

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2013

n° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

39

Transfert de gènes dans le système nerveux central d'un modèle félin de maladie du motoneurone

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, santé

Spécialité : Biologie moléculaire

Présenté et soutenue publiquement par :

Thomas BUCHER

Le 25 juin 2013, devant le jury ci-dessous

Président :

Rapporteurs : Pr. Thomas VOIT

Dr. Hélène PUCCIO

Examineur : Dr. Sylvie RAOUL

Directeur de thèse : Dr. Philippe MOULLIER

Remerciements

Je voudrais d'abord témoigner ma reconnaissance à Philippe Moullier et à Béatrice Joussemet pour m'avoir accueilli au laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de grandir dans le monde de la science. La qualité de leur encadrement, patient et pertinent, et la richesse de l'expérience qu'ils ont partagée avec moi m'ont beaucoup apporté.

Je tiens également à remercier Hélène Puccio, Sylvie Raoul et Thomas Voit de m'avoir fait l'honneur d'être membres du jury de ma thèse.

Merci à Nicolas Ferry et Fabienne Rolling d'avoir trouvé le temps, malgré une faible disponibilité, de suivre ma formation et de l'enrichir de leur expérience.

Merci à Marie-Anne Colle pour ses patientes relectures et corrections, ainsi qu'à Carine Ciron sans qui, si elle n'avait pas habité Champtoceaux, je n'aurais probablement pas eu la possibilité de vivre cette expérience.

Un grand merci à Maud Maquigneau et Delphine Nivard qui ont grandement contribué à l'ensemble des résultats de ce travail, et qui m'ont soutenu en toutes circonstances. Merci aussi à tous nos collaborateurs : toute l'équipe d'anapath pour leur expertise enthousiaste, Martine Barkats pour les riches discussions que nous avons partagées, et Jean-Yves Hogrel et Eric Barrey pour leur combat (désespéré ?) contre l'entêtement félin.

Merci à John Fyfe qui était prêt à m'accueillir parmi ses chats auxquels je suis allergique... et pour tous les échanges passionnants que nous avons eus, sans oublier Erin Wakeling.

À l'ensemble du labo, Lolita et Kizito qui m'ont accueilli dans leur bureau et ont égayé ma retraite anticipée, le CPV qui produit efficacement certes, mais avec une bonne humeur et une facilité déconcertantes, Anita, toujours aux petits soins, l'ensemble du personnel du Centre de Boisbonne pour le temps et l'énergie consacrés aux chatons espérés, et enfin, pour reprendre la formule d'Adrien, les anciens thésards disparus au combat : Sylvain et Brahim, les grands frères...

Merci aussi à l'Association française contre les myopathies qui a grandement participé au financement de ce travail.

À Adrien, Mickaël et Pierre, si différents et pourtant avec le même regard pétillant d'ingéniosité et d'amitié. Merci de tout cœur pour votre fidélité.

À Vincent, Sophie, Boris, David, Cécilia, Maxime, Vincent, Benoît, merci d’avoir fait de ces années de thèse et de fac des souvenirs incroyables que j’ai hâte de transmettre...

Je voudrais dédier cette thèse à mes parents et à mes sœurs. Si j’ai déjà prouvé qu’il était difficile de leur exprimer toute ma gratitude sur une feuille A4, je commence à douter que 300 pages puissent y parvenir...

Et enfin à Eloïse et Achille, témoins que les plus belles histoires ne peuvent parfois pas être écrites. Avec tout mon amour.

Sommaire

Sommaire	iv
Liste des abréviations	viii
Liste des figures et tableaux	x
I Introduction	1
I.1 Les maladies du motoneurone	2
I.1.1 Neurones moteurs et unité motrice	2
<i>I.1.1.1 Anatomie fonctionnelle de la moelle épinière</i>	2
<i>I.1.1.2 Unité motrice</i>	9
<i>I.1.1.3 Commande du mouvement</i>	14
I.1.2 La pathogénie des maladies du motoneurone	17
<i>I.1.2.1 Classification des maladies du motoneurone</i>	17
<i>I.1.2.2 Pathogénie des amyotrophies spinales</i>	19
<i>I.1.2.3 Pathogénie de la sclérose latérale amyotrophique</i>	27
<i>I.1.2.4 Autres maladies du motoneurone</i>	33
I.1.3 Les modèles animaux de maladies du motoneurone	36
<i>I.1.3.1 Modèles invertébrés</i>	37
<i>I.1.3.2 Modèles murins</i>	38
<i>I.1.3.4 Modèles « gros animaux »</i>	43
I.2 Transfert de gène dans le système nerveux central à l'aide de vecteurs AAV recombinants	54
I.2.1 Thérapie génique	54
I.2.2 Généralités sur les AAV	56
<i>I.2.1.1 Biologie de l'AAV</i>	56
<i>I.2.1.2 Production d'AAV recombinant</i>	62
<i>I.2.1.3 Utilisation d'AAV in vivo</i>	65
I.2.3 Transfert de gène dans le SNC par injection intracérébrale de vecteurs AAV	67

I.2.3.1	<i>Les différentes structures cérébrales ciblées et leurs applications cliniques ...</i>	67
I.2.3.2	<i>Injection intracérébrale dans le but d'atteindre la moelle</i>	75
I.2.3.3	<i>Applications cliniques actuelles.....</i>	78
I.2.3.4	<i>Limites de cette stratégie dans le cadre des maladies du motoneurone</i>	81
I.2.4	Transfert de gène dans le SNC par injection périphérique de vecteurs AAV	83
I.2.4.1	<i>Injection intramusculaire et transport axonal de l'AAV.....</i>	83
I.2.4.2	<i>Injection vasculaire et passage de la barrière hémato-méningée</i>	86
I.2.4.3	<i>Limites de ces stratégies dans le cadre des maladies du motoneurone.....</i>	92
I.2.5	Transfert de gène dans le SNC par injection de vecteurs AAV dans le liquide céphalorachidien.....	94
I.2.5.1	<i>Injection intracérébroventriculaire</i>	94
I.2.5.2	<i>Injection intracisternale.....</i>	97
I.2.5.3	<i>Injection intrathécale lombaire.....</i>	100
I.2.5.4	<i>Limites de cette stratégie dans le cadre des maladies du motoneurone</i>	104
I.2.6	Pistes d'amélioration concernant le transfert de gène dans le SNC à l'aide de vecteurs AAV	106
I.2.6.1	<i>Choix des promoteurs</i>	106
I.2.6.2	<i>Modification de la capside de l'AAV</i>	109
I.2.6.3	<i>Utilisation de séquences cibles des micro-ARN.....</i>	111
II	Résultats	114
II.1	Objectifs et description de l'étude expérimentale	115
II.1.1	Objectif général	115
II.1.2	Choix du modèle animal.....	116
II.1.3	Stratégie expérimentale générale.....	117
II.2	Évaluation de trois voies d'administration d'un vecteur AAV pour transférer le VEGF dans la moelle du modèle félin LIX1	123
II.3	Transfert du gène LIX1 par injections intraveineuse et intracisternale d'AAV9 chez le chat LIX1 nouveau-né	166

II.3.1 Objectifs et stratégie expérimentale	166
<i>Choix du gène LIX1</i>	166
<i>Choix des modes d'injection</i>	166
<i>Choix de l'âge d'injection</i>	167
<i>Choix du promoteur</i>	167
<i>Choix des techniques de suivi phénotypique</i>	168
<i>Choix de la durée de suivi post-injection</i>	168
II.3.2 Matériel et méthodes	169
<i>Plasmides et vecteurs recombinants fLIX1</i>	169
<i>Détection de la protéine fLIX1-cmyc in vitro</i>	169
<i>Étude in vivo</i>	170
<i>qPCR</i>	172
<i>RT-qPCR</i>	172
<i>Évaluation de la pathologie féline</i>	174
II.3.3 Résultats obtenus	176
<i>Vérification de la fonctionnalité des vecteurs LIX1 et expression in vitro</i>	176
<i>Injections IV du vecteur AAV9-LIX1 chez 3 chatons malades nouveau-nés</i>	180
<i>Évaluation thérapeutique pour les chats malades injectés LIX1 en IV néonatale</i>	183
<i>Injections ICis du vecteur AAV9-LIX1 chez 4 chats sains nouveau-nés</i>	191
<i>Injection ICis du vecteur AAV9-LIX1 chez des chatons malades nouveau-nés et évaluation thérapeutique</i>	193
<i>Messages principaux de l'étude LIX1</i>	193
II.4 Cartographie de l'expression de la GFP dans le SNC de chats adultes et nouveau-nés après injection intracisternale d'AAV9	195
III Discussion et perspectives	215
Efficacité des voies d'injection	217
Résultats avec la voie IC	218
Résultats avec la voie IV	219

Efficacité de la voie ICis	220
Perspectives	228
Efficacité thérapeutique.....	230
mVEGF	230
fLIX1	232
Perspectives	238
Conclusion générale	241
IV Bibliographie	242

Liste des abréviations

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AAV	<i>adeno-associated virus</i> (virus adéno-associé)
ACh	acétylcholine
Ad5	adénovirus
ALS	<i>amyotrophic lateral sclerosis</i> (sclérose latérale amyotrophique)
ARSA	<i>arylsulfatase A</i>
ASM	<i>acid sphingomyelinase</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHM	barrière hémato-méningée
CAG	promoteur <i>CMV enhancer/chicken β-actin</i>
CBh	promoteur <i>CMV enhancer/chicken β-actin</i> hybride
CMAP	<i>compound muscular action potential</i> (composante musculaire du potentiel d'action)
CMV	promoteur du <i>cytomegalovirus</i>
CTB	<i>cholera toxin B subunit</i>
DRG	<i>dorsal root ganglion</i> (ganglion rachidien dorsal)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMG	électromyogramme ou électromyographie
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
FTLD	<i>fronto temporal lobar degeneration</i> (dégénérescence lobaire fronto-temporale)
FUST/TLS	<i>fused in sarcoma/translocated in liposarcoma</i>
GDNF	<i>glial cell derived neurotrophic factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUSB ou βGLU	β -glucuronidase ou promoteur de la β -glucuronidase
HEK293	<i>human embryonic kidney cell line 293</i>
HSV	<i>herpes simplex virus</i>
hSYN	synapsine-1 humaine
IC	intracérébral
ICis	intracisternal
ICV	intracérébroventriculaire
IDUA	α -L-iduronidase
IGF1	<i>insulin growth factor 1</i>
IM	intramusculaire
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
IV	intraveineuse
LCS	liquide cérébro-spinal
LIX1	<i>limb expression 1</i>
LNPEP	<i>leucyl/cystinyl aminopeptidase</i>
MECP2	<i>methyl-CpG-binding protein-2</i>
miR	micro ARN
MLD	<i>metachromatic leukodystrophy</i> (leucodystrophie métachromatique)

MN	motoneurone
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPS	mucopolysaccharidose
mRBP	<i>mRNA binding proteins</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein complexes</i>
NPA	Niemann-Pick de type A
NSE	promoteur <i>neuron specific enolase</i>
NT3	neurotrophine 3
PBP	paralysie bulbaire progressive
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
qPCR/RT-qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction/reverse transcription</i>
PDGF-β	promoteur <i>platelet-derived growth factor β-chain</i>
PGK	promoteur de la phosphoglycérate kinase
pi	particules infectieuses
PLS	<i>primary lateral sclerosis</i> (sclérose latérale progressive)
PMA	<i>progressive muscular atrophy</i> (amyotrophie progressive)
PML/PCC	puissance médio-latérale rapportée à la puissance cranio-caudale
RNP	<i>ribonucleoprotein</i>
RPL32	<i>L32 ribosomal protein gene</i>
RQ	<i>relative quantity</i>
RSV	<i>rous sarcoma virus</i>
SBMA	<i>spinal and bulbar muscular atrophy</i> (amyotrophie spinale et bulbaire)
scAAV	<i>self-complementary adeno-associated virus</i> (virus adéno-associé double brin)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMA	<i>spinal muscular atrophy</i> (amyotrophie spinale)
SMN	<i>survival of motor neuron</i>
SNC	système nerveux central
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>
SOD1	<i>Cu/Zn superoxide dismutase 1</i>
SP2/ASF	<i>splicing factor 2/alternative splicing factor</i>
ssAAV	<i>single stranded adeno-associated virus</i> (virus adéno-associé simple brin)
SV40	<i>simian virus 40</i>
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TDP-43	<i>TAR (HIV trans-activating DNA response element)-DNA binding protein 43 kDa</i>
trs	<i>terminal resolution site</i> (site terminal de résolution)
UTR	<i>untranslated region</i> (région non traduite)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vg	<i>viral genomes</i>

