultures transduites par le HIV-GFP, figure 9b).

Ces données démontrent que la transduction de cellules par le HIV-BDNF ou le HIV-GDNF entraîne la production d'un facteur trophique transgénique fonctionnel par ces cellules.

#### TRANSFERT DU GENE DU BDNF DANS LE MODELE DE LESION PAR L'ACIDE 3-NITROPROPIONIQUE

En collaboration avec P. Hantraye et E. Brouillet (Orsay), nous étudions actuellement l'effet neuroprotecteur du transfert du gène du BDNF dans un modèle de maladie de Huntington obtenu par intoxication chronique par l'acide 3-nitropropionique (3-NP). Comme nous l'avons déjà exposé lors de l'introduction bibliographique, l'injection systémique de 3-NP provoque, chez le rat, une dégénérescence sélective des neurones de projection du striatum, avec une vulnérabilité liée à l'âge de l'animal (Beal *et al.*, 1993 ; Brouillet *et al.*, 1993). Un des problèmes liés à l'utilisation de ce modèle est la grande variabilité de réponse des animaux à la toxine. Lors d'intoxication chronique par le 3-NP, pour la même dose, les rats Sprague-Dawley peuvent présenter des lésions minimales, ou alors des lésions très étendues, pouvant même compromettre leur survie. Cette variabilité rend l'utilisation de ce modèle difficile dans des expériences de neuroprotection où il est nécessaire de comparer les animaux entre eux. Ce problème a été résolu par le groupe d'Orsay qui a montré que l'utilisation d'animaux consanguins, comme les rats de la souche Lewis, permet d'obtenir des lésions striatales parfaitement reproductibles. Nous avons donc entrepris l'étude de l'effet neuroprotecteur du transfert du gène du BDNF dans ce modèle qui peut être considéré comme étant plus proche de la maladie que le modèle excitotoxique pour deux raisons : (i) la mort cellulaire induite dans ce modèle est due à une baisse du métabolisme énergétique, ce qui a été observé chez les patients ; (ii) contrairement à l'injection d'acide quinolinique qui est un modèle aigu, la lésion par le 3-NP se développe sur plusieurs jours, ce qui reflète mieux le processus dégénératif.



*Figure 10 : astrocytes embryonnaires de rat en culture après transduction par le HIV-GFP.*

Des astrocytes embryonnaires de rats Lewis ont été transduits par le HIV-GFP afin d'être greffés. Après la greffe, l'excédant de cellules a été remis en culture à faible densité, puis fixé 4 jours plus tard pour étudier l'expression du transgène et déterminer le phénotype des cellules. *A* : détection de la GFP par un anticorps secondaire couplé au fluorochrome FITC. *B* : comarquage GFP (fluorochrome FITC) et GFAP (fluorochrome Cy3). *C* : comarquage GFP (fluorochrome FITC) et vimentine (fluorochrome Cy3).

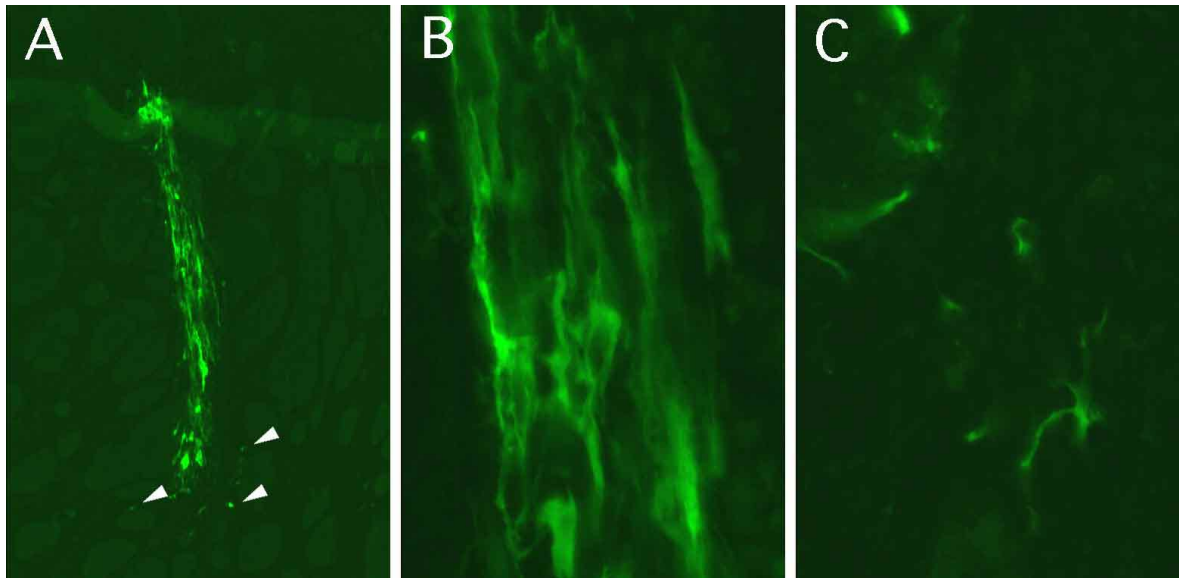
La détection de la GFP montre que toutes les cellules de la culture expriment le transgène. De ce fait, toutes les cellules exprimant la GFAP ou la vimentine expriment également la GFP. Cependant, certaines cellules de grande taille et étalées expriment la GFP mais pas la GFAP ou la vimentine (*B* et *C*, pointes de flèches).

Nous avons utilisé ce modèle d'intoxication chronique par le 3-NP et une stratégie *ex vivo* pour étudier l'effet neuroprotecteur du transfert du gène du BDNF :

- jour 0 : greffe intrastriatale d'astrocytes primaires chez le rats Lewis. Les animaux ont été répartis en deux groupes. Les animaux du groupe "expérimental" ont reçu une greffe d'astrocytes HIV-BDNF d'un côté et d'astrocytes HIV-GFP de l'autre. Les animaux du groupe "contrôle" ont reçu une greffe d'astrocytes non-modifiés d'un côté et une injection véhicule de l'autre. Ce protocole permet d'estimer l'effet de la greffe d'astrocytes HIV-BDNF pour chaque animal du groupe "expérimental", qui possède un contrôle interne, mais également de déterminer l'effet intrinsèque de la greffe d'astrocytes embryonnaires dans le modèle 3-NP grâce au groupe "contrôle".

- jour 14 : chaque animal est implanté avec une mini-pompe osmotique Alzet délivrant 38 mg de 3-NP/kg/jour. A partir de ce moment, les rats sont soumis à un suivi comportemental quotidien permettant d'évaluer l'évolution de la lésion striatale. Lorsque cette dernière est suffisamment développée, généralement 7 jours après l'implantation des pompes, les animaux sont sacrifiés pour l'analyse histologique.

Une première expérience a été réalisée selon ce protocole, et son analyse histologique est en cours. Des résultats préliminaires nous permettent cependant d'affirmer que la greffe d'astrocytes embryonnaires préalablement transduit *in vitro* par un lentivirus recombinant est un vecteur efficace pour le transfert de gène. Des astrocytes embryonnaires en culture primaire ont été transduits par l'HIV-GFP. Deux jours plus tard, les astrocytes ont été greffés dans le striatum de rats adultes. Après la greffe, l'excédant d'astrocytes a été remis quatre jours en culture, puis fixé et immunomarcqué pour étudier l'expression de la GFP et le phénotype des cellules. Cela nous a permis de montrer que la totalité des cellules exprime la GFP et ont un phénotype astrocytaire, mis en évidence par l'expression des marqueurs GFAP et vimentine (Figure 10). Les rats ont été sacrifiés deux semaines après avoir reçu la greffe d'astrocytes HIV-GFP. L'étude histologique a permis



*Figure 11 : greffe d'astrocytes embryonnaires de rats transduits par le HIV-GFP.*

Des astrocytes embryonnaires de rats Lewis transduits par l'HIV-GFP ont été greffés dans le striatum de rats Lewis adultes. Deux semaines après la greffe, les animaux ont été sacrifiés par perfusion. La GFP a été mise en évidence par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome FITC. *A* : au centre du striatum, la greffe forme une masse exprimant fortement la GFP ; quelques cellules ont migré hors de la greffe (pointes de flèches). *B* : fort grossissement du coeur de la greffe. *C* : fort grossissement de cellules ayant migré hors de la greffe. Echelle : 200  $\mu\text{m}$  pour *A* et 25  $\mu\text{m}$  pour *B* et *C*.

de montrer une bonne survie de ces cellules et une forte expression du transgène (figure 11). De plus, il apparaît qu'une quantité non négligeable de cellules transduites quitte la greffe pour s'intégrer dans le parenchyme cérébral de l'hôte (figure 11). L'étude de temps plus long permettra de mieux caractériser le comportement des astrocytes embryonnaires transduits par un lentivirus recombinant après greffe intrastriatale chez l'adulte.

Ces premiers résultats nous permettent de penser que la greffe d'astrocytes HIV-BDNF entraînera une forte production de cette neurotrophine *in vivo*. Ainsi, la greffe d'astrocytes HIV-BDNF dans le modèle de lésion par le 3-NP nous permettra de mieux caractériser l'effet neuroprotecteur du transfert du gène du BDNF sur les neurones de projection du striatum.

## **DISCUSSION GENERALE**

## QUEL TRANSGÈNE POUR LA MALADIE DE HUNTINGTON ?

Le choix du transgène pour la mise au point d'un traitement par transfert de gène de la maladie de Huntington dépend en premier lieu du type de traitement que l'on souhaite développer. Durant le travail qui fait l'objet de ce mémoire, nous avons choisi d'explorer les deux approches possibles, restauratrice et neuroprotectrice.

### THERAPIE GENIQUE RESTAURATRICE

Nous avons étudié la faisabilité d'une approche par greffe de cellules productrices de GABA dans un modèle de la maladie de Huntington obtenu par injection intrastriatale d'acide iboténique. Ce modèle de lésion, qui provoque la mort des neurones GABAergiques du striatum et, par voie de conséquence, entraîne une chute de l'immunoréactivité GAD dans cette structure, nous a permis de démontrer la faisabilité du transfert du gène de la GAD par une stratégie *ex vivo*. Ce type d'approche devrait permettre de restaurer le niveau de GABA qui chute lors de la maladie de Huntington, à la fois dans le striatum, mais également au niveau de ses cibles, globus pallidus et substance noire. Dans ce modèle de lésion, une amélioration comportementale a pu être apportée par l'implantation d'un polymère ayant la capacité de libérer du GABA sur une quinzaine de jours (Rozas *et al.*, 1996). Cependant, les tests comportementaux utilisés lors de cette étude (comportement rotatoire induit par l'amphétamine et activité locomotrice nocturne spontanée) ne permettent pourtant pas de juger de la capacité des rats à effectuer des tâches motrices complexes. Pour mener à bien une telle étude, des tests plus complexes, comme le "paw reaching" sont requis. Cependant, leur étude nécessite une libération de GABA à long terme : après avoir récupéré de l'opération, les rats doivent être soumis à une diète de trois jours avant de pouvoir commencer le test qui dure un minimum de dix

jours. L'utilisation de greffe de cellules génétiquement modifiées pour produire et libérer du GABA, grâce au transfert du gène de la GAD, permettra d'obtenir une libération locale de GABA sur une période suffisamment longue pour mener à bien ces études.