Liste des figures et tableaux

Fig.1) Morphologie externe de la moelle épinière.....	5
Fig.2) Morphologie interne de la moelle épinière	8
Fig.3) Organisation et fonction de l'unité motrice.....	9
Fig.4) Commande du mouvement	15
Fig.5) Génétique, expression et fonctions probables de SMN.....	22
Fig.6) Illustration de trois types de mécanismes pathogéniques de l'ALS	31
Fig.7) Caractéristiques cliniques et histologiques de la pathologie du motoneurone féline.....	48
Fig.8) Génome de l'AAV et structure de l'ITR.....	57
Fig.9) Production d'AAV recombinant par tri-transfection et contaminations possibles dans le lot purifié	64
Fig.10) Résumé des trois grandes stratégies expérimentales de ce projet.....	118
Fig.11) Vérification de la fonctionnalité des plasmides-vecteurs LIX1 par transfection de cellules HEK293	178
Fig.12) Vérification de la fonctionnalité du vecteur scAAV9-CMV-KOZAK-LIX1-cmyc in vitro	179
Fig.13) Biodistribution du vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1-cmyc après injection IV néonatale chez deux chatons LIX1 ^{-/-}	180
Fig.14) Quantités relatives d'ARNm fLIX1 retrouvé dans la moelle et le foie de chats contrôles et des chats LIX1 ^{-/-} malades injectés LIX1 en IV néonatale	182
Fig.15) Évaluation thérapeutique des chats LIX1 ^{-/-} malades injectés LIX1 par voie IV néonatale	184
Fig.16) Validation des analyses accélérométriques à l'aide du Locomotrix chez des chats adultes sains et malades.....	185
Fig.17) Représentation en radars de l'évolution des trois paramètres accélérométriques mesurés chez des chats sains et des chats SMA à six âges différents	187
Fig.18) Analyse de régression logistique appliquée aux mesures accélérométriques	188
Fig.19) Analyse morphométrique des racines ventrales de la moelle lombaire des chats malades injectés LIX1 en IV néonatale	190
Fig.20) Biodistribution du vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1 après injections IV ou ICis néonatales	192
Fig.21) Quantités relatives d'ARNm fLIX1 retrouvé dans la moelle et le foie de chats contrôles, des chats LIX1 ^{-/-} malades injectés LIX1 en IV néonatale et de chats sains injectés LIX1 en ICis néonatale.....	194
Fig.22) Modifications de la structure de la barrière hémato-méningée au cours du développement influençant la capacité de l'AAV9 à transduire différents types cellulaires dans le tissu nerveux	223
Fig.23) Différenciation des cellules souches neurales pour former le tissu nerveux mature	224
Fig.24) Expression du vecteur scAAV9-CBh-GFP chez un chaton nouveau-né injecté par voie ICis à une dose de 10 ¹³ vg/kg	228
Fig.25) Alignement des séquences des cDNA LIX1 félin (NM_001048162.1) et LIX1 humain (NM_153234.4) ..	235
Fig.26) Schéma représentant le gène LIX1 félin et illustrant la taille importante des introns par rapports aux régions codantes	237

Tab.1) Récapitulatif des principales maladies du motoneurone.....	19
Tab.2) Chronologie de l'évolution des symptômes chez le chat LIX1 ^{-/-}	49
Tab.3) Récapitulatif des grands mécanismes pathogéniques identifiés chez les modèles murins de SMA et d'ALS et chez le chat LIX1.....	53
Tab.4) Principales caractéristiques des sérotypes d'AAV les plus couramment utilisés.....	60
Tab.5) Tableau récapitulatif des chats injectés dans l'étude LIX1.	171
Tab.6) Liste des amorces et sondes utilisées dans l'étude LIX1 en PCR quantitative	174
Tab.7) Récapitulatif des injections réalisées chez le chat au cours de cette étude	218

I Introduction

“If the brain were so simple we could understand it, we would be so simple we couldn't.”
Lyall Watson

I.1 Les maladies du motoneurone

Les maladies du motoneurone font à la fois partie des maladies neurodégénératives, qui affectent le fonctionnement des cellules nerveuses et des maladies neuromusculaires caractérisées par une atteinte de l'unité motrice.

En fonction du niveau de l'atteinte au sein de l'unité motrice, différentes maladies neuromusculaires sont distinguées, les atteintes des fibres musculaires ou myopathies, les anomalies de la jonction neuromusculaire, les maladies touchant le nerf moteur (neuropathies périphériques ou polyneuropathies) et les maladies du motoneurone, également appelées maladies de la corne antérieure ([Menezes 2012](#)). Les maladies du motoneurone regroupent des pathologies aux profils différents, incluant des formes congénitales, héréditaires ou acquises et des formes progressives ou aiguës. Elles sont toutes caractérisées par une dégénérescence des neurones moteurs des cornes ventrales de la moelle épinière et de certains noyaux centraux, se traduisant cliniquement par une amyotrophie et une faiblesse musculaire progressives avec une diminution de l'intensité des réflexes et une anomalie de la posture. En termes d'épidémiologie, la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'homme, l'amyotrophie spinale, représente la deuxième cause la plus commune de mortalité infantile avec une fréquence estimée entre 1/ 6000 et 1/ 10 000 naissances ([D'Amico 2011](#)).

I.1.1 Neurones moteurs et unité motrice

I.1.1.1 Anatomie fonctionnelle de la moelle épinière

Morphologie externe

Le système nerveux central (SNC) contient l'ensemble des structures anatomiques responsables des relations avec l'extérieur de l'organisme, structures qui véhiculent des informations sensibles et motrices *via* le système nerveux périphérique composé essentiellement par les nerfs. Le système nerveux de la vie végétative, ou système nerveux autonome, est dédié aux organes internes. Au sein du SNC, la moelle épinière fait suite à l'encéphale, en continuité du bulbe rachidien, ou moelle allongée. La moelle épinière est contenue dans le rachis au niveau du canal rachidien, formé par les pédicules et les lames vertébraux. Elle commence au niveau de la première paire de racines cervicales entre le *foramen magnum* et l'atlas (C1, première vertèbre cervicale), et se termine au niveau du cône

médullaire, rattaché au rachis par le *filum terminal* à un niveau qui varie en fonction des espèces de vertébrés (**fig1a**). L'ancrage dans le canal rachidien est maintenu tout le long de la moelle par des ligaments dentelés et longitudinaux. La moelle présente deux renflements ou intumescences, l'une cervicale et l'autre lombaire, correspondant respectivement à l'innervation des membres thoraciques et pelviens (**fig1b**). Les nerfs spinaux émergent latéralement de la moelle et sortent du canal vertébral par les foramens intervertébraux. Chaque paire de nerfs spinaux porte le nom de la vertèbre sous-jacente au niveau duquel ils sortent du canal. L'homme possède 31 paires de nerfs, le chat 38 et le rat 34. A partir de la naissance, une croissance du rachis plus rapide que la moelle induit un décalage entre l'émergence des racines et leur sortie de plus en plus marqué vers la partie terminale, avec un allongement du trajet à l'intérieur du canal vertébral. Après le cône médullaire, les racines nerveuses forment la queue de cheval.

La moelle, comme l'ensemble du SNC, est entourée de trois membranes, les méninges (**fig1c**). La plus fine, la pie-mère, est accolée à la moelle et parcourue par de nombreux capillaires : c'est une membrane nourricière. L'arachnoïde est séparée de la pie-mère par l'espace sub-arachnoïdien dans lequel circule le liquide cébrospinal ou encore liquide cébro-spinal (LCS). Enfin, la dure-mère, une membrane protectrice plus épaisse et fibreuse, est accolée à l'arachnoïde et accompagne le nerf spinal jusqu'au foramen intervertébral.

Le LCS baigne l'ensemble du SNC et joue un rôle de protection (i) mécanique en permettant d'alléger le poids du SNC et d'amortir les chocs, (ii) chimique par régulation de l'équilibre ionique du tissu nerveux et par élimination des déchets métaboliques, et (iii) immunologique en contenant des médiateurs de l'immunité humorale et cellulaire, comme des IgG ([Prasad 1985](#)). Le LCS est produit dans les ventricules latéraux du cerveau au niveau des plexus choroïdes qui sont des invaginations de pie-mère et d'arachnoïde contenant un nombre important de capillaires fenêtrés, à partir du plasma par filtration et échanges d'ions ([Sakka 2011](#)). La résorption du LCS est réalisée principalement par les villosités arachnoïdiennes au niveau cérébral, par un drainage lymphatique et, dans une moindre mesure, par les villosités arachnoïdiennes au niveau de la moelle ([Pollay 2010](#)). Ces villosités arachnoïdiennes sont également à l'origine du mouvement du LCS, en créant des pulsations étroitement liées au rythme cardiaque ([Pollay 2010](#), [Sato 2012](#)). Par conséquent, le flux de LCS est dirigé depuis les zones du SNC particulièrement riches en villosités arachnoïdiennes comme les plexus choroïdes des ventricules cérébraux, vers les zones qui en sont moins pourvues : le cervelet et la moelle (**fig1d**).

Introduction

Le volume de LCS, environ 2 ml/kg (150 ml chez l'homme, 0,04 ml chez la souris) est renouvelé quatre fois par jour (production de 400 à 600 ml/j chez l'homme). La pression du LCS résulte de l'équilibre dynamique entre la sécrétion, la résorption et la résistance à l'écoulement. Elle est située physiologiquement autour de 8,8 mmHg chez le chat ([Klarica 2006](#)) et entre 10 et 15 mmHg chez l'homme ([Sakka 2011](#)). Une pression supérieure du LCS a des répercussions surtout au niveau cérébral, où la rigidité de l'os du crâne peut impliquer des phénomènes de compression. On parle dans ce cas d'hypertension intracrânienne ou hydrocéphalie, pouvant entraîner des lésions tissulaires, une diminution du flux sanguin, ou encore un engagement cérébral.

Introduction

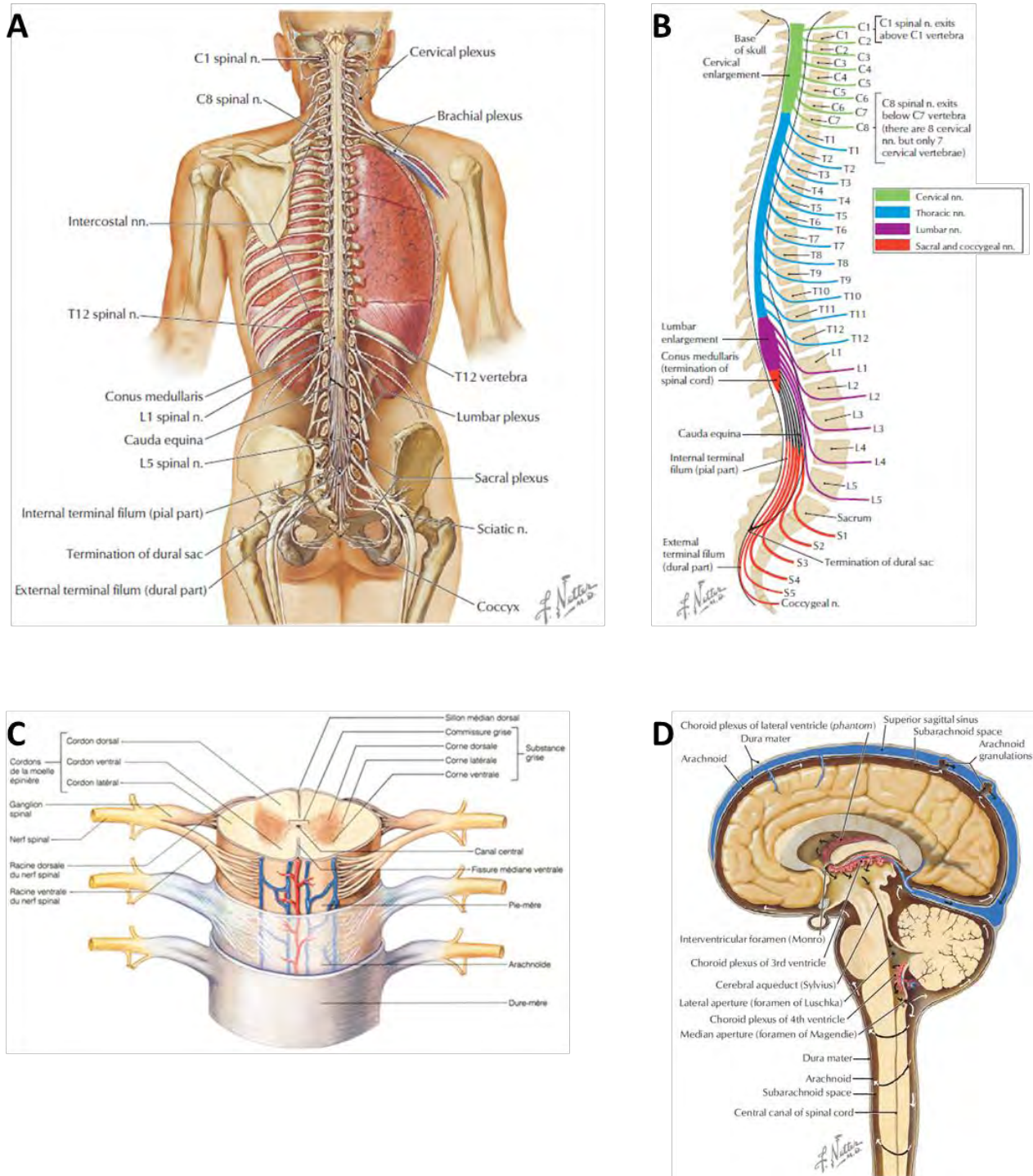


Fig.1) Morphologie externe de la moelle épinière. (A) Moelle et nerfs rachidiens in situ. (B) Intumescences de la moelle et rapports des racines médullaires avec les vertèbres. (C) Organisation des méninges au niveau de la moelle. (D) Circulation du liquide céphalorachidien. (A, B, D) Tirés de Netter F.H., 1999. *Atlas d'anatomie humaine*, 2nd ed. Maloine ; (C) Tiré de Marieb E.N., 1999. *Anatomie et physiologie humaines*, 2nd ed. ERPI.

Configuration interne

Au niveau macroscopique, la moelle présente une différenciation dorso-ventrale marquée par les racines spinales dorsales présentant un renflement : le ganglion rachidien dorsal (DRG pour *dorsal root ganglion*) et les racines ventrales qui rejoignent les premières pour former le nerf spinal (**fig2a**). Cette différenciation dorso-ventrale a un impact fonctionnel puisque les racines dorsales résultent de l'assemblage de fibres sensibles et les racines ventrales de fibres motrices. En coupe transversale, la moelle est organisée en deux tissus différents : la substance grise autour du canal de l'épendyme, en forme de papillon, et la substance blanche en périphérie, disposée en cordons (**fig2a**).