Pour des raisons que nous avons exposées précédemment (Résultats, chapitre 1, page 79) et qui tiennent à l'organisation en série des circuits GABAergiques, une thérapie restauratrice par apport systémique d'un analogue du GABA n'est pas envisageable pour la maladie de Huntington (Isacson *et al.*, 1991). Seul l'apport local de GABA pourrait apporter une solution thérapeutique. Cet apport local peut être réalisé par implantation intracérébrale de mini-pompes, comme les polymères utilisés par Rozas *et al.*, ou par une stratégie *ex vivo*, comme le système que nous avons développé. Cette deuxième méthode serait plus appropriée dans le cas d'une application clinique car, à la suite d'une intervention unique consistant à greffer les cellules productrices de GABA, elle permet d'obtenir une libération à long terme de GABA. L'étude de cette stratégie dans différents modèles de la maladie de Huntington permettra d'évaluer l'importance d'une libération régulée du GABA pour l'obtention d'une récupération fonctionnelle.

Dans le cadre d'un traitement de type restaurateur, l'effet des greffes de cellules striatales embryonnaires est déjà bien caractérisé dans les modèles expérimentaux de la maladie. Il a été montré que la greffe de ces cellules permet la reconstruction d'une voie cortico-striato-pallidale fonctionnelle chez le rat (Björklund *et al.*, 1994b). Sur cette base, des essais cliniques sont en cours. L'importante somme de données bibliographique décrivant l'effet des greffes de cellules striatales embryonnaires dans les modèles expérimentaux de la maladie de Huntington pourra fournir une base pour l'évaluation des greffes de cellules productrices de GABA. Cela permettra de déterminer si la greffe de ces cellules peut représenter une alternative à la greffe de cellules striatales embryonnaires qui présente des limitations en termes de quantité et de reproductibilité du matériel utilisé pour la greffe.

Enfin, l'étude chez le rat de la différenciation des greffes de cellules striatales embryonnaires montre la reconstruction par ces cellules de la voie striato-pallidale, mais pas de la voie striato-nigrale (Björklund *et al.*, 1994b). Les essais cliniques qui sont en cours

de réalisation permettront de savoir si l'on observe le même phénomène chez les patients, et si la reconstruction de la voie striato-pallidale suffit à améliorer les fonctions motrices et cognitives des patients. Dans le cas contraire, on pourrait utiliser de manière conjointe la greffe de cellules striatales embryonnaires et la greffe de cellules génétiquement modifiées pour produire du GABA. On peut en effet envisager un effet synergique, la première permettant la reconstruction d'une voie striato-pallidale fonctionnelle, la seconde apportant du GABA au niveau de la *pars reticulata* de la substance noire.

## THERAPIE GENIQUE NEUROPROTECTRICE

Dans le cas de la maladie de Huntington, le développement d'une thérapie neuroprotectrice est une idée particulièrement attractive. En effet, du fait de la nature génétique de la maladie et de la pénétrance complète de la mutation, il est possible de prédire qui développera la maladie dans les familles atteintes. Les symptômes apparaissant la plupart du temps à l'âge adulte, il est donc possible d'intervenir de manière préventive.

### **Transfert d'un gène neuroprotecteur : la superoxyde dismutase**

Nous avons étudié l'effet neuroprotecteur du transfert du gène de la superoxyde dismutase dans un modèle de dégénérescence neuronale *in vitro* induit par le glutamate. Cela nous a permis de montrer que la surexpression de la superoxyde dismutase par des neurones de striatum en culture primaire permet de protéger totalement ces neurones de la toxicité due au glutamate. Le vecteur adénoviral que nous avons utilisé pour réaliser le transfert du gène de la superoxyde dismutase, l'Ad-hCuZnSOD, a été utilisé dans d'autres

modèles, ce qui a permis de mettre en évidence ces capacités neuroprotectrices dans des approches *in vitro* (Barkats *et al.*, 1999) et *ex vivo* (Barkats *et al.*, 1997). Cependant, comme nous l'avons déjà souligné (résultats, chapitre 2, page 101), obtenir un bénéfice thérapeutique à la suite du transfert du gène de la SOD semble difficile pour le moment. En effet, pour obtenir une neuroprotection sensible, il faudrait transduire une très large proportion des neurones de projection du striatum, condition qui ne peut être remplie par les vecteurs actuellement disponibles.

### **Transfert de gènes de facteurs neurotrophiques**

Nous avons étudié l'effet du transfert des gènes du BDNF et du GDNF dans des approches neuroprotectrices. Les facteurs neurotrophiques sont des candidats très intéressants pour le développement de traitements pour les maladies neurodégénératives. Cela est encore plus vrai pour la maladie de Huntington qui se prête bien à un traitement neuroprotecteur. Plusieurs facteurs neurotrophiques sont potentiellement intéressants. Parmi eux, les plus étudiés dans les modèles expérimentaux de la maladie sont sans doute le NGF et le CNTF. L'efficacité de ce dernier a été mise en évidence dans des modèles de type excitotoxique lorsqu'il est apporté sous forme de protéine recombinante (Anderson *et al.*, 1996), ou par une méthode *ex vivo* utilisant des cellules encapsulées et génétiquement modifiées pour produire du CNTF (Emerich *et al.*, 1997a ; Emerich *et al.*, 1996). Ces études, menées sur le rat, ont été reproduites sur des primates (Emerich *et al.*, 1997b).

Les études portant sur le NGF ont montré que ce dernier apporté de manière *ex vivo* est capable de protéger les neurones du striatum dans un modèle de lésion excitotoxique (Frim *et al.*, 1993a ; Frim *et al.*, 1993b ; Martinez-Serrano et Björklund, 1996 ; Schumacher *et al.*, 1991). Cependant, aucune de ces études ne rapporte une amélioration comportementale des animaux. Il est possible que le NGF permette une survie des neurones sans que leur fonction reste intègre. Cela semble suggéré par l'étude de Frim *et*

*al.* qui démontre que, après traitement par le NGF, la zone du striatum soumise à un stress mis en évidence par le marqueur HSP72, est beaucoup plus grande que celle où l'on observe effectivement de la mort cellulaire (Frim *et al.*, 1993b).

Plus récemment, le BDNF et le GDNF ont suscité un intérêt important dans le cadre de la maladie de Huntington. Dans un premier temps, il est apparu que le BDNF ne semblait capable de protéger les neurones de projection du striatum que de manière partielle (Frim *et al.*, 1993a ; Martinez-Serrano et Björklund, 1996). Les travaux que nous avons réalisés (résultats, chapitre 3, page 110) ont permis d'une part de confirmer cette protection apportée par le BDNF, d'autre part de démontrer qu'une neuroprotection par transfert de gène direct est possible dans le modèle de lésion excitotoxique striatale. Ces résultats sont renforcés par une publication récente qui montre que la greffe intrastriatale de cellules productrices de BDNF induit l'augmentation de la taille du soma des neurones du striatum exprimant l'ARNm de la préprotachykinine A, le précurseur de la substance P, et prévient les dommages induits par l'injection d'acide quinolinique (Pérez-Navarro *et al.*, 1999b).

Le GDNF a fait l'objet de plusieurs études appliquées à des modèles expérimentaux de la maladie de Huntington. Il a été montré que ce facteur trophique induit la protection des neurones de projection du striatum dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique (Araujo et Hilt, 1997), et dans le modèle de lésion par l'acide 3-nitropropionique (Araujo et Hilt, 1998). Cependant, nos résultats obtenus après transfert du gène du GDNF dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique indiquent que cette protection par le GDNF ne semble que partielle (résultats, chapitre 3, page 112). Cela est confirmé par une étude publiée récemment, et qui démontre que seuls les neurones de la voie striato-nigrale sont protégés par le GDNF (Pérez-Navarro *et al.*, 1999a).

La récapitulation de ces études ayant pour but de développer un traitement neuroprotecteur pour la maladie de Huntington à l'aide de facteurs connus pour leurs propriétés trophiques sur différentes populations neuronales appelle plusieurs commentaires.

Premièrement, la plupart de ces études ont été réalisées à l'aide d'un modèle excitotoxique. Bien que ce modèle reproduise de nombreuses caractéristiques de la maladie de Huntington, il ne reflète pas un processus neurodégénératif progressif mais plutôt une lésion aiguë. Il est donc important de confirmer ces résultats dans des modèles plus progressifs. C'est le but que nous poursuivons actuellement en utilisant le modèle de lésion du striatum par intoxication chronique par l'acide 3-nitropropionique. Dans cette optique, les modèles transgéniques de la maladie présentent également un grand intérêt. Cependant, les données concernant la caractérisation de ces modèles paraissent pour le moment insuffisantes si l'on souhaite les utiliser pour tester des traitements expérimentaux. En effet, dans ces modèles, non seulement la perte neuronale est difficile à mettre en évidence, mais de plus le processus conduisant à la mort cellulaire n'est pas exactement connu (Price *et al.*, 1998 ; Reddy *et al.*, 1999). Actuellement, les modèles pharmacologiques restent donc les mieux caractérisés et les plus faciles d'emploi.

Deuxièmement, le mécanisme d'action et le rôle exact des facteurs trophiques sont souvent mal connus. Dans le cas du BDNF, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer son effet neuroprotecteur dans le modèle de lésion par l'acide quinolinique. Cet effet pourrait être dû à l'induction de l'expression des protéines liant le calcium par le BDNF. La cellule aurait alors une meilleure capacité à tamponner le calcium intracellulaire, elle deviendrait ainsi plus résistante à l'excitotoxicité (Nakao *et al.*, 1995). L'effet neuroprotecteur du BDNF pourrait également passer par un mécanisme anti-apoptotique. Il a été montré que la lésion par l'acide quinolinique entraîne une mort par apoptose (Portera-Cailliau *et al.*, 1995), et que le BDNF a une action anti-apoptotique dans différents modèles de neurodégénérescence (Bhave *et al.*, 1999 ; Kaal *et al.*, 1997), en particulier dans celui induit par la transfection de culture primaire de striatum par une version mutée du gène IT15 (Saudou *et al.*, 1998). En ce qui concerne le GDNF, il a été récemment montré que ses récepteurs, c-ret et GFR-alpha1, sont exprimés dans le striatum (Pérez-Navarro *et al.*, 1999a). Bien que faible, cette expression augmente lors d'une lésion par l'acide quinolinique (Pérez-Navarro *et al.*, 1999a). Cette expression des récepteurs du GDNF permet d'expliquer l'effet protecteur de ce facteur trophique (résultats, chapitre 3, page

112 ; Araujo et Hilt, 1997 ; Araujo et Hilt, 1998 ; Pérez-Navarro *et al.*, 1999a ; Pérez-Navarro *et al.*, 1996). Cependant, les mécanismes intracellulaires induits par le GDNF et permettant la protection vis-à-vis des excitotoxines restent flous.

Enfin, on peut se demander si les facteurs trophiques agissent directement sur les neurones de projection du striatum ou indirectement, en stimulant une autre population cellulaire qui apportera en retour un support trophique aux neurones de projection du striatum. Cette dernière possibilité semble être le cas en ce qui concerne le NGF et le CNTF. En effet, l'expression des récepteurs du NGF, p75<sup>NTR</sup> et TrkA, ne peut être mise en évidence au niveau des neurones de projection du striatum. De plus l'effet neuroprotecteur du NGF n'est sensible que si son administration intervient plusieurs jours avant la lésion (Martinez-Serrano *et al.*, 1995). Dans le cas du CNTF, on observe le même délai, entre l'administration du facteur et la lésion par la toxine, nécessaire à la mise en évidence de l'effet neuroprotecteur (Anderson *et al.*, 1996 ; Emerich *et al.*, 1996). Ce délai plaide en faveur d'un mécanisme d'action indirect. Dans le cas du GDNF, la situation semble quelque peu différente. Contrairement au CNTF et au NGF, on observe une protection des neurones de projection du striatum lorsque le GDNF et la toxine sont administrés de manière concomitante (Araujo et Hilt, 1997 ; Araujo et Hilt, 1998), ce qui semble indiquer que le GDNF agit directement sur les neurones de projection du striatum. Enfin, les données accumulées sur l'expression du BDNF et de son récepteur TrkB dans le striatum suggèrent une action directe de cette neurotrophine sur les neurones de projection du striatum. Il a été montré que le BDNF est impliqué dans l'établissement du phénotype des neurones de projection du striatum lors du développement de cette structure (Ivkovic *et al.*, 1997). De plus le BDNF est présent dans le striatum chez l'adulte où il provient des neurones corticaux par transport antérograde (Altar *et al.*, 1997). Le récepteur TrkB est quant à lui localisé au niveau post-synaptique, c'est-à-dire sur les neurones de projection du striatum (Wu *et al.*, 1996). Cela indique que le BDNF doit avoir une importance fonctionnelle pour les neurones du striatum.

En résumé, les ou les mécanismes cellulaires induits par les facteurs trophiques cités

plus haut et expliquant leur effet protecteur dans les modèles de neurodégénérescence sont mal connus. Cela n'empêche pourtant pas leur utilisation dans un contexte clinique et il est envisageable de tester un tel facteur chez des patients une fois l'efficacité et l'innocuité de ce facteur démontré dans des modèles fiables de la maladie de Huntington. Il est cependant nécessaire d'étudier les mécanismes d'actions des facteurs trophiques. Cela permettrait à la fois de mieux comprendre le processus neurodégénératif, et de prévoir des effets secondaires éventuels. Dans ce cadre, les facteurs ayant un effet direct sur les cellules à protéger seraient d'un emploi plus aisé car leur mode d'action sera plus facile à déterminer que celui d'un facteur ayant une action indirecte. Ainsi, dans le cas du BDNF, il serait par exemple très intéressant d'étudier son effet sur la régulation de l'expression de protéines impliquées dans les mécanismes apoptotiques ou excitotoxiques.

## CONCLUSION

L'apport de la thérapie génique dans les traitements de type restaurateur n'est pas à négliger. A mesure que la connaissance progressera dans le domaine des greffes de cellules striatales embryonnaires, il peut s'avérer que ce type de thérapie ne soit pas suffisant pour obtenir une totale récupération de la fonction altérée lors de la maladie de Huntington. Dans ce cas de figure, le transfert d'un gène "restaurateur" de cette fonction pourrait compléter l'effet dû à la greffe.

Actuellement, l'expérience acquise dans le domaine de la greffe intracérébrale de cellules d'origine embryonnaire, dans le cadre de la maladie de Huntington, mais surtout de la maladie de Parkinson, fait que ce type de stratégie est actuellement en phase de développement clinique. Cependant, de grands espoirs sont fondés sur le transfert de gènes permettant une neuroprotection. En effet, dans le cadre de la maladie de Huntington, une neuroprotection efficace permettrait d'arrêter le processus neurodégénératif avant l'apparition des symptômes. Comme nous venons de l'exposer,

plusieurs facteurs trophiques présentent des propriétés intéressantes pour la mise en œuvre d'un traitement neuroprotecteur dans le cadre de la maladie de Huntington. Pour aboutir à une application clinique dans les conditions les plus favorables possibles, il faudra avoir caractériser l'effet du facteur neuroprotecteur à l'aide des modèles les plus proches de la maladie sur le plan physiopathologique. De plus, il faudra avoir développé un système de transfert de gène permettant une expression adéquate du transgène sans risque pour les patients.

## QUELLE THÉRAPIE GÉNÉTIQUE POUR LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES ?

La thérapie génique, qui consiste à apporter un matériel génétique spécifique dont l'expression va permettre de corriger un dysfonctionnement cellulaire, représente un grand espoir dans le cadre des maladies neurodégénératives. En effet, dans la plupart de ces pathologies, les traitements de type pharmacologique sont peu efficaces ou inexistant. Pourtant, de nombreux facteurs de nature protéique sont connus pour favoriser la survie de populations neuronales spécifiques, atteintes lors de telle ou telle pathologie, mais leur emploi est souvent entravé par l'obstacle représenté par la barrière hématoencéphalique. Le transfert de gène, en permettant un apport localisé et ciblé de ces facteurs au cœur du parenchyme cérébral, autorisera leur utilisation dans un contexte clinique.

L'intérêt majeur suscité par les perspectives de la thérapie génique a été quelque peu modéré depuis le début des années 1990, période à laquelle les premiers essais cliniques ont débuté. En effet, à partir de ce moment, il est apparu que l'efficacité des outils utilisés était trop faible pour atteindre un effet thérapeutique. En particulier, lors de ces essais, le niveau d'expression des transgènes potentiellement thérapeutiques était la plupart du temps insuffisant. De nombreuses équipes travaillent à l'amélioration des vecteurs dans le but de maîtriser le niveau et le ciblage de l'expression des transgènes.

Actuellement, ce sont les vecteurs de types viraux qui présentent les meilleurs potentiels pour la mise en œuvre d'une thérapie génique *in vivo* du système nerveux central. A la suite d'une injection unique dans le parenchyme cérébral, ils permettent de transduire un grand nombre de cellules qui vont alors exprimer le transgène sur une longue période. Pourtant, l'injection intracérébrale d'un vecteur viral ne pourra se faire chez l'homme avant que l'innocuité de ce type de stratégie ne soit démontrée chez l'animal. Le vecteur adénoviral que nous avons utilisé pour réaliser les travaux présentés dans ce mémoire présente l'avantage de conduire à une expression importante et sur une longue période du transgène dans un grand nombre de cellules après une injection unique

dans le système nerveux central du rongeur. Cependant, il entraîne également une inflammation et une réaction immunitaire qui interdisent son utilisation en clinique pour les maladies neurodégénératives. En effet, si l'on prend l'exemple d'une stratégie de transfert d'un gène neuroprotecteur, déclencher une réaction immunitaire dirigée contre les cellules que l'on cherche à protéger pourrait être délétère pour le patient. Le développement de vecteurs viraux moins immunogènes permet cependant d'espérer que, dans un avenir proche, un vecteur autorisant le transfert de gène intracérébral dans des conditions optimales de sécurité sera disponible. Dans cette optique, les vecteurs adénoviraux de nouvelle génération, les vecteurs viraux associés à l'adénovirus et les vecteurs lentiviraux sont des candidats prometteurs.

Le patron d'expression du transgène est une autre limite à laquelle se heurte le transfert de gène intracérébral direct chez l'homme. Pour obtenir un bénéfice thérapeutique durable, une expression à long terme dans un type cellulaire spécifique sera sans doute nécessaire. L'emploi de promoteurs conduisant à une expression ciblée permettra certainement d'améliorer le potentiel thérapeutique du transfert de gène. Ainsi, si un facteur donné ne fonctionne que par un mécanisme autocrine, il faudra restreindre son expression aux cellules présentant un dysfonctionnement. Au contraire, si un mécanisme paracrine est nécessaire, il faudra restreindre l'expression aux cellules environnant celles présentant le dysfonctionnement. Des études menées récemment montrent qu'une telle spécificité d'expression est réalisable dans le système nerveux central : il est possible, à la suite d'un transfert de gène direct par adénovirus recombinant, de restreindre l'expression du transgène aux neurones à l'aide d'un promoteur spécifique de ces cellules (Navarro *et al.*, sous presse) ou même d'un promoteur ubiquitaire couplé à un silenceur restreignant l'expression aux neurones (Millecamps *et al.*, 1999). Ce type de promoteur permettra d'étudier les bénéfices d'un apport de type autocrine du facteur destiné à protéger les neurones, alors que les effets d'un mécanisme paracrine pourront être analysés grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques des cellules gliales.

Enfin, pour le transfert de gène direct, la régulation de l'expression du transgène est une question importante, tant en termes d'efficacité thérapeutique que de sécurité.

Contrôler finement l'expression du transgène garantira la libération d'une dose optimale du facteur *in situ*, et permettra, le cas échéant, d'arrêter son expression. Des systèmes ayant la capacité de réaliser un tel contrôle de l'expression ont été mis au point. Le plus étudié de ces systèmes est celui qui repose sur l'utilisation de transactivateurs extraits de l'opéron de résistance à la tétracycline du transposon 10 d'*Escherichia coli*. Ces transactivateurs, dont l'activité est régulée par la tétracycline et ses analogues, ont été adaptés pour pouvoir contrôler des promoteurs eucaryotes (Gossen et Bujard, 1992 ; Gossen *et al.*, 1995 ; Mayford *et al.*, 1996). Des travaux menés dans le laboratoire ont montré que ce système peut être inclu dans un adénovirus recombinant, ce qui permet de réguler l'expression d'un transgène thérapeutique, à la fois dans une approche *in vivo*, par injection intracérébrale directe du vecteur (Corti *et al.*, 1999a), et dans une approche *ex vivo*, par greffe de cellules progénitrices préalablement infectées *in vitro* (Corti *et al.*, 1999b).

La réunion de tous ces progrès récents, immunogénicité moindre, expression cellulaire restreinte et régulée, permet d'espérer à brève échéance la mise au point d'un vecteur utilisable pour une application clinique dans les pathologies neurodégénératives.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au transfert de gènes de facteurs neurotrophiques sur lesquels un grand espoir est fondé dans le cadre des pathologies neurodégénératives en général et de la maladie de Huntington en particulier. De par le mécanisme d'action des facteurs trophiques, qui passe par une étape de sécrétion par la cellule transduite, le transfert de gène de ces facteurs se prête particulièrement à une stratégie de type *ex vivo*. Pour une application à l'homme, le transfert de gène *ex vivo* présente certains avantages par rapport au transfert de gène direct.

Premièrement, il évite l'injection intracérébrale d'un vecteur viral potentiellement immunogène. En utilisant un vecteur viral capable de modifier génétiquement les cellules à greffer de façon stable sans qu'elles expriment des gènes viraux par la suite, il devient possible de réaliser un transfert de gène *ex vivo* qui ne risque pas d'interférer avec le système immunitaire. Un tel vecteur viral existe déjà : les lentivirus recombinants

conduisent à l'intégration du transgène dans la cellule transduite, et leur génome ne contient pas de gènes viraux.