La substance grise est composée essentiellement des corps cellulaires et dendrites des neurones ainsi que des cellules de soutien : les cellules gliales. Les cornes dorsales correspondent à l'émergence des racines dorsales et contiennent les corps cellulaires des neurones sensitifs. Les cornes ventrales contiennent les neurones moteurs, et sont plus développées latéralement au niveau des intumescences. Associées à ces neurones, les cellules gliales sont de quatre types : les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes et les cellules épendymales.

- Les astrocytes sont les cellules gliales les plus communes. Leurs nombreux processus qui leur donnent une forme étoilée (d'où leur nom) établissent des contacts multiples avec les neurones et les cellules endothéliales des capillaires. De ce fait, les astrocytes ont un rôle de maintien de la structure tissulaire et de réparation des tissus endommagés. De plus, ils constituent l'interface entre la circulation et les neurones et ont ainsi une fonction nutritive, mais également protectrice en formant la barrière hémato-méningée (**fig2a**). Enfin, des études récentes ont indiqué que les astrocytes peuvent répondre à des stimulations en propageant des ondes Ca^{2+} et en libérant des gliotransmetteurs ([Fiacco 2009](#)). D'autres études ont montré que les astrocytes jouent un rôle promoteur dans la neurogénèse ([Ashton 2012](#)).
- La microglie représente les macrophages du SNC et forme ainsi la principale défense immunitaire au sein du tissu nerveux.
- Comme les astrocytes, les oligodendrocytes émettent de nombreux prolongements cellulaires vers les axones des neurones pour les entourer d'une gaine de myéline. L'enroulement progressif de feuillets de cette substance lipidique, constituant la gaine de myéline, permet d'isoler électriquement l'axone et assure ainsi une propagation plus rapide

de l'influx nerveux. L'équivalent des oligodendrocytes pour le système nerveux périphérique sont les cellules de Schwann ou neurolemmocytes.

- Enfin, les cellules épendymaires ou épendymocytes bordent le canal de l'épendyme. Ces cellules présentent à leur surface apicale des microvillosités qui permettent la sécrétion ou la réabsorption du LCS en formant une interface fonctionnelle plus qu'une véritable barrière perméable (absence de zonula occludens). Elles présentent également des cils mobiles favorisant la circulation du LCS.

La substance grise de la moelle a été divisée en différentes couches ou lames selon la classification établie chez le chat par Bror Rexed ([Rexed 1952](#), [Rexed 1954](#)). Cette classification est l'équivalent dans la moelle de la classification réalisée dans le cerveau par Korbinian Brodmann décrivant des aires correspondant à l'organisation structurale apparente du cortex. La classification de Rexed dénombre dix lames (I à X) (**fig2b**). Les lames I à VI constituent la corne dorsale et correspondent donc à des fonctions sensitives. La lame VII correspond à la zone intermédiaire, une zone hétérogène constituée en partie d'interneurones du système nerveux autonome. Les lames VIII et IX contiennent les motoneurones α de la corne ventrale organisés de deux façons. Les commandes des muscles axiaux et proximaux proviennent des motoneurones en position médiale, et en position latérale pour les muscles distaux, ce qui expliquant par ailleurs le développement marqué des cornes ventrales en partie latérale au niveau des intumescences. Les motoneurones correspondant à des muscles extenseurs ont une position plus ventrale que pour les neurones fléchisseurs (**fig2b**).

La substance blanche est constituée de fibres nerveuses : les axones des neurones moteurs et sensitifs, accompagnés des oligodendrocytes pour les axones myélinisés. Ces fibres sont organisées en tractus, c'est-à-dire en ensembles de fibres ayant les mêmes origines et terminaisons, ou en faisceaux, avec des fibres liées entre elles sans origine ou terminaison commune. Ces tractus et faisceaux sont classiquement désignés par les organes qu'ils relient, comme par exemple le tractus cortico-spinal qui relie les neurones du cortex aux motoneurones de la corne ventrale de la moelle. Les fibres ascendantes, constituées par les axones des neurones sensitifs, remontent les informations sensorielles aux centres supérieurs, tandis que les fibres descendantes, constituées par les axones des neurones moteurs, envoient les signaux de commande aux organes effecteurs (**fig2c**).

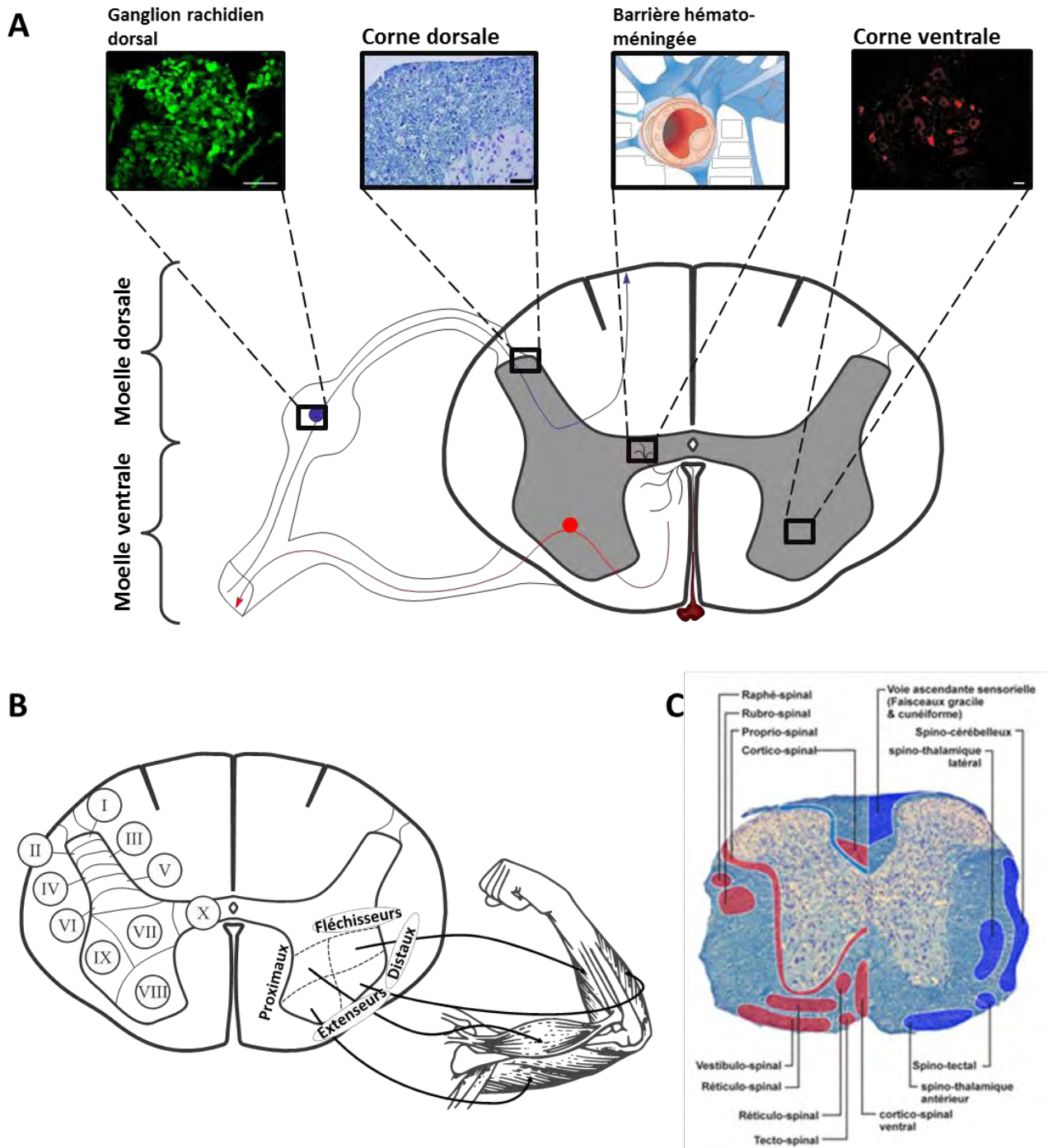


Fig.2) Morphologie interne de la moelle épinière. (A) Coupe transversale de moelle et de ganglion rachidien indiquant la localisation et la fonction des différents types cellulaires retrouvés dans la moelle. Ganglion rachidien : marquage NeuN indiquant le corps des neurones sensitifs, échelle : 100 μ m, tiré de ([Schaeffer 2010](#)) ; Corne dorsale : marquage hématoxyline et éosine indiquant les corps cellulaires et les fibres nerveuses, échelle : 100 μ m, tiré de ([Fujimura 2011](#)) ; Barrière hémato-méningée : schéma indiquant les jonctions serrées des cellules endothéliales des capillaires et la couronne de pieds astrocytaires formant une barrière entre la circulation sanguine et

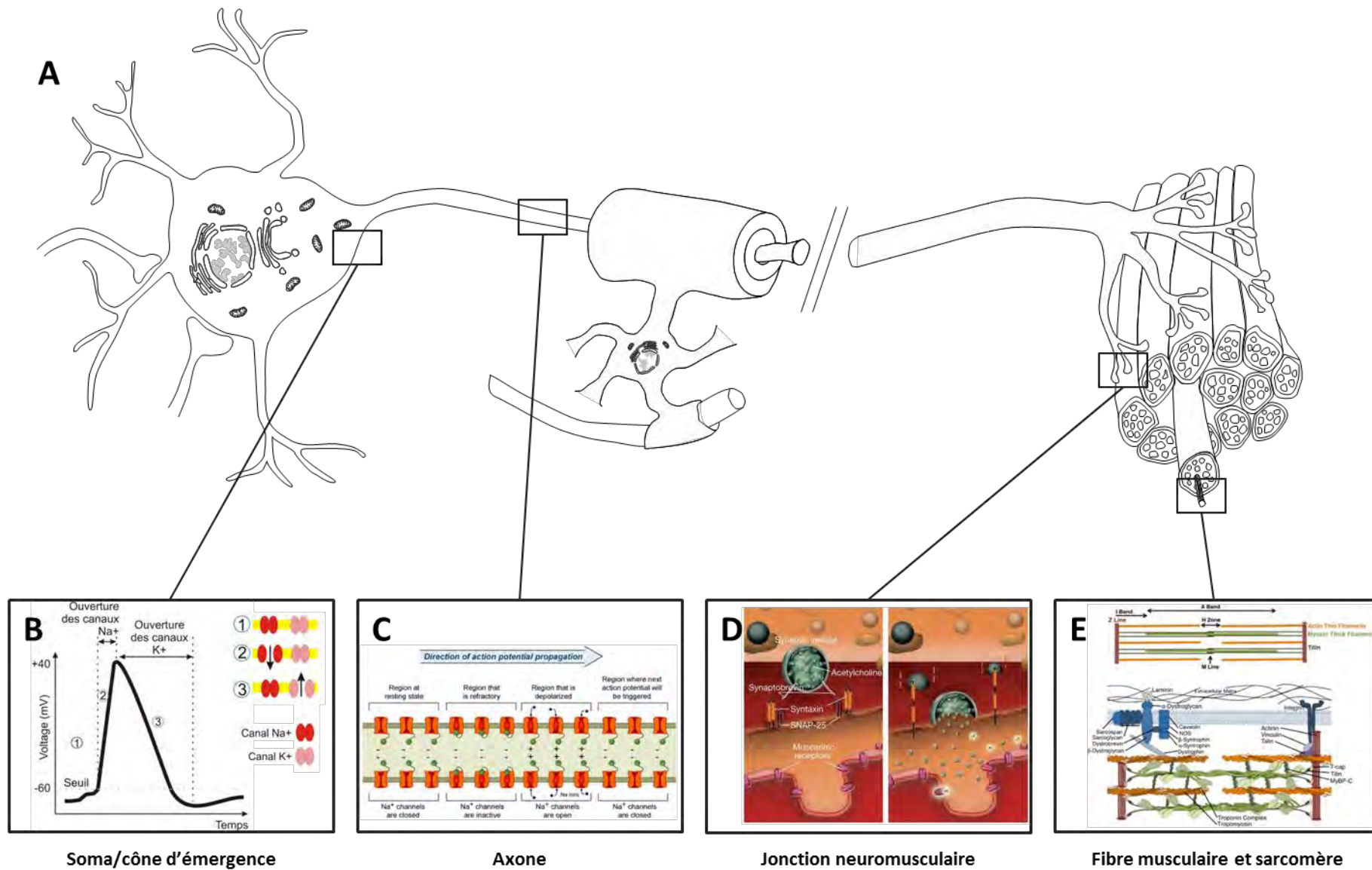
(Fig.2), suite) le tissu nerveux, tiré de ([Cecchelli 2007](#)) ; Corne ventrale : marquage choline acétyltransférase indiquant les corps cellulaires des motoneurones, échelle : 50 μ m, tiré de ([Duque 2009](#)). (B) Schéma de coupe transversale de moelle indiquant à gauche l'organisation de la matière grise selon la classification de Rexed, et à droite la répartition dans la corne ventrale des motoneurones selon leur fonction motrice. (C) Coupe de moelle annotée indiquant les différents tractus et faisceaux de fibres descendantes, sensibles en bleu et ascendantes, motrices en rouge ; tiré de Tortora G.J., Grabowski S.R., 2001. Principes d'anatomie et de physiologie, 9ème ed. ERPI.

1.1.1.2 Unité motrice

L'unité motrice est l'élément de base de la contraction musculaire. Elle correspond à l'association d'un neurone moteur et des fibres musculaires qu'il innerve. La fonction de l'unité motrice est de transmettre un signal électrique, l'influx nerveux ou potentiel d'action, à partir du corps cellulaire du motoneurone, *via* le nerf, aux cellules musculaires pour qu'elles se contractent ([fig3](#)).