Ensuite, de nombreux types cellulaires destinés à réaliser un transfert de gène *ex vivo* ont déjà été étudiés. Cela inclut des cellules d'origine nerveuse, provenant de lignées immortalisées conditionnellement (pour une revue, lire Martinez-Serrano et Björklund, 1997) ou de progéniteurs en culture primaire (pour une revue, lire Fisher, 1997). Ce type de cellules a un fort potentiel pour une application aux pathologies neurodégénératives car elles ont conservé la capacité de s'intégrer dans le système nerveux central. De plus, elles ont également des capacités de migration. Ainsi, nous avons vu que les cellules HiB5 sont capables de coloniser tout le striatum chez le rat (résultats, chapitre 1). Dans le cas où un facteur devrait être libéré au voisinage immédiat d'un neurone pour assurer sa protection, cette propriété des cellules à coloniser l'ensemble d'une structure anatomique pourrait s'avérer cruciale pour obtenir un effet thérapeutique. Récemment, il a été montré que des astrocytes provenant de tissu cérébral humain adulte peuvent être maintenus, amplifiés et transduits *in vitro* (Ridet *et al.*, 1999). Ce type de cellules représente certainement l'avenir du transfert de gène intracérébral *ex vivo*, car il permettra de développer des stratégies de greffes autologues et donc un transfert de gène sans aucun risque de rejet immunitaire.

En dernier lieu, des systèmes ont été développés afin de maîtriser le devenir des cellules après la greffe intracérébrale. Ainsi, le système d'encapsulation dans une membrane semi-perméable permet la greffe de cellules tumorales modifiées pour produire le facteur neuroprotecteur (Aebischer *et al.*, 1996a ; Aebischer *et al.*, 1996b). La membrane empêche le développement tumoral des cellules, mais laisse diffuser le facteur s'il est suffisamment petit, ce qui est le cas des facteurs trophiques. De plus, elle préserve les cellules greffées du système immunitaire de l'hôte. Enfin, en cas de nécessité, la capsule peut être retiré sans dommages pour l'hôte. Pour une application clinique, une telle technique destinée à éliminer les cellules greffées serait également un avantage certain dans le cas des cellules qui s'intègrent dans le parenchyme de l'hôte. Il serait donc important de développer ce type de système, par exemple en utilisant un transgène "suicide" entraînant l'élimination des cellules greffées en réponse à un agent

pharmacologique.

Dans l'avenir, c'est la multiplication des études de transfert de gènes à potentiels thérapeutiques dans des modèles expérimentaux de maladies neurodégénératives qui conduira à l'élaboration de protocoles cliniques. Le choix de la méthode de transfert de gène dépendra à la fois de la pathologie - nombre, dispersion et phénotype des cellules à transduire - et de la nature du transgène - propriété de diffusion permettant une action thérapeutique à longue distance, nécessité d'être exprimé à l'intérieur même de la cellule présentant le dysfonctionnement.

Pour la maladie de Huntington, la greffe de cellules gliales capables de produire et de libérer un facteur trophique après avoir colonisé le noyau caudé et le putamen apparaît comme une des perspectives les plus intéressantes pour ralentir la progression de la maladie.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aebischer, P., Pochon, N. A., Heyd, B., Deglon, N., Joseph, J. M., Zurn, A. D., Baetge, E. E., Hammang, J. P., Goddard, M., Lysaght, M., Kaplan, F., Kato, A. C., Schlupe, M., Hirt, L., Regli, F., Porchet, F., et De Tribolet, N. (1996a). Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogenic cell line engineered to secrete hCNTF. *Hum Gene Ther* **7**, 851-60.
- Aebischer, P., Schlupe, M., Deglon, N., Joseph, J. M., Hirt, L., Heyd, B., Goddard, M., Hammang, J. P., Zurn, A. D., Kato, A. C., Regli, F., et Baetge, E. E. (1996b). Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* **2**, 696-9.
- Akli, S., Caillaud, C., Vigne, E., Stratford-Perricaudet, L. D., Poenaru, L., Perricaudet, M., Kahn, A., et Peschanski, M. R. (1993). Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet* **3**, 224-8.
- Albin, R. L. (1995). Selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Ann Neurol* **38**, 835-6.
- Albin, R. L., et Tagle, D. A. (1995). Genetics and molecular biology of Huntington's disease. *Trends Neurosci* **18**, 11-4.
- Albin, R. L., Reiner, A., Anderson, K. D., Dure, L. T., Handelin, B., Balfour, R., Whetsell, W. J., Penney, J. B., et Young, A. B. (1992). Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* **31**, 425-30.
- Albin, R. L., Young, A. B., et Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **12**, 366-75.
- Altar, C. A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J. M., Acheson, A. L., Lindsay, R. M., et Wiegand, S. J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* **389**, 856-60.
- Anderson, K. D., Panayotatos, N., Corcoran, T. L., Lindsay, R. M., et Wiegand, S. J. (1996). Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of

Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7346-51.

Anderson, W. F. (1998). Human gene therapy. *Nature*, 25-30.

Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M. A., *et al.* (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* **4**, 398-403.

Araujo, D. M., et Hilt, D. C. (1998). Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the locomotor hypofunction and striatonigral neurochemical deficits induced by chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3- nitropropionic acid. *Neuroscience* **82**, 117-27.

Araujo, D. M., et Hilt, D. C. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the excitotoxin- induced behavioral and neurochemical deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience* **81**, 1099-110.

Ardelt, A. A., Flaris, N. A., et Roth, K. A. (1994). Neurotrophin-4 selectively promotes survival of striatal neurons in organotypic slice culture. *Brain Res* **647**, 340-4.

Arenas, E. (1996). GDNF, a multispecific neurotrophic factor with potential therapeutic applications in neurodegenerative disorders. *Mol Psychiatry* **1**, 179-82.

Aronin, N., Chase, K., Young, C., Sapp, E., Schwarz, C., Matta, N., Kornreich, R., Landwehrmeyer, B., Bird, E., Beal, M. F., *et al.* (1995). CAG expansion affects the expression of mutant Huntingtin in the Huntington's disease brain. *Neuron* **15**, 1193-201.

Aslanidis, C., Jansen, G., Amemiya, C., Shutler, G., Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Chen, C., Alleman, J., Wormskamp, N. G., Vooijs, M., *et al.* (1992). Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature* **355**, 548-51.

Bajocchi, G., Feldman, S. H., Crystal, R. G., et Mastrangeli, A. (1993). Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant

adenovirus vectors. *Nat Genet* **3**, 229-34.

Bao, J., Sharp, A. H., Wagster, M. V., Becher, M., Schilling, G., Ross, C. A., Dawson, V. L., et Dawson, T. M. (1996). Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5037-42.

Barkats, M., Millecamps, S., Icard-Liepkalns, C., et Mallet, J. (1999). Overexpressing superoxide dismutase and glutathione peroxidase into cortical neurons using adenovirus vectors increases cell resistance to amyloid $\beta$ -mediated neurotoxicity. In society for neuroscience, 29th annual meeting (Miami).

Barkats, M., Nakao, N., Grasbon-Frodl, E. M., Bilanz-Bleuel, A., Revah, F., Mallet, J., et Brundin, P. (1997). Intrastratial grafts of embryonic mesencephalic rat neurons genetically modified using an adenovirus encoding human Cu/Zn superoxide dismutase. *Neuroscience* **78**, 703-13.

Bates, G. P., Mangiarini, L., et Davies, S. W. (1998). Transgenic mice in the study of polyglutamine repeat expansion diseases. *Brain Pathol* **8**, 699-714.

Bates, G. P., MacDonald, M. E., Baxendale, S., Youngman, S., Lin, C., Whaley, W. L., Wasmuth, J. J., Gusella, J. F., et Lehrach, H. (1991). Defined physical limits of the Huntington disease gene candidate region. *Am J Hum Genet* **49**, 7-16.

Beal, M. F., et Matthews, R. T. (1997). Coenzyme Q10 in the central nervous system and its potential usefulness in the treatment of neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med*, S169-79.

Beal, M. F. (1996). Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 661-6.

Beal, M. F., Ferrante, R. J., Henshaw, R., Matthews, R. T., Chan, P. H., Kowall, N. W., Epstein, C. J., et Schulz, J. B. (1995). 3-Nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurochem* **65**, 919-22.

- Beal, M. F. (1994). Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Curr Opin Neurol* **7**, 542-7.
- Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B. R., et Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* **13**, 4181-92.
- Beal, M. F., Ferrante, R. J., Swartz, K. J., et Kowall, N. W. (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* **11**, 1649-59.
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurek, M. F., Swartz, K. J., et Martin, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* **321**, 168-71.
- Beck, K. D., Valverde, J., Alexi, T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, R. A., Rosenthal, A., et Hefti, F. (1995). Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* **373**, 339-41.
- Behan, P. O., et Bone, I. (1977). Hereditary chorea without dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **40**, 687-91.
- Bhave, S. V., Ghoda, L., et Hoffman, P. L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci* **19**, 3277-86.
- Bilang-Bleuel, A., Revah, F., Colin, P., Locquet, I., Robert, J. J., Mallet, J., et Horellou, P. (1997). Intra-striatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8818-23.
- Björklund, A., Dunnet, S. B., et Nikkah, G. (1994a). *Nigral transplants in the rat Parkinson model*. In *functional neural transplantation*, S. B. Dunnet and A. Björklund, eds. (New York: Raven Press Ltd), pp. 47-69.
- Björklund, A., Campbell, K., Sirinathsinghji, D. J., Fricker, R. A., et Dunnett, S. B. (1994b).

*Functional capacity of striatal transplant in the rat Huntington model.* In *Functional neural transplantation*, S. B. Dunnett and A. Björklund, eds. (New York: Raven Press Ltd), pp. 157-195.

Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**, 475-80.

Blömer, U., Kafri, T., Palmer, T. D., Verma, I. M., Brandis, A., et Gage, F. H. (1998a). Lentiviral transfer of tyrosine hydroxylase in 6-OHDA lesioned rats. In *Society for Neuroscience, 28th annual meeting* (Los Angeles).

Blömer, U., Kafri, T., Randolph-Moore, L., Verma, I. M., et Gage, F. H. (1998b). Bcl-xL protects adult septal cholinergic neurons from axotomized cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2603-8.

Blömer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M., et Gage, F. H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* **71**, 6641-9.

Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K., Randall, T. S., Freeman, T. B., Cahill, D. W., et Sanberg, P. R. (1995). Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain Res Bull* **36**, 549-56.

Boutell, J. M., Wood, J. D., Harper, P. S., et Jones, A. L. (1998). Huntingtin interacts with cystathionine beta-synthase. *Hum Mol Genet* **7**, 371-8.

Bredesen, D. E. (1995). Neural apoptosis. *Ann Neurol* **38**, 839-51.

Brennan, W. A., Jr., Bird, E. D., et Aprille, J. R. (1985). Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J Neurochem* **44**, 1948-50.

Brouillet, E., Condé, F., Beal, M. F., et Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in neurobiology* **56**, 1-41.

- Brouillet, E., Guyot, M. C., Mittoux, V., Altairac, S., Condé, F., Palfi, S., et Hantraye, P. (1998). Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem* **70**, 794-805.
- Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R. J., Dolan, R., Leroy, W. A., Kowall, N. W., et Beal, M. F. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7105-9.
- Brouillet, E., Jenkins, B. G., Hyman, B. T., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Srivastava, R., Roy, D. S., Rosen, B. R., et Beal, M. F. (1993). Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* **60**, 356-9.
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D., et Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* **41**, 646-53.
- Brundin, P., Duan, W. M., et Sauer, H. (1994). *Functionnal effects of mesencephalic dopamine neurons and adrenal chromafin cells grafted to the rodent brain*. In *Functionnal neural transplantation*, S. B. Dunnet and A. Björklund, eds. (New York: Raven Press Ltd), pp. 9-46.
- Bu, D. F., Erlander, M. G., Hitz, B. C., Tillakaratne, N. J., Kaufman, D. L., Wagner, M. C., Evans, G. A., et Tobin, A. J. (1992). Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2115-9.
- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., et Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**, 666-9.
- Burke, J. R., Enghild, J. J., Martin, M. E., Jou, Y. S., Myers, R. M., Roses, A. D., Vance, J. M., et Strittmatter, W. J. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with

the enzyme GAPDH. *Nat Med* **2**, 347-50.

Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., Willianson, R., et Johnson K. (1992). Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* **355**, 547-8.

Byrnes, A. P., Rusby, J. E., Wood, M. J., et Charlton, H. M. (1995). Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neuroscience* **66**, 1015-24.

Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., *et al.* (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-7.

Case, S. S., Price, M. A., Jordan, C. T., Yu, X. J., Wang, L., Bauer, G., Haas, D. L., Xu, D., Stripecke, R., Naldini, L., Kohn, D. B., et Crooks, G. M. (1999). Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2988-93.

Centonze, D., Calabresi, P., Pisani, A., Marinelli, S., Marfia, G. A., et Bernardi, G. (1998). Electrophysiology of the neuroprotective agent riluzole on striatal spiny neurons. *Neuropharmacology* **37**, 1063-70.

Chan, P. H., Chu, L., Chen, S. F., Carlson, E. J., et Epstein, C. J. (1990). Attenuation of glutamate-induced neuronal swelling and toxicity in transgenic mice overexpressing human CuZn-superoxide dismutase. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **51**, 245-7.

Choi-Lundberg, D. L., Lin, Q., Chang, Y. N., Chiang, Y. L., Hay, C. M., Mohajeri, H., Davidson, B. L., et Bohn, M. C. (1997). Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* **275**, 838-41.

Corti, O., Sanchez-Capelo, A., Colin, P., Hanoun, N., Hamon, M., et Mallet, J. (1999a). Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease. *Proc*

*Natl Acad Sci U S A* **96**, 12120-5.

Corti, O., Sabaté, O., Horellou, P., Colin, P., Dumas, S., Buchet, D., Buc-Caron, M.-H., et Mallet, J. (1999b). A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat Biotechnol* **17**, 349-54.

Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A., et Collins, M. K. (1995). High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* **69**, 7430-6.

Coyle, J. T., et Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, et neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-95.

Coyle, J. T., et Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* **263**, 244-6.

Crystal, R. G. (1995). The gene as the drug. *Nat Med* **1**, 15-7.

Cudkowicz, M., et Kowall, N. W. (1990). Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Ann Neurol* **27**, 200-4.

Danko, I., Fritz, J. D., Latendresse, J. S., Herweijer, H., Schultz, E., et Wolff, J. A. (1993). Dystrophin expression improves myofiber survival in mdx muscle following intramuscular plasmid DNA injection. *Hum Mol Genet* **2**, 2055-61.

Davidson, B. L., Allen, E. D., Kozarsky, K. F., Wilson, J. M., et Roessler, B. J. (1993). A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet* **3**, 219-23.

Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L., et Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-48.

- Dawson, V. L., Dawson, T. M., Bartley, D. A., Uhl, G. R., et Snyder, S. H. (1993). Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* **13**, 2651-61.
- De La Monte, S. M., Vonsattel, J. P., et Richardson, E. P. (1988). Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **47**, 516-25.
- Deckel, A. W., Robinson, R. G., Coyle, J. T., et Sanberg, P. R. (1983). Reversal of long-term locomotor abnormalities in the kainic acid model of Huntington's disease by day 18 fetal striatal implants. *Eur J Pharmacol* **93**, 287-8.
- Dedieu, J.-F., Vigne, E., Torrent, C., Jullien, C., Mahfouz, I., Caillaud, J. M., Aubailly, N., Orsini, C., Guillaume, J. M., Opolon, P., Delaère, P., Perricaudet, M., et Yeh, P. (1997). Long-term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J Virol* **71**, 4626-37.
- Déglon, N., Tseng, J. L., Bensadoun, J.-C., Zufferey, R., Trono, D., et Aebischer, P. (1998). Protection of dopaminergic neurons from axotomy-induced degeneration with a GDNF-expressing lentiviral vector. In Society for Neuroscience, 28th annual meeting (Los Angeles).
- Desnick, R. J., et Schuchman, E. H. (1998). Gene therapy for genetic diseases. *Acta Paediatr Jpn* **40**, 191-203.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., et Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-3.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J. P., Carraway, R., Reeves, S. A., et al. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* **14**, 1075-81.
- DiFiglia, M. (1990). Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* **13**, 286-9.

- DiFiglia, M., Pasik, P., et Pasik, T. (1976). A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* **114**, 245-56.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* **81**, 163-221.
- Dom, R., Malfroid, M., et Baro, F. (1976). Neuropathology of Huntington's chorea. Studies of the ventrobasal complex of the thalamus. *Neurology* **26**, 64-8.
- Dragunow, M., Faull, R. L., Lawlor, P., Beilharz, E. J., Singleton, K., Walker, E. B., et Mee, E. (1995). In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport* **6**, 1053-7.
- Dunnett, S. B., Isacson, O., Sirinathsinghji, D. J., Clarke, D. J., et Björklund, A. (1988). Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions--III. Recovery from dopamine-dependent motor asymmetry and deficits in skilled paw reaching. *Neuroscience* **24**, 813-20.
- Duyao, M. P., Auerbach, A. B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G. T., McNeil, S. M., Ge, P., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Joyner, A. L., et MacDonald, M. E. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* **269**, 407-10.
- Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, M., et al. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* **4**, 387-92.
- Emerich, D. F., Cain, C. K., Greco, C., Saydoff, J. A., Hu, Z. Y., Liu, H., et Lindner, M. D. (1997a). Cellular delivery of human CNTF prevents motor and cognitive dysfunction in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant* **6**, 249-66.
- Emerich, D. F., Winn, S. R., Hantraye, P. M., Peschanski, M., Chen, E. Y., Chu, Y., McDermott, P., Baetge, E. E., et Kordower, J. H. (1997b). Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* **386**, 395-9.

- Emerich, D. F., Lindner, M. D., Winn, S. R., Chen, E. Y., Frydel, B. R., et Kordower, J. H. (1996). Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* **16**, 5168-81.
- Emerich, D. F., Winn, S. R., Christenson, L., Palmatier, M. A., Gentile, F. T., et Sanberg, P. R. (1992). A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease: use of polymer-encapsulated cell therapy. *Neurosci Biobehav Rev* **16**, 437-47.
- Emerich, D. F., Zubricki, E. M., Shipley, M. T., Norman, A. B., et Sanberg, P. R. (1991). Female rats are more sensitive to the locomotor alterations following quinolinic acid-induced striatal lesions: effects of striatal transplants. *Exp Neurol* **111**, 369-78.
- Engelhardt, J. F., Yang, Y., Stratford-Perricaudet, L. D., Allen, E. D., Kozarsky, K., Perricaudet, M., Yankaskas, J. R., et Wilson, J. M. (1993). Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nat Genet* **4**, 27-34.
- Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J., Feldblum, S., Patel, N., et Tobin, A. J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* **7**, 91-100.
- Faingold, C. L., Marcinczyk, M. J., Casebeer, D. J., Randall, M. E., Arneric, S. P., et Browning, R. A. (1994). GABA in the inferior colliculus plays a critical role in control of audiogenic seizures. *Brain Res* **640**, 40-7.
- Feigin, A., Kieburtz, K., Como, P., Hickey, C., Claude, K., Abwender, D., Zimmerman, C., Steinberg, K., et Shoulson, I. (1996). Assessment of coenzyme Q10 tolerability in Huntington's disease. *Mov Disord* **11**, 321-3.
- Ferkol, T., Kaetzel, C. S., et Davis, P. B. (1993). Gene transfer into respiratory epithelial cells by targeting the polymeric immunoglobulin receptor. *J Clin Invest* **92**, 2394-400.
- Ferrante, R. J., Beal, M. F., Kowall, N. W., Richardson, E. P. Jr., et Martin, J. B. (1987). Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease.

*Brain Res* **411**, 162-6.

Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Beal, M. F., Richardson, E. J., Bird, E. D., et Martin, J. B. (1985). Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* **230**, 561-3.

Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T., et Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* **70**, 3227-34.

Finiels, F., Gimenez y Ribotta, M., Barkats, M., Samolyk, M.-L., Robert, J.-J., Privat, A., Revah, F., et Mallet, J. (1995). Specific and efficient gene transfer strategy offers new potentialities for the treatment of motor neurone diseases. *Neuroreport* **6**, 2473-8.

Fink, D. J., et Glorioso, J. C. (1997). Engineering herpes simplex virus vectors for gene transfer to neurons. *Nat Med* **3**, 357-9.

Fisher, K. J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S. E., High, K., Pathak, R., Raper, S. E., et Wilson, J. M. (1997). Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* **3**, 306-12.

Fisher, K. J., Gao, G. P., Weitzman, M. D., DeMatteo, R., Burda, J. F., et Wilson, J. M. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* **70**, 520-32.

Fisher, L. J. (1997). Neural precursor cells: applications for the study and repair of the central nervous system. *Neurobiol Dis* **4**, 1-22.

Frim, D. M., Uhler, T. A., Short, M. P., Ezzedine, Z. D., Klagsbrun, M., Breakefield, X. O., et Isacson, O. (1993a). Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions. *Neuroreport* **4**, 367-70.

Frim, D. M., Yee, W. M., et Isacson, O. (1993b). NGF reduces striatal excitotoxic neuronal loss without affecting concurrent neuronal stress. *Neuroreport* **4**, 655-8.

- Galpern, W. R., Tatter, S. B., et Isacson, O. (1997). *Neurotrophic factor protection in models of neurodegeneration: implications for the treatment of neurodegenerative disorders*. In *Mitochondria and free radicals in neurodegenerative diseases*, M. F. Beal, N. Howell and I. Bodis-Wollner, eds.: Wiley-Liss, Inc), pp. 557-583.
- Gao, G. P., Yang, Y., et Wilson, J. M. (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver- directed gene therapy. *J Virol* **70**, 8934-43.
- Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y., et Martinou, J. C. (1992). Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* **258**, 302-4.
- Gerfen, C. R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* **15**, 285-320.
- Gerfen, C. R., Baimbridge, K. G., et Miller, J. J. (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8780-4.
- Gimenez y Ribotta, M., Revah, F., Pradier, L., Loquet, I., Mallet, J., et Privat, A. (1997). Prevention of motoneuron death by adenovirus-mediated neurotrophic factors. *J Neurosci Res* **48**, 281-5.
- Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, M. A., Koide, H. B., Graham, R. K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., et Hayden, M. R. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* **13**, 442-9.
- Goldman, M. J., Lee, P. S., Yang, J. S., et Wilson, J. M. (1997). Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* **8**, 2261-8.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., et Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-9.
- Gossen, M., et Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51.