Légende de la Fig3 (page suivante) :

Fig.3) Organisation et fonction de l'unité motrice. (A) Schéma illustrant les différents éléments fonctionnels de l'unité motrice. (B) Caractéristiques du potentiel d'action avec les canaux impliqués dans dépolarisation membranaire. (C) Propagation du potentiel d'action le long de l'axone. Tiré du [site web](#) de l'université de Pennsylvannie. (D) Schéma indiquant la libération du neurotransmetteur acétylcholine dans la fente synaptique de la jonction neuromusculaire. Tiré de ([Chancellor 2008](#)). (E) Organisation du sarcomère et des différents éléments responsables de la contraction de la fibre musculaire. Le glissement des filaments d'actine en orange le long des filaments de myosine en vert permet un raccourcissement du sarcomère et donc la contraction musculaire. Tiré de ([Harvey 2011](#)).



Motoneurone

Les motoneurones (MN) sont des neurones qui génèrent ou transmettent des messages nerveux de type moteur, c'est-à-dire destinés à provoquer une contraction musculaire. Les MN sont des cellules multipolaires un axone unique, souvent long, et de nombreuses dendrites courtes fortement arborisées, permettant une connexion des neurones entre eux (**fig3a**). En outre, les dendrites possèdent une machinerie traductionnelle locale permettant de nombreux mécanismes de régulation synaptique qui jouent un rôle prédominant dans la plasticité du SNC ([Rochefort 2012](#)). Le corps cellulaire (ou soma) du MN a pour particularité de contenir un réticulum endoplasmique granuleux particulièrement riche en ribosomes, formant des agrégats appelés corps de Nissl, détectables en microscopie photonique avec un marquage au bleu de toluidine ou au crésyl violet.

Le soma du MN reçoit des potentiels post-synaptiques et les propage jusqu'au principal lieu de genèse du potentiel d'action : le cône d'émergence à la base de l'axone (**fig3b**). Le potentiel d'action correspond à une impulsion de dépolarisation de la membrane plasmique permise par un échange d'ions *via* des canaux voltages-dépendants et résulte de la somme des potentiels post-synaptiques parvenu au cône d'émergence ([Kole 2012](#)). La membrane est dépolarisée jusqu'à une valeur seuil à partir de laquelle les canaux sodiques voltage-dépendants s'ouvrent, ce qui a pour effet d'accentuer la dépolarisation membranaire et de créer un potentiel d'action.

Il existe deux types de MN, les MN α innervant les fibres musculaires standards et possédant des grands axones avec un diamètre compris entre 13 et 20 μm , et les MN γ innervant les fibres musculaires du fuseau neuromusculaire et possédant des axones plus petits, entre 5 et 8 μm .

Nerf – axone

L'axone prolonge le MN jusqu'à sa cible, la fibre musculaire. Il assure de ce fait deux fonctions principales : la transmission du potentiel d'action et le transport de composants nécessaires à la jonction neuromusculaire.

Concernant la transmission du potentiel d'action, la dépolarisation se poursuit par l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants de proche en proche (**fig3c**). La vitesse de propagation dépend de deux facteurs : d'une part le diamètre de l'axone, plus celui-ci est

important, plus la vitesse est grande, et d'autre part la présence ou non de myéline autour de l'axone. Dans un axone myélinisé, la propagation du potentiel d'action, dite saltatoire, est plus rapide que dans un axone non myélinisé. En effet, la gaine de myéline s'interrompt de façon régulière, laissant localement la membrane au contact du milieu extérieur au niveau de nœuds de Ranvier. Les canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants étant confinés aux seuls nœuds de Ranvier et la portion de membrane située entre deux nœuds étant isolée du milieu extérieur, le courant de déplacement ne peut s'établir qu'au niveau de ces nœuds. Ainsi, le potentiel d'action se propage en sautant d'un nœud de Ranvier à l'autre de façon rapide, entre 10 et 100 m.s⁻¹, contre environ 1 m.s⁻¹ pour les fibres amyélinisées.

L'axone présente une importante activité de transport entre le soma du MN et la jonction neuromusculaire. Le cytosquelette de l'axone est ainsi dédié à cette fonction en présentant un réseau particulièrement important de microtubules. Chaque microtubule est constitué d'un assemblage polarisé de dimères de sous-unités α et β de tubuline, permettant de diriger des protéines motrices disposant d'ATPases qui fournissent l'énergie nécessaire au transport de vésicules. Deux types de transport ont lieu :

- un transport antérograde vers la jonction neuromusculaire assuré de façon rapide (50 à 400 mm/jour) par les kinésines. Ce transport concerne des grosses vésicules contenant diverses molécules dont les neurotransmetteurs, mais aussi des facteurs neurotrophiques ([Chowdary 2012](#)), ou des mitochondries pour subvenir aux besoins énergétiques de la jonction neuromusculaire et de l'axone lui-même ([Saxton 2012](#)). Il existe un transport plus lent (0,1 à 5 mm/jour), moins bien décrit mais qui semblerait essentiel, notamment pour les composants structurels comme les microtubules ([Sadananda 2012](#)). Comme l'axone et la jonction terminale dépendent de ce transport, une coupure du nerf entraîne la dégénérescence de toute la partie située en aval de la coupure, appelée dégénérescence wallérienne.
- un transport rétrograde vers le soma assuré de façon rapide (100 à 200 mm/jour) par les dynéines. Ce type de transport est important pour le recyclage des molécules et vésicules utilisées mais également pour les mécanismes d'endocytose. Plusieurs virus, dont celui de l'herpès, ont la capacité d'emprunter ces transports pour remonter au soma depuis l'infection ou bien pour rejoindre la peau ou les muqueuses lors du cycle lytique ([Diefenbach 2008](#)).

Enfin, les défauts de transport axonal se traduisent par des axonopathies que l'on retrouve dans la plupart des maladies neurodégénératives, avec des accumulations anormales de protéines et d'organites ([De Vos 2008](#), [Morfini 2009](#), [Court 2012](#)).

Jonction neuromusculaire

La jonction neuromusculaire correspond à la synapse reliant la partie terminale de l'axone à la fibre musculaire. Sa fonction est de transmettre le signal nerveux, initialement sous la forme électrique d'un potentiel d'action, à la fibre musculaire sous forme chimique pour qu'elle puisse l'interpréter comme un ordre de contraction. La partie terminale de l'axone est souvent arborisée, permettant à un MN de contrôler plusieurs fibres musculaires, chaque fibre n'étant innervée que par un seul MN. L'association d'un MNα et des fibres musculaires qu'il innerve constitue l'unité motrice (**fig3a**).

Lorsque le potentiel d'action atteint la jonction neuromusculaire, une entrée massive d'ions Ca^{2+} permet l'exocytose des vésicules contenant de l'acétylcholine et la libération dans la fente synaptique (**fig3d**). Le nombre de fibres innervées par le MN et donc la taille de l'unité motrice, a un impact sur la force de contraction musculaire et la finesse du mouvement. En effet, plus le nombre de fibres musculaires innervées par un seul MN est important, plus la contraction induite par une unité motrice est puissante, mais moins le mouvement est fin. La finesse du mouvement est d'autant plus importante que le muscle est innervé par un grand nombre d'unités motrices de petite taille.

Muscle

Les muscles squelettiques permettent la motricité, c'est-à-dire un ensemble de fonctions assurant le mouvement, par opposition aux muscles lisses et au muscle cardiaque, commandés par le système nerveux autonome, qui assurent le fonctionnement d'organes. Les muscles renferment sous une membrane externe, l'épimysium, plusieurs fascicules de fibres musculaires entourées de périnysium (**fig3a**). La fonction des muscles squelettiques est de se contracter, c'est-à-dire de raccourcir leur longueur en réponse à un stimulus nerveux, permettant la mobilité des os auxquels ils s'insèrent via les tendons. Les fibres musculaires, ou myocytes, sont de longues cellules fusiformes qui dérivent de la fusion de plusieurs myoblastes. Ils possèdent plusieurs centaines de noyaux plaqués en périphérie sous la

membrane plasmique. Le cytoplasme des myocytes est en grande partie occupé par des myofibrilles, longues chaînes de sarcomères qui représentent l'unité de contraction. Après sa libération dans la fente synaptique de la jonction neuromusculaire, l'acétylcholine est captée par la plaque motrice, qui correspond à la portion de membrane musculaire post-synaptique, *via* ses récepteurs cholinergiques. La liaison de l'acétylcholine à son récepteur entraîne une entrée massive d'ions Na^+ , et une dépolarisation qui se propage le long du réticulum endoplasmique lisse du myocyte pour y libérer des ions Ca^{2+} . Ces derniers permettent un changement de conformation de la tropomyosine qui rend possible l'interaction entre la myosine et l'actine, les deux composants fonctionnels du sarcomère, aboutissant au raccourcissement de ce dernier (**fig3a**).

1.1.1.3 Commande du mouvement

La commande du mouvement est initiée par le cortex cérébral, plus précisément par les neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex, au niveau de l'aire 4 de la classification de Brodmann. La répartition de ces neurones pyramidaux le long du cortex, ou somatotopie, peut être représentée sous forme d'*homunculus* pour visualiser l'innervation motrice de l'ensemble des muscles squelettiques du corps (**fig4a**). La motricité est réalisée par une seule synapse entre les neurones pyramidaux et les MN à tous les étages de la moelle (**fig4a**).

Cependant, cette voie monosynaptique ne peut pas suffire à coordonner le mouvement, c'est-à-dire à contrôler le tonus et les recrutements spatial et temporel des fibres musculaires. Ce contrôle est pris en charge par les noyaux gris centraux, qui comprennent le striatum composé du noyau caudé et du putamen, le pallidum, le noyau sous-thalamique et la substance noire (**fig4b**). Les noyaux gris centraux forment un réseau complexe de connexions excitatrices à l'aide de synapses utilisant le glutamate, et inhibitrices avec des synapses utilisant l'acide γ -aminobutyrique (**fig4c**) ; l'information nerveuse étant principalement codée par la fréquence des pics de potentiels d'action ([Ainsworth 2012](#)).

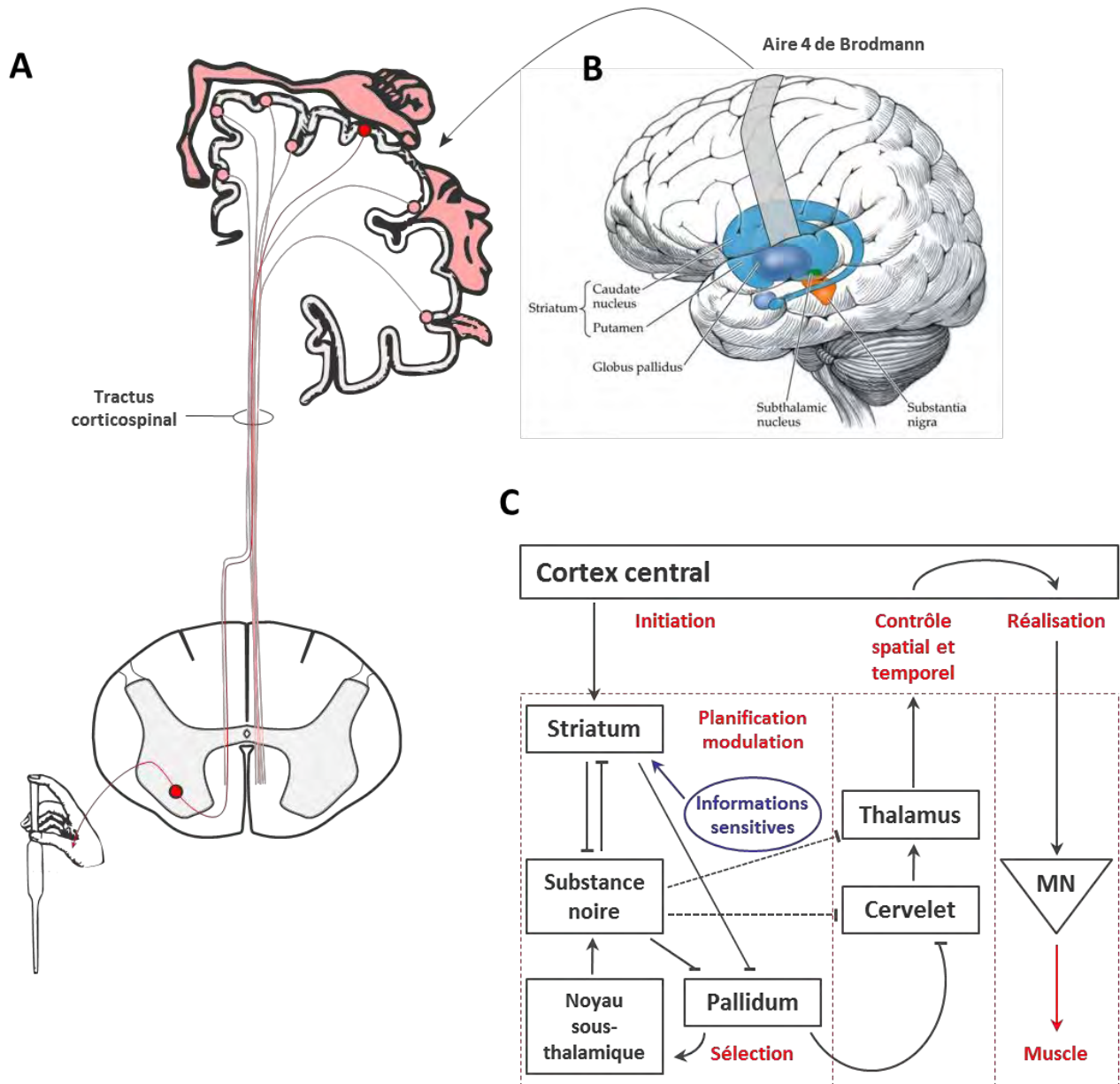


Fig.4) Commande du mouvement. (A) Schéma indiquant sur une coupe frontale de cerveau la somatotopie des neurones pyramidaux à l'aide d'un homonculus, et les projections du tractus corticospinal aux motoneurones de la corne ventrale de la moelle. (B) Vue générale du cerveau avec en surbrillance l'aire 4 de Brodmann au niveau de laquelle est réalisée la coupe frontale de (A), ainsi que les noyaux gris centraux. Tiré de Gilbert, S. F., 2010. *Developmental Biology*, 9th ed. Sinauer. (C) Schéma figurant la progression des influx nerveux dans les structures cérébrales pour le contrôle du mouvement. Les flèches à tête pleine représentent des de synapses excitatrices utilisant le glutamate, et les flèches à tête plate des synapses inhibitrices utilisant l'acide γ -aminobutyrique. MN : motoneurone.