- Grafton, S. T., Mazziotta, J. C., Pahl, J. J., St George Hyslop, P., Haines, J. L., Gusella, J., Hoffman, J. M., Baxter, L. R., et Phelps, M. E. (1990). A comparison of neurological, metabolic, structural, and genetic evaluations in persons at risk for Huntington's disease. *Ann Neurol* **28**, 614-21.
- Grandmougin, T., Bourdet, C., et Gurruchaga, J.-M. (1997). De la danse de Saint Guy à la chorée de huntington : rappels sur l'émergence d'un concept médical. *médecine/sciences* **13**, 850-854.
- Gravel, C., Gotz, R., Lorrain, A., et Sendtner, M. (1997). Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain- derived neurotrophic factor leads to long-term survival of axotomized motor neurons. *Nat Med* **3**, 765-70.
- Graveland, G. A., et DiFiglia, M. (1985). The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res* **327**, 307-11.
- Graveland, G. A., Williams, R. S., et DiFiglia, M. (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* **227**, 770-3.
- Graybiel, A. M., et Ragsdale, C. W. J. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5723-6.
- Greenlund, L. J., Deckwerth, T. L., et Johnson, E. M. J. (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* **14**, 303-15.
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., et Schapira, A. H. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* **39**, 385-9.
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., et al. (1983). A polymorphic

DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234-8.

Guyot, M.-C., Hantraye, P., Dolan, R., Palfi, S., Maziere, M., et Brouillet, E. (1997a). Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* **79**, 45-56.

Guyot, M.-C., Palfi, S., Stutzmann, J. M., Maziere, M., Hantraye, P., et Brouillet, E. (1997b). Riluzole protects from motor deficits and striatal degeneration produced by systemic 3-nitropropionic acid intoxication in rats. *Neuroscience* **81**, 141-9.

Haase, G., Kennel, P., Pettmann, B., Vigne, E., Akli, S., Revah, F., Schmalbruch, H., et Kahn, A. (1997). Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med* **3**, 429-36.

Hansson, O., Peters, N. A., Leist, M., Nicotera, P., Castilho, R. F., et Brundin, P. (1999). Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8727-32.

Hantraye, P., Riche, D., Maziere, M., et Isacson, O. (1992). Intra-striatal transplantation of cross-species fetal striatal cells reduces abnormal movements in a primate model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4187-91.

Hardy, J., et Gwinn, H. K. (1998). Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* **282**, 1075-9.

Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., et Phipps, M. L. (1997). Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* **71**, 1842-9.

Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S. A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A. J., Harper, P. S., Housman, D. E., et Shaw, D. J. (1992). Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* **355**, 545-6.

Harper, P. S. (1992). The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* **89**, 365-76.

Hedreen, J. C., Peyser, C. E., Folstein, S. E., et Ross, C. A. (1991). Neuronal loss in layers V

and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett* **133**, 257-61.

Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., et Simpson, L. C. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* **266**, 1062-4.

Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D. J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X. J., Stevens, M. E., Rosemond, E., Roder, J. C., Phillips, A. G., Rubin, E. M., Hersch, S. M., et Hayden, M. R. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* **23**, 181-92.

Holtzman, D. M., et Deshmukh, M. (1997). Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease? *Nat Med* **3**, 954-5.

Horellou, P., Vigne, E., Castel, M.-N., Barneoud, P., Colin, P., Perricaudet, M., Delaère, P., et Mallet, J. (1994). Direct intracerebral gene transfer of an adenoviral vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* **6**, 49-53.

Horellou, P., Brundin, P., Kalen, P., Mallet, J., et Björklund, A. (1990). In vivo release of dopa and dopamine from genetically engineered cells grafted to the denervated rat striatum. *Neuron* **5**, 393-402.

Huntington, G. (1872). On Chorea. *Med Surg Rep* **26**, 317-321.

Ikonen, E., Ignatius, J., Norio, R., Palo, J., et Peltonen, L. (1992). Huntington disease in Finland: a molecular and genealogical study. *Hum Genet* **89**, 275-80.

Isacson, O., et Breakefield, X. O. (1997). Benefits and risks of hosting animal cells in the human brain. *Nat Med* **3**, 964-9.

Isacson, O., Hantraye, P., Riche, D., Schumacher, J. M., et Maziere, M. (1991). *The*

*relationship between symptoms and functional anatomy in the chronic neurodegenerative diseases: from pharmacological to biological replacement therapy in Huntington's disease.* In *Intracerebral Transplantation in Movement Disorders*, O. Lindvall, A. Björklund and H. Widner, eds.: (Elsevier Science Publishers), pp. 245-258.

Isacson, O., Dunnett, S. B., et Björklund, A. (1986). Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2728-32.

Isacson, O., Brundin, P., Kelly, P. A., Gage, F. H., et Björklund, A. (1984). Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* **311**, 458-60.

Ivkovic, S., Polonskaia, O., Farinas, I., et Ehrlich, M. E. (1997). Brain-derived neurotrophic factor regulates maturation of the DARPP-32 phenotype in striatal medium spiny neurons: studies in vivo and in vitro. *Neuroscience* **79**, 509-16.

Jaffe, H. A., Danel, C., Longenecker, G., Metzger, M., Setoguchi, Y., Rosenfeld, M. A., Gant, T. W., Thorgeirsson, S. S., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., Pavirani, A., Lecocq, J.-P., et Crystal, R. G. (1992). Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* **1**, 372-8.

Jenkins, B. G., Rosas, H. D., Chen, Y. C., Makabe, T., Myers, R., MacDonald, M., Rosen, B. R., Beal, M. F., et Koroshetz, W. J. (1998). <sup>1</sup>H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* **50**, 1357-65.

Jenkins, B. G., Koroshetz, W. J., Beal, M. F., et Rosen, B. R. (1993). Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Neurology* **43**, 2689-95.

Jooss, K., Yang, Y., et Wilson, J. M. (1996). Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung. *Hum Gene Ther* **7**, 1555-66.

Jou, Y. S., et Myers, R. M. (1995). Evidence from antibody studies that the CAG repeat in the Huntington disease gene is expressed in the protein. *Hum Mol Genet* **4**, 465-9.

---

- Kaal, E. C., Joosten, E. A., et Bar, P. R. (1997). Prevention of apoptotic motoneuron death in vitro by neurotrophins and muscle extract. *Neurochem Int* **31**, 193-201.
- Kafri, T., Blömer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., et Verma, I. M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* **17**, 314-7.
- Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., et Bredesen, D. E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274-7.
- Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L., et During, M. J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* **8**, 148-54.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., et Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* **18**, 527-35.
- Kemp, J. M., et Powell, T. P. (1970). The cortico-striate projection in the monkey. *Brain* **93**, 525-46.
- Kieburz, K. (1999). Antiglutamate therapies in Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl* **55**, 97-102.
- Kieburz, K., Feigin, A., McDermott, M., Como, P., Abwender, D., Zimmerman, C., Hickey, C., Orme, C., Claude, K., Sotack, J., Greenamyre, J. T., Dunn, C., et Shoulson, I. (1996). A controlled trial of remacemide hydrochloride in Huntington's disease. *Mov Disord* **11**, 273-7.
- Klement, I. A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y., et Orr, H. T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* **95**, 41-53.
- Klimatcheva, E., Rosenblatt, J. D., et Planelles, V. (1999). Lentiviral vectors and gene

therapy. *Front Biosci*, D481-96.

- Kopyov, O. V., Jacques, S., Lieberman, A., Duma, C. M., et Eagle, K. S. (1998). Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients. *Exp Neurol* **149**, 97-108.
- Koroshetz, W. J., Jenkins, B. G., Rosen, B. R., et Beal, M. F. (1997). Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Ann Neurol* **41**, 160-5.
- Koutouzis, T. K., Borlongan, C. V., Freeman, T. B., Cahill, D. W., et Sanberg, P. R. (1994). Intrastriatal 3-nitropropionic acid: a behavioral assessment. *Neuroreport* **5**, 2241-5.
- Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Beal, M. F., Richardson, E. J., Sofroniew, M. V., Cuello, A. C., et Martin, J. B. (1987). Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience* **20**, 817-28.
- Kowall, N. W., Ferrante, R. J., et Martin, J. B. (1987). Patterns of cell loss in Huntington's disease. *Trends Neurosci* **10**, 24-29.
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S. E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Squitieri, F., Lin, B., Bassett, A., Almqvist, E., et al. (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* **330**, 1401-6.
- Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., et Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* **252**, 1711-4.
- Kuhl, D. E., Phelps, M. E., Markham, C. H., Metter, E. J., Riege, W. H., et Winter, J. (1982). Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Ann Neurol* **12**, 425-34.
- Kuwert, T., Lange, H. W., Langen, K. J., Herzog, H., Aulich, A., et Feinendegen, L. E. (1990). Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients

with Huntington's disease. *Brain*, 1405-23.

La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E., et Fischbeck, K. H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* **352**, 77-9.

Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., et Bockaert, J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* **364**, 535-7.

Lange, H., Thorner, G., Hopf, A., et Schroder, K. F. (1976). Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J Neurol Sci* **28**, 401-25.

Le Gal La Salle, G., et Mallet, J. (1994). *Gene therapy: perspectives in epilepsy*. In Idiopathic epilepsies: clinical, experimental and genetic aspects., A. Malafosse, P. Genton, E. Hirsch, C. Marescaux, D. Broglin and R. Bernasconi, eds. (London: John Libbey & Company Ltd), pp. 511-521.

Le Gal La Salle, G., Robert, J.-J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., et Mallet, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* **259**, 988-90.

Le Gal La Salle, G., Kaijima, M., et Feldblum, S. (1983). Abortive amygdaloid kindled seizures following microinjection of gamma- vinyl-GABA in the vicinity of substantia nigra in rats. *Neurosci Lett* **36**, 69-74.

Leeflang, E. P., Zhang, L., Tavare, S., Hubert, R., Srinidhi, J., MacDonald, M. E., Myers, R. H., de, Y. M., Wexler, N. S., Gusella, J. F., *et al.* (1995). Single sperm analysis of the trinucleotide repeats in the Huntington's disease gene: quantification of the mutation frequency spectrum. *Hum Mol Genet* **4**, 1519-26.

Leung, C. M., Chan, Y. W., Chang, C. M., Yu, Y. L., et Chen, C. N. (1992). Huntington's disease in Chinese: a hypothesis of its origin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**, 681-4.

Li, S. H., et Li, X. J. (1998). Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum Mol Genet* **7**, 777-82.

- Li, S. H., Schilling, G., Young, W. D., Li, X. J., Margolis, R. L., Stine, O. C., Wagster, M. V., Abbott, M. H., Franz, M. L., Ranen, N. G., *et al.* (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* **11**, 985-93.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., et Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**, 1130-2.
- Löchmuller, H., Jani, A., Huard, J., Prescott, S., Simoneau, M., Massie, B., Karpati, G., et Acsadi, G. (1994). Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* **5**, 1485-91.
- Ludolph, A. C., He, F., Spencer, P. S., Hammerstad, J., et Sabri, M. (1991). 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* **18**, 492-8.
- Lundberg, C., Martinez-Serrano, A., Cattaneo, E., McKay, R. D., et Björklund, A. (1997). Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol*, 342-60.
- Lundberg, C., Winkler, C., Whitemore, S. R., et Björklund, A. (1996). Conditionally immortalized neural progenitor cells grafted to the striatum exhibit site-specific neuronal differentiation and establish connections with the host globus pallidus. *Neurobiol Dis* **3**, 33-50.
- Lunkes, A., et Mandel, J. L. (1998). A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **7**, 1355-61.
- MacDonald, M. E., Haines, J. L., Zimmer, M., Cheng, S. V., Youngman, S., Whaley, W. L., Wexler, N., Bucan, M., Allitto, B. A., Smith, B., *et al.* (1989). Recombination events suggest potential sites for the Huntington's disease gene. *Neuron* **3**, 183-90.
- MacMillan, J. C., et Harper, P. S. (1991). Single-gene neurological disorders in South Wales: an epidemiological study. *Ann Neurol* **30**, 411-4.

- Madrazo, I., Cuevas, C., Castrejon, H., Guizar, S. G., Franco, B. R., Ostrosky, S. F., Aguilera, M., et Magallon, E. (1993). The first homotopic fetal homograft of the striatum in the treatment of Huntington's disease. *Gac Med Mex* **129**, 109-17.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S. W., et Bates, G. P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506.
- Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi, E. P., Devon, R., Kim, S. U., Bredesen, D. E., Tufaro, F., et Hayden, M. R. (1998). Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* **18**, 150-4.
- Martinez-Serrano, A., et Björklund, A. (1997). Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci* **20**, 530-8.
- Martinez-Serrano, A., et Björklund, A. (1996). Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J Neurosci* **16**, 4604-16.
- Martinez-Serrano, A., Lundberg, C., Horellou, P., Fischer, W., Bentlage, C., Campbell, K., McKay, R. D., Mallet, J., et Björklund, A. (1995). CNS-derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult rat brain: complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation into the septum. *J Neurosci* **15**, 5668-80.
- Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D., et Kandel, E. R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* **274**, 1678-83.
- McGeer, E. G., et McGeer, P. L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* **263**, 517-9.
- Mi, J., Chatterjee, S., Wong, K. K., Forbes, C., Lawless, G., et Tobin, A. J. (1999).

Recombinant adeno-associated virus (AAV) drives constitutive production of glutamate decarboxylase in neural cell lines. *J Neurosci Res* **57**, 137-48.

Millecamps, S., Kiefer, H., Navarro, V., Geoffroy, M.-C., Robert, J.-J., Finiels, F., Mallet, J., et Barkats, M. (1999). Neuron-restrictive silencer elements mediate neuron specificity of adenoviral gene expression. *Nat Biotechnol* **17**, 865-9.

Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F. H., et Verma, I. M. (1997). Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10319-23.

Mizuno, K., Carnahan, J., et Nawa, H. (1994). Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev Biol* **165**, 243-56.

Montoya, C. P., Campbell-Hope, L. J., Pemberton, K. D., et Dunnett, S. B. (1991). The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* **36**, 219-28.

Morell, V. (1993). Huntington's gene finally found. *Science* **260**, 28-30.

Mount, H. T., Dean, D. O., Alberch, J., Dreyfus, C. F., et Black, I. B. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9092-6.

Myers, R. H., Vonsattel, J. P., Stevens, T. J., Cupples, L. A., Richardson, E. P., Martin, J. B., et Bird, E. D. (1988). Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* **38**, 341-7.

Myers, R. H., Madden, J. J., Teague, J. L., et Falek, A. (1982). Factors related to onset age of Huntington disease. *Am J Hum Genet* **34**, 481-8.

Naimi, S., Jeny, R., Hantraye, P., Peschanski, M., et Riche, D. (1996). Ontogeny of human striatal DARPP-32 neurons in fetuses and following xenografting to the adult rat brain. *Exp Neurol* **137**, 15-25.

Nakao, N., Grasbon-Frodl, E. M., Widner, H., et Brundin, P. (1996a). Antioxidant treatment

protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience* **73**, 185-200.

Nakao, N., Grasbon-Frodl, E. M., Widner, H., et Brundin, P. (1996b). DARPP-32-rich zones in grafts of lateral ganglionic eminence govern the extent of functional recovery in skilled paw reaching in an animal model of Huntington's disease. *Neuroscience* **74**, 959-70.

Nakao, N., Brundin, P., Funa, K., Lindvall, O., et Odin, P. (1995). Trophic and protective actions of brain-derived neurotrophic factor on striatal DARPP-32-containing neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* **90**, 92-101.

Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 457-63.

Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., et Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-7.

Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J. D., Phillips, A. G., et Hayden, M. R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**, 811-23.

Norman, A. B., Wyatt, L. M., Hildebrand, J. P., Kolmonpunporn, M., Moody, C. A., Lehman, M. N., et Sanberg, P. R. (1990). Sensitization of rotation behavior in rats with unilateral 6- hydroxydopamine or kainic acid-induced striatal lesions. *Pharmacol Biochem Behav* **37**, 755-9.

Oliver, C. N., Starke, R. P., Stadtman, E. R., Liu, G. J., Carney, J. M., et Floyd, R. A. (1990). Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion- induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5144-7.

Ona, V. O., Li, M., Vonsattel, J. P., Andrews, L. J., Khan, S. Q., Chung, W. M., Frey, A. S., Menon, A. S., Li, X. J., Stieg, P. E., Yuan, J., Penney, J. B., Young, A. B., Cha, J. H., et

- Friedlander, R. M. (1999). Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* **399**, 263-7.
- Oppenheim, R. W., Houenou, L. J., Johnson, J. E., Lin, L. F., Li, L., Lo, A. C., Newsome, A. L., Prevette, D. M., et Wang, S. (1995). Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* **373**, 344-6.
- Ordway, J. M., Tallaksen, G. S., Gutekunst, C. A., Bernstein, E. M., Cearley, J. A., Wiener, H. W., Dure, L. T., Lindsey, R., Hersch, S. M., Jope, R. S., Albin, R. L., et Detloff, P. J. (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* **91**, 753-63.
- Ouimet, C. C., Miller, P. E., Hemmings, H. C. Jr, Walaas, S. I., et Greengard, P. (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J Neurosci* **4**, 111-24.
- Palfi, S., Conde, F., Riche, D., Brouillet, E., Dautry, C., Mittoux, V., Chibois, A., Peschanski, M., et Hantraye, P. (1998). Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* **4**, 963-6.
- Palfi, S., Riche, D., Brouillet, E., Guyot, M.-C., Mary, V., Wahl, F., Peschanski, M., Stutzmann, J. M., et Hantraye, P. (1997). Riluzole reduces incidence of abnormal movements but not striatal cell death in a primate model of progressive striatal degeneration. *Exp Neurol* **146**, 135-41.
- Palfi, S., Ferrante, R. J., Brouillet, E., Beal, M. F., Dolan, R., Guyot, M.-C., Peschanski, M., et Hantraye, P. (1996). Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* **16**, 3019-25.
- Palo, J., Somer, H., Ikonen, E., Karila, L., et Peltonen, L. (1987). Low prevalence of Huntington's disease in Finland. *Lancet* **2**, 805-6.
- Parent, A. (1996). *Basal ganglia*. In Carpenter's human neuroanatomy, P. Coryell, ed.: (Williams & Wilkins), pp. 795-863.

- Parent, A., et Hazrati, L. N. (1995a). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia- thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* **20**, 91-127.
- Parent, A., et Hazrati, L. N. (1995b). Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* **20**, 128-54.
- Parsadanian, A. S., Cheng, Y., Keller, P. C., Holtzman, D. M., et Snider, W. D. (1998). Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci* **18**, 1009-19.
- Pérez-Navarro, E., Arenas, E., Marco, S., et Alberch, J. (1999a). Intrastriatal grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* **11**, 241-9.
- Pérez-Navarro, E., Alberch, J., Neveu, I., et Arenas, E. (1999b). Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo. *Neuroscience* **91**, 1257-64.
- Pérez-Navarro, E., Arenas, E., Reiriz, J., Calvo, N., et Alberch, J. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects striatal calbindin- immunoreactive neurons from excitotoxic damage. *Neuroscience* **75**, 345-52.
- Peschanski, M. (1999). Où en est-on des essais thérapeutiques dans la maladie de Huntington ? In *Atelier maladie de Huntington*, Association Huntington France, ed. (Paris).
- Peschanski, M., Césaro, P., et Hantraye, P. (1995). Rationale for intrastriatal grafting of striatal neuroblasts in patients with Huntington's disease. *Neuroscience* **68**, 273-85.
- Petersen, A., Mani, K., et Brundin, P. (1999). Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp Neurol* **157**, 1-18.
- Phelps, P. E., et Vaughn, J. E. (1986). Immunocytochemical localization of choline

acetyltransferase in rat ventral striatum: a light and electron microscopic study. *J Neurocytol* **15**, 595-617.

Portera-Cailliau, C., Hedreen, J. C., Price, D. L., et Koliatsos, V. E. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci*, 3775-87.

Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., et Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* **65**, 532-6.

Price, D. L., Sisodia, S. S., et Borchelt, D. R. (1998). Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* **282**, 1079-83.

Quinn, N., Brown, R., Craufurd, D., Goldman, S., Hodges, J., Kiebertz, K., Lindvall, O., MacMillan, J., et Roos, R. (1996). Core Assessment Program for Intracerebral Transplantation in Huntington's Disease (CAPIT-HD). *Mov Disord* **11**, 143-50.

Ragot, T., Stratford-Perricaudet, L. D., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Briand, P., Kaplan, J. C., Kahn, A., *et al.* (1994). Adenovirus-mediated transfer of a human dystrophin gene to skeletal muscle of mdx mouse. *Gene Ther*, S53-4.

Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Korsmeyer, S., et White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7742-6.

Reddy, P. H., Williams, M., et Tagle, D. A. (1999). Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* **22**, 248-55.

Reddy, P. H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike, B. L., Whetsell, W. J., Miller, G., et Tagle, D. A. (1998). Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet* **20**, 198-202.

Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., et Young, A. B.

---

- (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5733-7.
- Renfranz, P. J., Cunningham, M. G., et McKay, R. D. G. (1991). Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* **66**, 713-729.
- Ridet, J.-L., Corti, O., Pencalet, P., Hanoun, N., Hamon, M., Philippon, J., et Mallet, J. (1999). Toward autologous ex vivo gene therapy for the central nervous system with human adult astrocytes. *Hum Gene Ther* **10**, 271-80.
- Robbins, P. D., Tahara, H., et Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* **16**, 35-40.
- Robert, J.-J., Bouilleret, V., Ridoux, V., Valin, A., Geoffroy, M.-C., Mallet, J., et Le Gal La Salle, G. (1997). Adenovirus-mediated transfer of a functional GAD gene into nerve cells: potential for the treatment of neurological diseases. *Gene Ther* **4**, 1237-45.
- Roizin, L., Stellar, S., et Liu, J. C. (1979). *Neuronal nuclear-cytoplasmic changes in Huntingtons chorea: electron microscopic investigations*. In *Advances in Neurology*, T. N. Chase, N. S. Wexler and A. Barbeau, eds. (New York: Raven Press), pp. 95-122.
- Roos, R. A., Vegter, van, d. V. M., Hermans, J., Elshove, H. M., Moll, A. C., van, de, Kamp, Jj, et Bruyn, G. W. (1991). Age at onset in Huntington's disease: effect of line of inheritance and patient's sex. *J Med Genet* **28**, 515-9.
- Rosas, H. D., Koroshetz, W. J., Jenkins, B. G., Chen, Y. I., Hayden, D. L., Beal, M. F., et Cudkowicz, M. E. (1999). Riluzole therapy in Huntington's disease (HD). *Mov Disord* **14**, 326-30.
- Rosenfeld, M. A., Siegfried, W., Yoshimura, K., Yoneyama, K., Fukayama, M., Stier, L. E., Paakko, P. K., Gilardi, P., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., et al. (1991). Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* **252**, 431-4.