Introduction

Schématiquement, l'initiation du mouvement est réalisée par le striatum, en particulier le putamen, qui reçoit des influx excitateurs des cortex moteur et sensitifs, les trie et envoient des signaux de régulation inhibiteurs au pallidum et à la substance noire. Cette fonction de tri confère au striatum un rôle de planification et de modulation du mouvement. Une sélection des informations motrices est ensuite effectuée par la substance noire, le noyau sous-thalamique et le pallidum, à l'aide de connexions essentiellement inhibitrices pour assurer des boucles de contrôle. A la suite de ce réseau, l'influx nerveux est traité par le cervelet et le thalamus pour affiner le contrôle spatial et temporel du mouvement. Dans le cervelet, en particulier dans sa partie néocérébelleuse, ce contrôle est réalisé unidirectionnellement, c'est-à-dire sans boucle rétroactive, grâce à l'importante arborisation dendritique des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux. De plus, le grand nombre d'épines dendritiques des cellules de Purkinje leur confère une forte plasticité, c'est pourquoi le cervelet joue un rôle important dans l'apprentissage, notamment de la coordination des mouvements. Après ce traitement, l'information motrice repart au cortex central, ce qui explique par ailleurs la forte arborisation dendritique des neurones pyramidaux, afin qu'il procède à la réalisation du mouvement en envoyant l'influx nerveux aux MN de la moelle.

I.1.2 La pathogénie des maladies du motoneurone

I.1.2.1 Classification des maladies du motoneurone

Les maladies du MN regroupent différentes atteintes des neurones de la voie motrice. En fonction du type de MN touché, MN médullaire, MN du tronc cérébral ou neurone pyramidal du cortex central, trois grands groupes de symptômes peuvent être distingués. Les atteintes des MN médullaires se traduisent généralement par une faiblesse et une atrophie musculaires progressives des membres, associées à une diminution de l'intensité des réflexes ostéo-tendineux. Les atteintes des MN du tronc cérébral ont principalement des conséquences au niveau du pharynx, avec des difficultés de déglutition, de respiration ou de phonation, associées à des paralysies faciales ou linguales. Une atteinte de type pyramidale se traduit généralement par une stimulation exagérée des MN médullaires, ce qui aboutit à une tétraplégie associée à une augmentation du tonus musculaire et de l'amplitude des réflexes ostéo-tendineux. Les principales maladies du MN sont résumées dans le **tableau 1**.

Le diagnostic est dans un premier temps clinique, il s'agit dans tous les cas d'un tableau « moteur pur ». Ce tableau peut être de type MN médullaires, ce qui oriente le diagnostic vers les maladies des cornes ventrales de la moelle avec, principalement, les amyotrophies spinales. Il peut également associer un syndrome de type pyramidal à un syndrome de dénervation musculaire, apparaissant chez l'adulte, ce qui oriente alors le diagnostic vers la sclérose latérale amyotrophique. Ces deux pathologies sont en effet les maladies du MN les plus fréquentes chez l'homme.

Les nombreuses études qui s'intéressent à l'amélioration du diagnostic des maladies du motoneurone se focalisent sur trois aspects : l'aspect moléculaire, l'aspect fonctionnel, et l'aspect imagerie. Les analyses moléculaires dressent le bilan des gènes impliqués dans les formes héréditaires de maladies du motoneurone ([Laing 2012](#)). Des analyses génétiques basées sur des tests de PCR ([Saugier-Weber 2001](#), [Markowitz 2012](#)), et des criblages dans les familles à risque ([Prior 2010](#)), permettent de compléter le diagnostic, associées ou non à l'identification de marqueurs moléculaires dans le sang ou le LCS ([Turner 2009](#), [Nardo 2011](#), [Tarasiuk 2012](#)). L'évaluation fonctionnelle de l'unité motrice est aussi classiquement réalisée pour les maladies du MN par électrophysiologie, c'est-à-dire par mesure du courant électrique transmis du nerf au muscle ([Winhammar 2005](#), [Suzuki 2008](#)). Différentes techniques d'électromyographie (EMG) permettent d'évaluer :

- (i) la dénervation musculaire, avec l'apparition sur les tracés électromyographiques de fibrillations évoquant la perte de la jonction neuromusculaire,
- (ii) l'intégrité des nerfs périphériques, c'est-à-dire la préservation du nombre d'axones et des gaines de myéline, par la mesure de la vitesse de conduction nerveuse ([Kane 2012](#)),
- (iii) la composante musculaire du potentiel d'action, qui intègre le fonctionnement du MN, de la fibre musculaire et de la jonction neuromusculaire ([Lewelt 2010](#)),
- (iv) ou par estimation directe du nombre d'unités motrices, dont la diminution peut être un des premiers signes de maladie du MN ([Shefner 2001](#), [Nandedkar 2010](#)).

Enfin, les techniques d'imagerie présentent une bonne sensibilité pour détecter les lésions des tissus musculaires et nerveux, notamment l'échographie ([Parra 2011](#), [Arts 2012](#), [Padua 2012](#)), l'imagerie par résonnance magnétique ([Wang 2011](#)) et la tomographie par émission de positons ([Yamakawa 2012](#)).

Les maladies du MN les plus communes et les mieux étudiées sont les amyotrophies spinales et la sclérose latérale amyotrophique. La description de leur pathogénie, c'est-à-dire des mécanismes entraînant leur déclenchement ou leur développement, permet non seulement de mieux les comprendre et d'affiner leur diagnostic, mais également de définir des stratégies thérapeutiques.

Localisation de l'atteinte			Pathologie	Origine génétique	Âge moyen d'apparition des symptômes (années)	Espérance de vie moyenne après l'apparition des premiers symptômes (années)
MN médullaire	MN bulbaire	neurone pyramidal				
X	X	X	ALS	90% sporadique, 10% familial impliquant de nombreux gènes dont SOD1, ALS2, dynactine, ANG, FUS/TLS, TDP-43, C9ORF72...	40 - 60	~5
	X		PBP	?	50 - 70	~5
X	X		SBMA	récepteur aux androgènes	20 - 50	>10
X			SMA de type I	SMN1	<0,5	<2
X			SMA de type II	SMN1	0,5 - 1,5	>25
X			SMA de type III	SMN1	1,5 - 18	non affectée
X			SMA de type IV	SMN1	>18	non affectée
X			PMA	?	20-30	progression lente
		X	PLS	SOD1, ANG, FUS/TLS, TDP-43 ?	>50	progression lente

Tab.1) Récapitulatif des principales maladies du motoneurone. MN : motoneurone, ALS : sclérose latérale amyotrophique, PBP : paralysie bulbaire progressive, SBMA : amyotrophie spinale et bulbaire, SMA : amyotrophie spinale, PMA : amyotrophie progressive, PLS : sclérose latérale progressive.

1.1.2.2 Pathogénie des amyotrophies spinales

Définitions

Les amyotrophies spinales sont des maladies du MN spinal qui provoquent une faiblesse et une atrophie musculaires progressives, et dans les cas les plus sévères, une insuffisance respiratoire. Les amyotrophies spinales (ou SMA pour *spinal muscular atrophy*) sont en grande majorité, environ 95% des cas, d'origine génétique, à transmission autosomale récessive, et liées au gène SMN (pour *survival of motor neurons*) ([Lefebvre 1995](#)). Il existe trois formes de SMA infantiles et une forme adulte qui sont définies en fonction de l'âge d'apparition des symptômes et de la sévérité de la maladie (**tab1**) (pour revue : [Markowitz](#)

[2012](#)). La SMA de type I (ou maladie de Werdnig-Hoffman) est la forme la plus sévère. Les symptômes apparaissent très tôt dans les six premiers mois après la naissance, avec une espérance de vie inférieure à deux ans sans assistance respiratoire ([Bach 2007](#)). La SMA de type II est une forme intermédiaire, les premiers symptômes apparaissant entre six et 18 mois. L'espérance de vie est plus importante que pour la SMA de type I, et les décès sont principalement dus à des infections respiratoires plus qu'à des insuffisances musculaires (près de 98% de survie à 5 ans, environ 70% à 25 ans, [Zerres 1997](#)). De plus, contrairement aux patients atteints de SMA de type I, les patients atteints de SMA de type II sont capables de tenir assis sans assistance. La SMA de type III (ou maladie de Kugelberg-Welander) est la forme juvénile la plus modérée et concerne des patients capables de marcher sans assistance. Les signes cliniques apparaissent après 18 mois, et l'espérance de vie est normale ([Zerres 1997](#)). Aux extrémités de ce spectre phénotypique, la SMA de type 0 est une forme très sévère, dont les symptômes apparaissent avant la naissance, avec une espérance de vie inférieure à six mois ([Dubowitz 1999](#)), et la SMA de type IV est une forme adulte très hétérogène et modérée avec des symptômes apparaissant tardivement au-delà de 18 ans ([Elsheikh 2009](#)).

Génétique des SMA

Les SMA représentent la deuxième cause génétique de mortalité infantile après la mucoviscidose. Elles ont une prévalence de 1/6000 à 1/10000 ([Swoboda 2010](#), [D'Amico 2011](#)) et une fréquence d'environ 1/50 pour les porteurs sains ([Ogino 2002](#)).

La région chromosomique associée à la SMA a été identifiée par clonage positionnel sur le bras long du chromosome 5, dans la région q13.2 ([Brzustowicz 1990](#), [Melki 1990](#)). La pathologie a ensuite été plus précisément reliée au gène SMN1 (*survival of motor neurons 1*), avec des délétions menant à la perte de l'exon 7 de SMN1 chez 213 patients SMA sur 229, soit dans 93% des cas ([Lefebvre 1995](#)). Le gène SMN1, d'une taille de 20 kb, contient neuf exons, mais le dernier n'est pas traduit ([Bürglen 1996](#)), et encode une protéine SMN de 32 kDa pour 294 acides aminés ([OMIM #600354](#)). La région chromosomique contenant le gène SMN1, ou locus SMA, contient des duplications inversées de ce gène dénommées SMN2, en nombre de copies variable selon les individus et situées en partie centromérique du locus, tandis que le gène SMN1 se situe en partie télomérique (**fig5**). SMN2 diffère de SMN1 par cinq paires de bases, dont une seule de ces variations se situe dans la partie codante : la

mutation C>T dans l'exon 7 ([Lefebvre 1995](#), [Bürglen 1996](#)). Cette mutation est silencieuse, c'est-à-dire qu'elle ne change pas l'acide aminé traduit. Par contre, elle modifie fortement un site accepteur d'épissage dont la fonction est d'inclure l'exon 7 dans l'ARN messenger, grâce au recrutement de facteurs d'épissage, comme SF2/ASF pour *splicing factor 2/alternative splicing factor* ([Cartegni 2006](#), [Wirth 2006](#)). Ainsi, lorsqu'il est exprimé, le gène SMN2 aboutit majoritairement (90%) à la production d'un ARN messenger (ARNm) incorrectement épissé et tronqué, sans l'exon 7 ([Lefebvre 1995](#)), ce qui aboutit à une protéine non fonctionnelle ([Lorson 1998](#)), et instable ([Burnett 2009](#)) (**fig5**). Le gène SMN2 est présent chez tous les patients atteints de SMA, tandis qu'il est absent chez 5% des individus non atteints, sans conséquence clinique ([Lefebvre 1995](#)), ce qui indique que les copies SMN2 ne sont pas indispensables à la survie des MN. En revanche, le nombre variable de copies SMN2 permet d'expliquer la grande variation de sévérité de la maladie SMA pour une même mutation de SMN1, puisque la quantité de protéines SMN fonctionnelles est inversement corrélée à la sévérité de la SMA ([Lefebvre 1997](#)). En effet, lorsque SMN1 est complètement absent ou inactif, les protéines SMN fonctionnelles proviennent uniquement des 10% d'épissage correct de SMN2, et la quantité de SMN dépend alors du nombre de copies SMN2 ([Taylor 1998](#), [Wirth 2006](#)). En général, les formes les plus sévères de SMA de type I sont associées à seulement une à deux copies de SMN2, tandis que les formes modérées de SMA de type III sont caractérisées par la présence d'au moins trois copies du gène ([Feldkötter 2002](#)).

Introduction

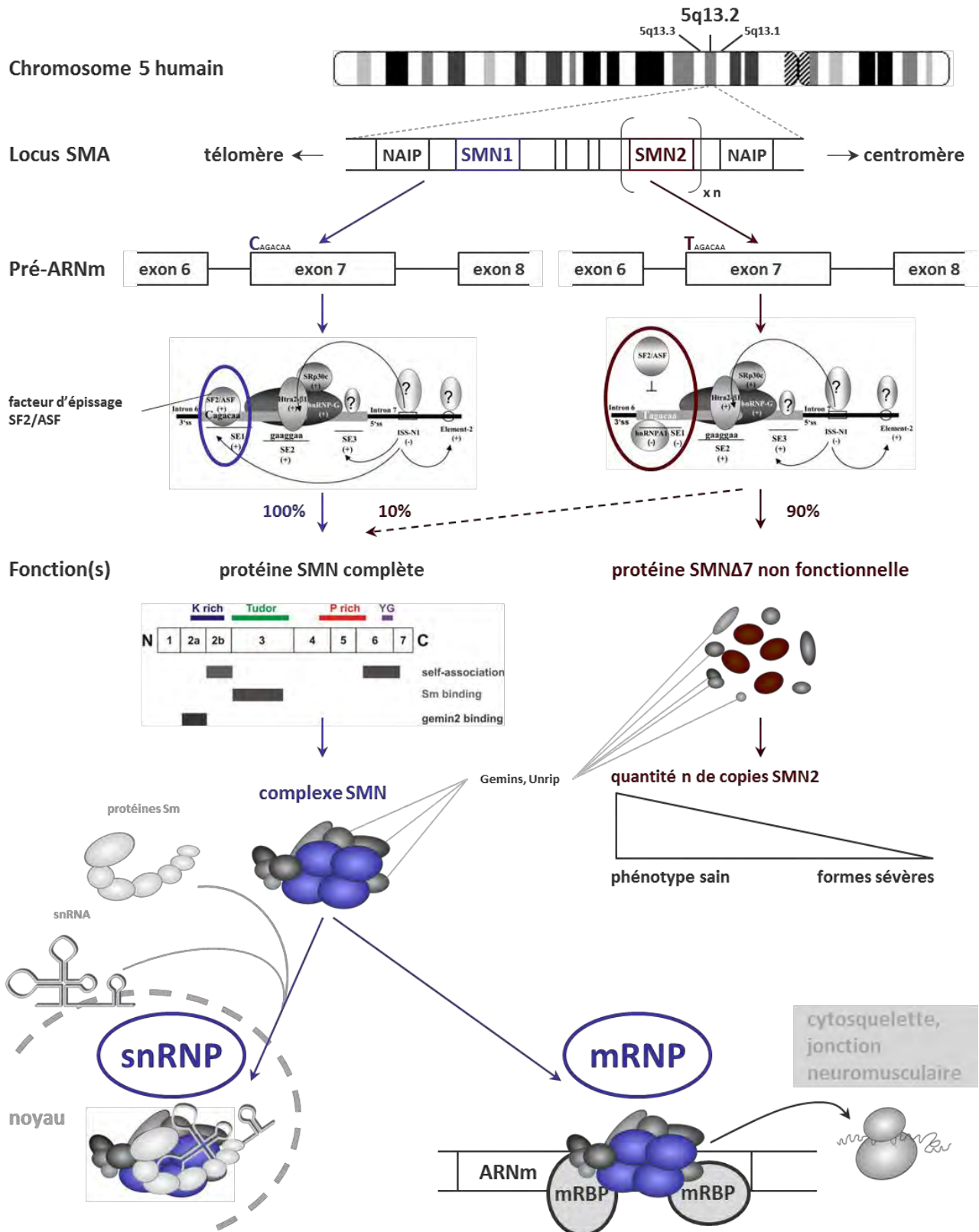


Fig.5) Génétique, expression et fonctions probables de SMN. *snRNP* : small nuclear ribonucleoproteins, *mRNP* : messenger ribonucleoprotein complexes, *mRBP* : mRNA binding proteins. Le chromosome provient du site du [NCBI](#), les mécanismes d'épissages sont issus de ([Wirth 2006](#)) et les domaines protéiques de SMN de ([Burghes 2009](#)).

Fonction de la protéine SMN

Grâce à la production chez la souris d'anticorps anti-SMN (2B1), la protéine SMN a été retrouvée par immunofluorescence au niveau cellulaire, de façon diffuse dans le cytoplasme et concentrée sous forme de granules dans le noyau ([Liu 1996](#)). Ces granules, dénommées *gems* pour *gemini of Cajal bodies*, ont été décrites comme étant fortement associées à un autre type de structure nucléaire : les corps de Cajal, impliqués dans l'assemblage de composés d'ARN et de protéines nécessaires au métabolisme de l'ARN : les RNPs (pour *ribonucleoproteins*) (pour revue : [Mao 2011](#)). Ceci suggère une relation entre la protéine SMN et le métabolisme de l'ARN, SMN interagissant directement avec les RNPs et jouerait un rôle dans les mécanismes post-transcriptionnels dans le noyau ([Carvalho 1999](#), et pour revue : [Cioce 2005](#)). Ce rôle a été affiné par la suite avec la description des nombreux partenaires d'interaction de SMN, notamment des protéines se liant aux ARNm, les mRBPs (pour *mRNA binding proteins*) (pour revue : [Fallini 2012a](#)). L'analyse de la séquence de la protéine SMN (numéro d'accès UniProtKB/Swiss-Prot pour la protéine humaine : [Q16637.1](#)) a permis de préciser la fonction de SMN en révélant des domaines de séquences conservées, probablement essentielles à la fonction de la protéine.

- Un premier domaine, YG, riche en résidus tyrosine (Y) et glycine (G), a été identifié au niveau de la partie C-terminale concernée par la troncation de l'exon 7 ([fig5](#)), et serait impliqué dans la reconnaissance et la liaison des domaines RGG au niveau des RNPs ([Talbot 1997](#)). Ces domaines RGG sont des répétitions de motif arginine-glycine-glycine impliquées dans les interactions ARN-protéine ([Shi 2009](#)).
- Un autre domaine Tudor, un motif structural particulier en feuillet β antiparallèle ([Ponting 1997](#)), permet l'association de SMN avec les protéines Sm, ([Bühler 1999](#)) ([fig5](#)). Ces petites protéines sont retrouvées dans tous les complexes d'épissage, composés essentiellement de snRNPs, pour *small nuclear ribonucleoproteins* ([Raker 1999](#)). La protéine SMN jouerait ainsi un rôle dans l'assemblage des snRNPs ([Fischer 1997](#), [Pellizzoni 1998](#), [Bühler 1999](#)).
- Un domaine riche en proline (*P-rich*), situé sur les exons 4, 5 et 6 de SMN, est important pour l'interaction entre SMN et les profilines, qui sont des petites protéines contrôlant la dynamique de l'actine ([Giesemann 1999](#)).

Rôle de la protéine SMN dans l'assemblage des snRNPs

Le complexe SMN, formé de l'association de la protéine SMN avec Unrip, pour *unr-interacting protein*, interagissant avec les ARNm ([Grimmler 2005](#)), les protéines Sm interagissant avec les snRNP, et les protéines Gemin (Gemins 2-8), impliquées notamment dans l'association des protéines Sm entre elles ([Shpargel 2005](#)), intervient dans l'assemblage et le recyclage de complexes d'épissage (pour revues : [Burghes 2009](#), [Workman 2012](#)) (**fig5**). Il existe neuf types de snRNP, chacun contenant un ARN nucléaire riche en uridine. En périphérie du noyau, les protéines Sm forment un anneau autour de ce site riche en U pour être ensuite liées au complexe SMN. Le snRNP ainsi formé est transporté pour maturation au noyau au niveau des corps de Cajal. Cette fonction d'assemblage de snRNP est importante dans tous les tissus, et l'absence complète du gène *smn* provoque une mortalité cellulaire importante chez l'embryon de souris qui ne peut pas atteindre le stade blastocyste ([Schrank 1997](#)). En revanche, aucun consensus n'est pour le moment établi pour relier la fonction ubiquitaire de SMN aux défauts provoqués par un faible niveau de SMN, c'est-à-dire une diminution de la fonction et de la survie des MN spinaux. La mise en évidence de la diminution de l'expression des constituants du complexe SMN et de l'activité d'assemblage des snRNPs dans des modèles murins sévères de SMA ([Gabanella 2007](#)), en relation avec des changements tissus-spécifiques dans la stoechiométrie des snRNP et dans l'épissage des ARNm ([Zhang 2008](#)), suggère qu'une diminution de SMN provoque des défauts affectant préférentiellement des ARNm essentiels à l'activité des MN ([Gabanella 2007](#)). Cette suggestion a été renforcée par une étude indiquant qu'une dégénérescence importante de l'embryon de xénope provoquée par un ARN interférence anti-*smn*, pouvait être réduite par l'apport de snRNPs purifiées ([Winkler 2005](#)). Toutefois, la nature et la localisation des ARNm affectés sont encore à déterminer. De plus, l'observation d'une activité snRNP identique entre des modèles murins de SMA sévère et modérée ([Gabanella 2007](#)) suggère que la différence de survie de ces souris serait causée par une autre fonction de SMN.

Rôle de la protéine SMN dans la croissance et le transport axonal

Effectivement, la protéine SMN jouerait également un rôle important au sein des MN dans les mécanismes de croissance et de transport au niveau de l'axone, ce qui est cohérent avec les dernières observations décrivant la SMA comme étant initialement une axonopathie (pour revue : [Fallini 2012a](#)).

Des études ont en effet montré des insuffisances de connexions sensori-motrices chez la souris ([Mentis 2011](#)) et la drosophile ([Imlach 2012](#)), avec un nombre et une taille de synapses excitatrices diminués chez les animaux malades, indiquant un défaut de maturation des circuits nerveux (pour revue : [Roselli 2012](#)). Ces défauts synaptiques concernent aussi les jonctions neuromusculaires qui sont altérées, morphologiquement parce qu'elles présentent une arborisation moins importante, liée à une agrégation de neurofilaments phosphorylés (pour revue : [Torres-Benito 2012](#)), et fonctionnellement à cause d'une mauvaise distribution pré-synaptique des vésicules et d'une mauvaise répartition post-synaptique des récepteurs à l'ACh ([Cifuentes-Diaz 2002](#), [Kariya 2008](#), [Kong 2009](#), [Bowerman 2012](#)). D'autre part, des MN isolés en culture primaire, provenant d'un modèle murin sévère de SMA, présentent une survie normale mais un axone significativement plus court et une arborisation terminale moins développée ([Rossoll 2003](#)). L'ensemble de ces travaux suggère que SMN jouerait un rôle dans la maturation et la maintenance des structures axonales et synaptiques mises en place pendant le développement.

Bien que la fonction clé de SMN dans la biogénèse des snRNPs ait été suggérée au niveau axonal par une étude chez le xénope ([Winkler 2005](#)), le rôle de maintenance axonale joué par SMN est probablement indépendant des snRNPs ([Carrel 2006](#)). De plus, si SMN est localisée au niveau de l'axone et y est activement transporté ([Zhang 2003](#)), les composants principaux des snRNPs n'y co-localisent pas, confirmant un autre rôle de SMN dans l'axone ([Todd 2010](#)).

Outre les composants de snRNP, SMN a été montrée comme interagissant avec de nombreuses autres molécules, notamment des protéines associées à la dynamique du cytosquelette et des protéines régulant le transport, la stabilité et la traduction locale des ARNm dans les MN ([Rossoll 2009](#)). L'intégrité du cytosquelette est essentielle pour le transport axonal de composants structurels ou fonctionnels, ainsi que pour la fonctionnalité de la jonction neuromusculaire et le mouvement des vésicules de neurotransmetteurs. La stathmine, responsable de la déstabilisation des microtubules, a été décrite comme étant surexprimée dans des motoneurones déficients en protéine SMN, provoquant une connexion nerveuse insuffisante chez un modèle murin sévère de SMA ([Wen 2010](#)). Davantage décrite, la relation entre SMN et des protéines associées à la régulation de l'actine, comme les profilines ([Giesemann 1999](#)) ou la plastine 3 ([Dimitriadi 2010](#), [Hao 2012](#)), peut être à l'origine, en cas de faibles niveaux de protéine SMN, d'une mauvaise maturation fonctionnelle et structurelle des jonctions neuromusculaires ([Hao 2012](#)).

Rôle de la protéine SMN dans la maturation des ARNm au sein des axones

Une autre hypothèse qui permettrait d'expliquer la dégénérescence spécifique des MN lors d'une diminution de l'expression ubiquitaire de SMN est que la protéine SMN aurait un rôle dans le métabolisme des ARNm au sein même de l'axone. En effet, de nombreuses mRBPs (*mRNA binding proteins*) ont été montrées comme interagissant avec SMN dans les neurites pour former ainsi des mRNPs (*messenger ribonucleoprotein complexes*) (pour revue : [Fallini 2012a](#)) (**fig5**). Parmi ces mRBPs partenaires de SMN, la mRBP neurone-spécifique HuD ([Saito 2004](#), [Akten 2011](#)) et FMRP (pour *fragile X mental retardation protein*) ([Lai 2006](#)) ont été retrouvées associées avec le facteur d'export nucléaire d'ARN NXF2, qui est par ailleurs connu pour interagir avec la kinésine KIF17 ([Takano 2007](#)), ce qui faciliterait l'export nucléaire du complexe SMN et des ARNm ainsi que leur transport axonal.

La localisation d'ARNm au niveau de l'axone ou de la jonction neuromusculaire est essentielle pour la différenciation, la croissance et la plasticité de ces domaines subcellulaires du MN, grâce à des mécanismes de traduction locale permettant de modifier rapidement les niveaux de protéine en réponse à des signaux extérieurs ([Jung 2012](#)). Or, la protéine SMN a été localisée dans des mRNPs au sein de polyribosomes, et a été montrée comme affectant *in vitro* la traduction d'un gène rapporteur ([Sanchez 2012](#)). Ainsi, l'implication de SMN dans des mécanismes de régulation traductionnelle au niveau de domaines subcellulaires du MN serait susceptible, dans le cas d'une faible quantité de protéines SMN, de mener à une expression aberrante de facteurs nécessaires à la maintenance de l'axone ou à la fonction de la jonction neuromusculaire. En particulier, si aucune interaction directe entre SMN et l'ARNm de la β -actine n'a été décrite ([Rossoll 2003](#)), une diminution du niveau de SMN mène indirectement à une réduction de la quantité de β -actine *via* une baisse d'expression de la laminine ([Rathod 2012](#)), une protéine de la lame basale impliquée dans l'élongation de l'axone grâce à son interaction entre le cytosquelette de l'axone et la matrice extracellulaire, ou de la plastine 3 ([Hao 2012](#)), une protéine impliquée dans la polymérisation de l'actine.