- Rozas, G., Liste, I., Lopez, M. E., Guerra, M. J., Kokaia, M., et Labandeira-Garcia, J. L. (1996). Intrathalamic implants of GABA-releasing polymer matrices reduce motor impairments in rats with excitotoxically lesioned striata. *Exp Neurol* **142**, 323-30.
- Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J. J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., Curtis, D., Davidson, M. J., Differ, A. M., Dode, C., Dodge, A., Frontali, M., Ranen, N. G., Stine, O. C., Sherr, M., Abbott, M. H., Franz, M. L., Graham, C. A., Harper, P. S., Hedreen, J. C., Hayden, M. R., *et al.* (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* **59**, 16-22.
- Rubinsztein, D. C., Amos, W., Leggo, J., Goodburn, S., Ramesar, R. S., Old, J., Bontrop, R., McMahon, R., Barton, D. E., et Ferguson-Smith, M. A. (1994). Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nat Genet* **7**, 525-30.
- Ruppert, C., Sandrasagra, A., Anton, B., Evans, C., Schweitzer, E. S., et Tobin, A. J. (1993). Rat-1 fibroblasts engineered with GAD65 and GAD67 cDNAs in retroviral vectors produce and release GABA. *J Neurochem* **61**, 768-71.
- Samulski, R. J. (1993). Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 74-80.
- Sanchez, I., Xu, C. J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J., et Yuan, J. (1999). Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* **22**, 623-33.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., et Greenberg, M. E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **95**, 55-66.
- Sauer, H., Rosenblad, C., et Björklund, A. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8935-9.

- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R. J., Wu, Y., Koopmans, S. C., Langston, C., Graham, F. L., Beaudet, A. L., et Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* **18**, 180-3.
- Schilling, G., Becher, M. W., Sharp, A. H., Jinnah, H. A., Duan, K., Kotzuk, J. A., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Cooper, J. K., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., Ross, C. A., et Borchelt, D. R. (1999). Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* **8**, 397-407.
- Schilling, G., Sharp, A. H., Loev, S. J., Wagster, M. V., Li, S. H., Stine, O. C., et Ross, C. A. (1995). Expression of the Huntington's disease (IT15) protein product in HD patients. *Hum Mol Genet* **4**, 1365-71.
- Schulz, J. B., Matthews, R. T., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Siwek, D., Henshaw, D. R., Cipolloni, P. B., Mecocci, P., Kowall, N. W., Rosen, B. R., et al. (1995a). Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J Neurosci* **15**, 8419-29.
- Schulz, J. B., Henshaw, D. R., Siwek, D., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Cipolloni, P. B., Kowall, N. W., Rosen, B. R., et Beal, M. F. (1995b). Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* **64**, 2239-47.
- Schumacher, J. M., Short, M. P., Hyman, B. T., Breakefield, X. O., et Isacson, O. (1991). Intracerebral implantation of nerve growth factor-producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. *Neuroscience* **45**, 561-70.
- Schwarcz, R., Fuxe, K., Agnati, L. F., Hokfelt, T., et Coyle, J. T. (1979). Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res* **170**, 485-95.
- Scigliano, G., Giovannini, P., Girotti, F., Grassi, M. P., Caraceni, T., et Schechter, P. J. (1984). Gamma-vinyl GABA treatment of Huntington's disease. *Neurology* **34**, 94-6.

- Sharp, A. H., et Ross, C. A. (1996). Neurobiology of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **3**, 3-15.
- Sharp, A. H., Loev, S. J., Schilling, G., Li, S. H., Li, X. J., Bao, J., Wagster, M. V., Kotzuk, J. A., Steiner, J. P., Lo, A., et al. (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* **14**, 1065-74.
- Shimada, T., Fujii, H., Mitsuya, H., et Nienhuis, A. W. (1991). Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *J Clin Invest* **88**, 1043-7.
- Shiwach, R. (1994). Psychopathology in Huntington's disease patients. *Acta Psychiatr Scand* **90**, 241-6.
- Shiwach, R. S., et Norbury, C. G. (1994). A controlled psychiatric study of individuals at risk for Huntington's disease. *Br J Psychiatry* **165**, 500-5.
- Sisodia, S. S. (1998). Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell* **95**, 1-4.
- Snell, R. G., MacMillan, J. C., Cheadle, J. P., Fenton, I., Lazarou, L. P., Davies, P., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Harper, P. S., et Shaw, D. J. (1993). Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* **4**, 393-7.
- Snell, R. G., Thompson, L. M., Tagle, D. A., Holloway, T. L., Barnes, G., Harley, H. G., Sandkuijl, L. A., MacDonald, M. E., Collins, F. S., Gusella, J. F., et al. (1992). A recombination event that redefines the Huntington disease region. *Am J Hum Genet* **51**, 357-62.
- Sotrel, A., Paskevich, P. A., Kiely, D. K., Bird, E. D., Williams, R. S., et Myers, R. H. (1991). Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurology* **41**, 1117-23.

- Steiner, H., et Gerfen, C. R. (1998). Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Exp Brain Res* **123**, 60-76.
- Stratford-Perricaudet, L. D., Makeh, I., Perricaudet, M., et Briand, P. (1992). Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* **90**, 626-30.
- Stratford-Perricaudet, L. D., Levrero, M., Chasse, J. F., Perricaudet, M., et Briand, P. (1990). Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* **1**, 241-56.
- Strong, T. V., Tagle, D. A., Valdes, J. M., Elmer, L. W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K. W., Collins, F. S., et Albin, R. L. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* **5**, 259-65.
- Svendsen, C. N., et Smith, A. G. (1999). New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system. *Trends Neurosci* **22**, 357-64.
- Tabrizi, S. J., Cleeter, M. W., Xuereb, J., Taanman, J. W., Cooper, J. M., et Schapira, A. H. (1999). Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* **45**, 25-32.
- Telenius, H., Kremer, H. P., Theilmann, J., Andrew, S. E., Almqvist, E., Anvret, M., Greenberg, C., Greenberg, J., Lucotte, G., Squitieri, F., et al. (1993). Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)<sub>n</sub> repeat length is the sex of the affected parent. *Hum Mol Genet* **2**, 1535-40.
- Tell, G., Bohlen, P., Schechter, P. J., Koch-Weser, J., Agid, Y., Bonnet, A. M., Coquillat, G., Chazot, G., et Fischer, C. (1981). Treatment of Huntington disease with gamma-acetylenic GABA an irreversible inhibitor of GABA-transaminase: increased CSF GABA and homocarnosine without clinical amelioration. *Neurology* **31**, 207-11.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-83.
- Thornberry, N. A., et Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-6.

- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L. F., Ogren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J., et Olson, L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* **373**, 335-9.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E. C., et Mandel, J.-L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet* **10**, 104-10.
- Trottier, Y., Biancalana, V., et Mandel, J.-L. (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet* **31**, 377-82.
- Turpin, J. C. (1993). Huntington chorea in children. *Arch Fr Pediatr* **50**, 119-22.
- Uchida, N., Sutton, R. E., Frieria, A. M., He, D., Reitsma, M. J., Chang, W. C., Veres, G., Scollay, R., et Weissman, I. L. (1998). HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11939-44.
- Vegter-van der Vlis, M., Volkers, W. S., et Went, L. N. (1976). Ages of death of children with Huntington's chorea and of their affected parents. *Ann Hum Genet* **39**, 329-34.
- Ventimiglia, R., Mather, P. E., Jones, B. E., et Lindsay, R. M. (1995). The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* **7**, 213-22.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F. P., et al. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**, 905-14.
- Vonsattel, J. P. (1992). *Neuropathology of Huntington's disease*. In *Movement Disorders in Neurology and Neuropsychiatry*, A. B. Joseph and R. R. Young, eds. (Boston: Blackwell Scientific Publications), pp. 186-194.

- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., et Richardson, E. P. J. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 559-77.
- Waddington, J. L., et Cross, A. J. (1984). Therapeutic failure of GABA agonist treatment in Huntington's disease. *Neurology* **34**, 702.
- Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., et Birnstiel, M. L. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3410-4.
- Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Hackam, A. S., Margolis, R. L., Trifiro, M. A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G. S., Propp, S. S., Bromm, M., Rowland, K. J., Zhang, T., Rasper, D., Roy, S., Thornberry, N., Pinsky, L., Kakizuka, A., Ross, C. A., Nicholson, D. W., Bredesen, D. E., et Hayden, M. R. (1998). Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* **273**, 9158-67.
- Wexler, N. S., Young, A. B., Tanzi, R. E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J. B., Snodgrass, S. R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos Arroyo, M. A., et al. (1987). Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* **326**, 194-7.
- Wictorin, K., Clarke, D. J., Bolam, J. P., et Björklund, A. (1990). Fetal striatal neurons grafted into the ibotenate lesioned adult striatum: efferent projections and synaptic contacts in the host globus pallidus. *Neuroscience* **37**, 301-15.
- Wictorin, K., et Björklund, A. (1989). Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid- lesioned striatum--II. Cortical afferents. *Neuroscience* **30**, 297-311.
- Wictorin, K., Simerly, R. B., Isacson, O., Swanson, L. W., et Björklund, A. (1989a). Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid- lesioned striatum--III. Efferent projecting graft neurons and their relation to host afferents within the grafts. *Neuroscience* **30**, 313-30.

- Wictorin, K., Carke, D. J., Bolam, J. P., et Björklund, A. (1989b). Host cortical fibers establish synaptic connections with grafted striatal neurons in the ibotenic acid lesioned striatum. *Eur. J Neurosci.* **1**, 189-195.
- Wictorin, K., Isacson, O., Fischer, W., Nothias, F., Peschanski, M., et Björklund, A. (1988). Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid- lesioned striatum--I. Subcortical afferents. *Neuroscience* **27**, 547-62.
- Widmer, H. R., et Hefti, F. (1994). Neurotrophin-4/5 promotes survival and differentiation of rat striatal neurons developing in culture. *Eur J Neurosci* **6**, 1669-79.
- Wilson, C. J., Chang, H. T., et Kitai, S. T. (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci* **10**, 508-19.
- Wilson, C. J., et Groves, P. M. (1980). Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **194**, 599-615.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., et Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1465-8.
- Wright, H. H., Still, C. N., et Abramson, R. K. (1981). Huntington's disease in black kindreds in South Carolina. *Arch Neurol* **38**, 412-4.
- Wu, G. Y., et Wu, C. H. (1988). Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* **263**, 14621-4.
- Wu, K., Xu, J. L., Suen, P. C., Levine, E., Huang, Y. Y., Mount, H. T., Lin, S. Y., et Black, I. B. (1996). Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res* **43**, 286-90.
- Wullner, U., Young, A. B., Penney, J. B., et Beal, M. F. (1994). 3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J Neurochem* **63**, 1772-81.
- Yang, Y., Jooss, K. U., Su, Q., Ertl, H. C., et Wilson, J. M. (1996a). Immune responses to

viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther* **3**, 137-44.

Yang, Y., Greenough, K., et Wilson, J. M. (1996b). Transient immune blockade prevents formation of neutralizing antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver. *Gene Ther* **3**, 412-20.

Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E., et Wilson, J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4407-11.

Zech, M., Roberts, G. W., Bogerts, B., Crow, T. J., et Polak, J. M. (1986). Neuropeptides in the amygdala of controls, schizophrenics and patients suffering from Huntington's chorea: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* **71**, 259-66.

Zeitlin, S., Liu, J. P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., et Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* **11**, 155-63.