En conclusion, SMN présente au moins deux rôles distincts au sein des MN : (i) l'assemblage de snRNPs, fonction ubiquitaire, dont l'abolition complète a des effets critiques sur l'embryon, et (ii) l'assemblage de mRNPs permettant, en particulier, l'expression et la

régulation de constituants du cytosquelette, essentiels pour la croissance et la fonction des MN.

1.1.2.3 Pathogénie de la sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique se définit cliniquement par des atteintes des MN centraux et des MN périphériques chez des sujets adultes, généralement entre 40 et 60 ans (**tab1**). Egalement appelée maladie de Charcot, ou encore maladie de Lou Gehrig aux Etats-Unis, la sclérose latérale amyotrophique (ALS pour *amyotrophic lateral sclerosis*) a une prévalence d'environ 6 pour 100 000 et représente ainsi la maladie du MN la plus fréquente chez l'adulte ([Cooper-Knock 2012](#)). Les premiers symptômes de l'ALS varient entre les individus, divisés entre un groupe de symptômes spinaux, généralement des faiblesses musculaires apparaissant en partie distale des membres, et un groupe bulbaire et central, incluant des troubles de la déglutition et de la phonation ([Kiernan 2011](#)). La progression de l'ALS est en général rapide avec une issue fatale consécutive à l'atteinte des muscles respiratoires dans les 5 ans suivant l'apparition des premiers symptômes ([Talbot 2009](#)). La plupart des cas d'ALS (90%) sont dits sporadiques car ils ne présentent aucun lien avec une transmission génétique, par opposition aux 10% de cas restants qui sont héréditaires. La forte similarité clinique et pathologique entre ces deux formes porte à croire qu'il pourrait exister un mécanisme pathogénique commun ([Brujin 2004](#), [Aguilar 2007](#)).

Causes

Concernant les cas sporadiques, l'observation d'incidences plus fortes au sein de certaines populations comme celles de la Nouvelle-Guinée, de la péninsule de Kii (Honshu, Japon) ou encore du peuple Chamorro de l'île de Guam ([Kisby 2011](#)), de cas groupés comme pour une quarantaine de footballeurs italiens ([Chiò 2005](#)), ou de cas conjugaux ([Dewitt 2012](#)), suggère l'implication de facteurs environnementaux dans le déclenchement de la maladie. Il a été évoqué un rôle des toxines, comme celles issues de cyanobactéries dans les graines de cycadées expliquant probablement l'incidence élevée pour les peuples du Pacifique ouest ([Banack 2010](#), [Kisby 2011](#)) et des métaux lourds ou des pesticides ([Vinceti 2012](#)). Certaines professions associées à une activité physique intense ont également montré un plus grand nombre de cas d'ALS, comme les militaires ou les athlètes ([Haley 2003](#), [Sutedja 2009](#)).

Néanmoins, aucune de ces études ne décrit le mécanisme pathogénique permettant de relier ces facteurs environnementaux avec la perte des MN.

Concernant les cas familiaux, de nombreuses mutations ont été découvertes. La plupart d'entre elles se transmettent de façon autosomique et dominante, c'est-à-dire qu'elles apportent une nouvelle fonction responsable de la pathologie. L'identification de ces mutations a permis des études mécanistiques, notamment par la génération de modèles animaux induits.

Les premières mutations identifiées et les plus étudiées concernent un gène codant une protéine impliquée dans la résistance aux stress oxydants : SOD1 (pour *Cu/Zn superoxide dismutase 1*) ([Rosen 1993](#)). Elles sont responsables de 15 à 20% des cas familiaux d'ALS. La création de lignées murines exprimant une SOD1 mutante ([Gurney 1994](#)) a permis la description d'un gain de fonction toxique entraînant l'apoptose des MN ([Bruijn 1998](#)).

Plusieurs mutations du gène *als2*, codant pour l'alsine, ont été retrouvées pour des formes juvéniles rares d'ALS ([Chandran 2007](#)). Comme SOD1, l'alsine neutralise la production d'espèces réactives d'oxygène et régulerait des signaux pro-inflammatoires redox-dépendants ([Li 2011](#)).

D'autres mutations ont été identifiées, touchant la dynactine, une protéine activatrice de la dynéine, elle-même impliquée dans les complexes moteurs du transport axonal ([Puls 2003](#)). Ces observations ont également été réalisées sur des souris *Loa* et *Cra* qui présentent, associée à la sur-expression d'une dynactine mutée, une perte de MN par altération du transport axonal rétrograde ([LaMonte 2002](#), [Hafezparast 2003](#)). Ce défaut de transport axonal lié à la dynactine se retrouve également dans d'autres maladies du MN, comme la SMA ou l'amyotrophie bulbaire et spinale (pour revue : [Ikenaka 2012](#)).

Des mutations touchant le gène codant l'angiogénine (*ang*), impliquée dans la néo-vascularisation, ont été identifiées dans des cas familiaux et sporadiques d'ALS ([Greenway 2006](#)). Ceci est cohérent avec une autre étude, rapportant que la modification chez la souris de l'élément de réponse à l'hypoxie d'un autre facteur de néo-vascularisation, le VEGF (pour *vascular endothelial growth factor*) provoque des symptômes d'ALS ([Oosthuyse 2001](#)). Ces observations suggèrent que dans ces cas d'ALS, la perte des MN pourrait être liée à l'apparition d'une hypoxie, et que dans ce contexte, les facteurs angiogéniques pourraient avoir une fonction neuroprotectrice, comme cela a été montré pour le VEGF ([Azzouz 2004](#), [Zheng 2004](#), [Storkebaum 2004a](#), [Zheng 2007](#)).

Une autre protéine, TDP-43 (pour *TAR (HIV trans-activating DNA response element)-DNA binding protein 43 kDa*), a été retrouvée dans des agrégats intracytoplasmiques de cellules lésées dans des cas d'ALS et de dégénérescence lobaire fronto-temporale (FTLD), une pathologie neurodégénérative caractérisée par l'atrophie de plusieurs lobes cérébraux ([Neumann 2006](#)). Ces agrégats sont retrouvés dans 95% des cas d'ALS et 50% de FTLD, indépendamment des mutations de TDP-43 qui ne sont responsables que de 4 à 5% des cas d'ALS ([Turner 2008](#), [Lagier-Tourenne 2010a](#)). TDP-43 est une protéine associée à de nombreux partenaires protéiques et ARN au sein de larges complexes, et joue probablement un rôle dans le métabolisme de l'ARN ([Lagier-Tourenne 2010a](#)). L'expression de TDP-43 est hautement régulée, y compris par elle-même, pour maintenir son niveau constant au sein des complexes protéines/ARN ([Ayala 2011](#)). La dérégulation de cette expression par des mutations TDP-43 ou d'autres gènes (incluant l'ubiquiline 2, *ang*, C9ORF72) provoque l'agrégation cytoplasmique de TDP-43, ce qui diminue sa concentration dans les complexes protéines/ARN, induit sa surexpression et augmente ainsi en retour son agrégation cytoplasmique (pour revue : [Xu 2012b](#), [Dewey 2012](#)).

Des mutations touchant le gène FUS/TLS (pour *fused in sarcoma/translocated in liposarcoma*) ont également été retrouvées dans 5% des cas familiaux d'ALS et dans des cas de FTLD ([Vance 2009](#)). Comme TDP-43, FUS/TLS est une protéine interagissant avec l'ARN et est retrouvée dans le même type de complexes protéines/ARN. FUS/TLS est majoritairement localisée dans le noyau des cellules saines alors qu'elle s'accumule dans le cytoplasme des cellules atteintes, associée à TDP-43. Ceci est cohérent avec le fait qu'une grande partie des mutations FUS/TLS concerne la séquence responsable de la localisation nucléaire de la protéine ([Vance 2009](#)). Cette localisation cytoplasmique est probablement liée à l'apparition d'une fonction toxique, parallèlement à une augmentation de l'affinité des mutants FUS/TLS pour les ARNm cytoplasmiques (pour revue : [Lanson 2012](#)).

Plus récemment, la découverte de répétitions anormalement nombreuses d'un motif du gène C9ORF72 a été reliée à 35% des cas familiaux d'ALS et à 26% des cas de FTLD. La découverte tardive de ces défauts génétiques vient du fait que les répétitions du motif « GGGGCC » ne peuvent pas être correctement amplifiées par PCR conventionnelle (décrochage de l'ADN polymérase), et ont nécessité pour les mettre en évidence une technique de PCR spécifique, robuste aux répétitions (*repeat-primed polymerase chain reaction*) ([DeJesus-Hernandez 2011](#)), ou encore un séquençage à haut débit de nouvelle génération ([Renton 2011](#)). Ces répétitions sont localisées entre deux exons du gène C9ORF72 qui code pour une protéine non caractérisée de fonction inconnue. Ces répétitions induisent

l'accumulation d'ARN C9ORF72 dans des foyers nucléaires et sont probablement associées, en regard d'autres pathologies de répétitions de régions non codantes comme la dystrophie myotonique de type 1 et les ataxies cérébelleuses, à un gain de fonction toxique de l'ARN (pour revue : [van Blitterswijk 2012a](#)).

Enfin, quelques rares cas familiaux d'ALS ont été reliés à des gènes codant pour des protéines impliquées dans le protéasome et notamment dans l'ubiquitinylation, comme l'ubiquiline 2, OPTN ou encore SQSTM1/p62, dont la mutation entraîne des défauts de dégradation protéique ([Deng 2011](#), [Fecto 2012](#)). Si le mécanisme neurodégénératif associé à ces défauts n'est pas encore clairement établi, il est intéressant de noter que les protéines FUS/TLS et TDP-43 deviennent insolubles par ubiquitinylation ou phosphorylation ([Zhou 2010](#), [Huang 2011](#), [Lee 2011](#)). D'autre part, il a été montré qu'une surexpression de SQSTM1/p62 était capable de réduire l'agrégation de TDP-43 ([Wang 2010a](#), [Brady 2010](#)), suggérant un rôle central du protéasome et de l'ubiquitinylation dans la pathogénie de l'ALS.

Mécanismes

Parallèlement à l'identification de ces mutations, des mécanismes moléculaires ont été proposés pour tenter d'expliquer la pathogénie de l'ALS. Ceux-ci sont rassemblés dans trois grands groupes de mécanismes ([fig6](#)).

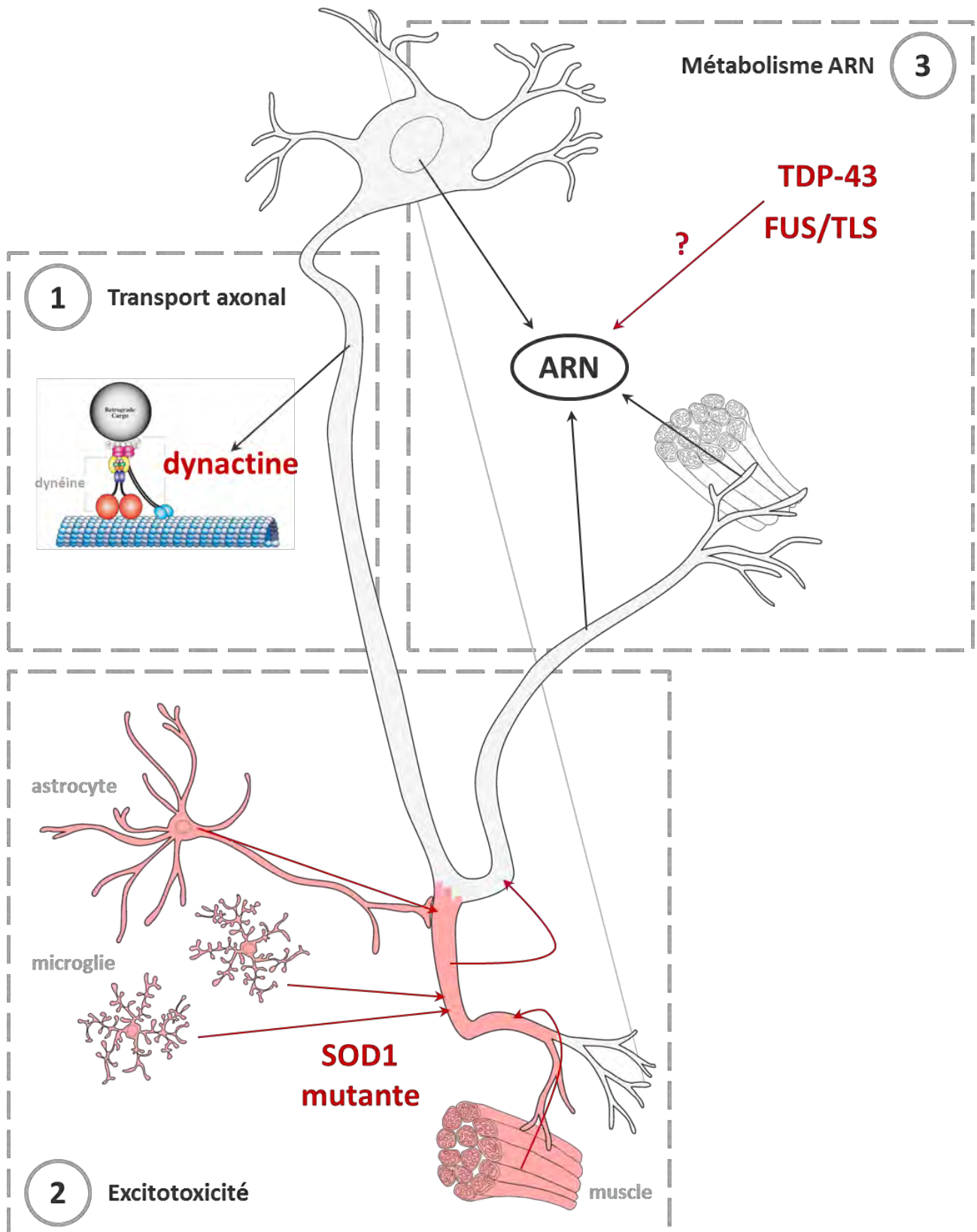


Fig.6) Illustration de trois types de mécanismes pathogéniques de l'ALS. Le schéma dynéine/dynactine est adapté de ([Duncan 2006](#)).

(1) Les mutations touchant la dynactine affectent la fonctionnalité de la dynéine et altèrent le transport axonal, fonction essentielle aux MN. Ces formes d'ALS liées à la dynactine/dynéine sont ainsi décrites comme des pathologies « pures » du MN ([Hafezparast 2003](#), [Aguilar 2007](#)).

(2) Au contraire, les formes d'ALS liées à SOD1 ont été décrites comme impliquant plusieurs types cellulaires. En effet, l'expression de la protéine SOD1 mutante n'aboutit pas à l'apparition de symptômes d'ALS si elle est restreinte aux MN ([Pramatarova 2001](#)). En revanche, l'expression de la protéine SOD1 mutante seulement dans le muscle squelettique apparaît suffisante pour déclencher la pathologie ([Wong 2010](#)). L'implication des astrocytes, des cellules de Schwann et des cellules gliales a également été mise en évidence dans le processus pathogénique (pour revues [Aguilar 2007](#), [Redler 2012](#)). La dégénérescence du MN serait ainsi due à un ensemble de signaux, incluant des effets oxydants, excitotoxiques, ou encore inflammatoires, provenant du MN lui-même mais également des autres cellules du tissu nerveux et musculaire, conférant un aspect systémique à ces formes d'ALS.

(3) Enfin, un troisième type de mécanismes regroupe des formes d'ALS pour lesquelles des défauts ont été identifiés en rapport avec le métabolisme de l'ARN. Ceci concerne essentiellement les formes liées à TDP-43 et à FUS/TLS ([Lagier-Tourenne 2010a](#), [Lagier-Tourenne 2010b](#), [Lanson 2012](#)). Ces formes présentent des atteintes précoces de la jonction neuromusculaire ([Dupuis 2009](#)), probablement dues à la diminution de l'interaction de TDP-43 et de FUS/TLS avec des séquences non-codantes d'ARN impliquées dans la fonction synaptique ([Lagier-Tourenne 2012](#)), ainsi que dans la croissance axonale ([Fallini 2012b](#)). Ces points ont permis des rapprochements entre les pathogénies de l'ALS et de la SMA ([Murray 2010](#)), incluant des interactions directes entre les différentes molécules impliquées, comme TDP-43 et SMN ([Turner 2008](#)) ou encore FUS/TLS et SMN ([Yamazaki 2012](#)). Ce rapprochement est renforcé par la description dans la SMA et l'ALS d'accumulation de SMN ou de TDP-43 dans des granules cytoplasmiques de stress, contenant des mRNA assemblés ou inhibés en réponse à un stress ([Kedersha 2009](#), [Dewey 2012](#)).

L'ALS apparaît ainsi comme une famille de pathologies hétérogènes. En effet, bien qu'elles présentent toutes une atteinte du MN, la cause de la neurodégénérescence varie selon les formes de la maladie, d'une atteinte spécifique du MN au niveau du transport axonal pour les formes liées à la dynactine/dynéine, à une perte des MN liée à une toxicité dans l'ensemble du tissu nerveux voire dans le tissu musculaire pour les formes liées à SOD1. Enfin des points communs existent entre les formes d'ALS liées à TDP-43 ou à FUS/TLS, et

la SMA, ce qui suggère qu'un ou plusieurs mécanismes pathogéniques affectant le métabolisme de l'ARN pourraient être responsables de la perte des MN ([Tsuiji 2013](#), [Gerbino 2013](#)).

1.1.2.4 Autres maladies du motoneurone

Amyotrophie spinale et bulbaire

L'amyotrophie spinale et bulbaire (SBMA), également appelée maladie de Kennedy, est une forme particulière de SMA touchant les MN de la moelle et du tronc cérébral (**tab1**). La SBMA est liée au gène codant le récepteur aux androgènes, porté par le chromosome X. La SBMA ne touche ainsi que les sujets masculins, sauf quelques rares cas d'inactivation asymétrique du chromosome X, avec une prévalence d'environ 3 personnes sur 100 000 ([Guidetti 2001](#)). Les symptômes, incluant une faiblesse et une atrophie des muscles des membres et de la face, sont modérés et se traduisent essentiellement par des crampes et des tremblements ([Finsterer 2009](#)). Ils apparaissent entre 20 et 40 ans et présentent une progression lente : l'âge moyen auquel les patients ont besoin d'un fauteuil est de 65 ans, et la survie 10 ans après l'apparition des symptômes a été évaluée à 82% ([Chahin 2008](#)). Concernant la pathogénie, l'origine de la SBMA est une augmentation du nombre de répétitions du trinuécléotide CAG, codant pour l'acide aminé glutamine et donc appelées répétitions poly-Q, au niveau de l'exon 1 du gène codant le récepteur aux androgènes ([La Spada 1991](#), [Suzuki 2008](#)). Le récepteur aux androgènes est un facteur de transcription responsable des réponses cellulaires à l'androgène, notamment pour la prolifération cellulaire. L'augmentation des poly-Q induit de mauvais repliements de ce récepteur et son accumulation intracytoplasmique, qui est particulièrement toxique pour les neurones ([Palazzolo 2008](#)). Ceci explique la susceptibilité des patients SBMA au syndrome d'insensibilité aux androgènes et au cancer de la prostate. Bien que le rôle physiologique dans les MN du récepteur aux androgènes ne soit pas complètement connu ([Cary 2008](#)), son accumulation intracytoplasmique a été associée *in vitro* à des niveaux réduits de VEGF dans des MN ([Sopher 2004](#)). À l'inverse, la diminution de l'activité du VEGF, par blocage de ses récepteurs ou par *knockdown*, réduit de façon dose-dépendante la prolifération cellulaire induite par le récepteur aux androgènes dans des cellules endothéliales ([Cai 2011](#)). Ceci rapproche la SBMA des formes d'ALS liées au VEGF ou à l'angiogénine, pour lesquelles des facteurs angiogéniques peuvent avoir une fonction neuroprotectrice.

Amyotrophie progressive

L'amyotrophie progressive (PMA pour *progressive muscular atrophy*), également appelée maladie d'Aran-Duchenne, est une maladie du MN spinal (**tab1**). La PMA est diagnostiquée par exclusion, généralement après avoir écarté la SMA et les polyneuropathies motrices. La PMA a été décrite par le neurologue François Aran comme affectant seulement certains muscles de façon irrégulière, et non un membre entier ([Visser 2008](#)). Les symptômes de PMA apparaissent entre 20 et 30 ans, avec une progression très lente et parfois l'apparition d'un syndrome pyramidal, compliquant le diagnostic ([Rowland 2010](#)). L'origine de la PMA est peu décrite, essentiellement sporadique et parfois liée à des mutations retrouvées dans l'ALS comme SOD1, *ang*, TDP-43 ou FUS/TLS ([van Blitterswijk 2012c](#)). Pour ces différentes raisons, la PMA est considérée par certains comme faisant partie de la famille des ALS, plus qu'une pathologie à part entière ([Visser 2008](#), [Kim 2009](#)).

Paralysie bulbaire progressive

La paralysie bulbaire progressive (PBP) affecte spécifiquement les MN de la région bulbaire (**tab1**). Les symptômes associés sont liés à l'atteinte des noyaux des nerfs crâniens IX, X, XI et XII, notamment des troubles de phonation et déglutition. Ces symptômes apparaissent après 50 ans et, comme la PMA, la PBP évolue fréquemment et rapidement en ALS avec l'apparition en 1 an de troubles des MN centraux ou des MN spinaux. La survie moyenne est donc la même que pour l'ALS : environ 5 ans après l'apparition des symptômes ([Karam 2010](#)). La PBP est ainsi considérée par certains comme une maladie du MN ayant une présentation clinique restreinte, et par d'autres comme un sous-groupe d'ALS ([Karam 2010](#)).

Sclérose latérale progressive

La sclérose latérale progressive (PLS pour *primary lateral sclerosis*) est une atteinte progressive des MN centraux (**tab1**). Les principaux signes cliniques sont la spasticité et la faiblesse des muscles des jambes et de la région bulbaire ([Singer 2007](#)). Ces symptômes apparaissent autour de 50 ans et progressent lentement, parfois vers une ALS. Certaines formes de PLS ont été associées à des mutations du gène codant pour l'alsine, mutations également associées à l'ALS, suggérant un mécanisme commun ([Chandran 2007](#)). Là encore, la description de la PLS comme une pathologie distincte ou comme un syndrome ou un sous-groupe d'ALS est discutée ([Rowland 1999](#), [Strong 2005](#)).

Les maladies du motoneurone forment ainsi un groupe très hétérogène de nombreuses pathologies ayant pour point commun, l'atteinte du MN. La progression de ces maladies est plus ou moins rapide et le pronostic est souvent variable. De même, les études de pathogénie se heurtent à ces problèmes de classification, soit parce que les dénominations cliniques ne reflètent pas toujours les mécanismes moléculaires impliqués, soit parce qu'un défaut moléculaire donné peut avoir des répercussions cliniques distinctes. De plus, l'association de plusieurs mutations distinctes a été montrée beaucoup plus fréquente que ce qu'indiqueraient les probabilités, suggérant l'existence de mécanismes oligogéniques pour certaines pathologies ([van Blitterswijk 2012b](#), [van Blitterswijk 2012c](#)). Enfin, les mécanismes moléculaires sont généralement étudiés à partir de modèles animaux, induits ou spontanés. Leur compréhension ainsi que l'identification de cibles thérapeutiques sont donc conditionnées par la disponibilité de ces modèles.

I.1.3 Les modèles animaux de maladies du motoneurone

Pour étudier une pathologie ou pour développer des stratégies thérapeutiques, les différentes méthodes d'analyse requièrent une quantité suffisante de matériel biologique, qui provient en général de prélèvements de patients ou de modèles animaux présentant des symptômes similaires à ceux identifiés chez l'homme.

Dans le cadre des maladies du MN, les prélèvements de patients, généralement des prises de sang, des ponctions de LCS ou des biopsies de peau ou de muscle, peuvent permettre la recherche de marqueurs circulants. L'analyse des MN humains se fait indirectement *in vitro*, grâce à la création de lignées de cellules souches embryonnaires humaines ([Thomson 1998](#)) et à l'identification de facteurs contrôlant la différenciation de ces cellules en MN ([Lee 2006](#)). Plus récemment, l'identification de facteurs permettant la reprogrammation de cellules différenciées en cellules pluripotentes ([Takahashi 2007](#)) a favorisé l'obtention de MN humains à partir de fibroblastes prélevés dans le derme de malades. Ainsi, des modèles cellulaires de SMA ([Sareen 2012](#)) et d'ALS ([Egawa 2012](#)) peuvent permettre d'identifier les mécanismes à l'origine de la perte des MN chez les patients, comme par exemple l'activation de caspases menant à l'apoptose dans les MN de malades SMA ([Sareen 2012](#)). D'autre part, il est possible d'induire des modèles cellulaires, comme cela a été réalisé dans le cadre de la PLS, par inactivation à l'aide d'ARN interférence du gène *erlin2*, dont des mutations ont été retrouvées chez certains patients, au sein d'une lignée immortalisée de MN murins NSC34 ([Al-Saif 2012](#)). Ces modèles cellulaires sont particulièrement pertinents pour étudier des mécanismes cellulaires impliqués dans la pathogénèse des maladies du MN, ou pour tester le potentiel thérapeutique de diverses molécules par criblage. Ils peuvent également permettre le développement de stratégies de thérapie cellulaire avec des transplantations de cellules de patients reprogrammées et corrigées ([Corti 2012](#)). Toutefois, l'impact de ces modèles est essentiellement limité par l'environnement des cellules, relativement éloigné des conditions tissulaires rencontrées chez les patients.

Les modèles animaux reproduisent totalement ou partiellement une pathologie ou un symptôme retrouvés chez l'homme. Ils représentent des outils indispensables permettant d'identifier un gène associé à une maladie et d'en décrire la génétique, de comprendre la pathologie en identifiant les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la pathogénèse, et enfin de tester l'efficacité d'approches thérapeutiques. Ils peuvent être distingués en fonction de l'origine de la pathologie étudiée, qui peut être induite ou spontanée.

Pour induire une pathologie ou un symptôme d'origine génétique, le génome de l'animal est modifié, soit par l'apport d'un nouveau gène ou par la surexpression d'un gène existant dans le but d'étudier un gain de fonction, soit par la mutation ou l'inactivation d'un gène pour étudier une perte de fonction. Pour les modèles correspondant à une pathologie sporadique, le défaut est créé expérimentalement par une opération chirurgicale, comme l'ablation d'un organe, ou bien par injection d'un principe actif responsable d'une toxicité, d'une immunogénicité ou encore d'une dérégulation génétique dans un tissu ciblé. Au contraire pour les modèles spontanés, l'apparition des symptômes ou de la pathologie n'est pas associée à une intervention expérimentale. Ces modèles animaux sont particulièrement utilisés pour identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des maladies du MN.

1.1.3.1 Modèles invertébrés

Avec des modèles invertébrés comme le ver nématode *Caenorhabditis elegans* et la mouche *Drosophila melanogaster*, un nombre important d'individus peut être obtenu rapidement, ce qui est particulièrement utile pour des analyses de criblage, c'est-à-dire pour identifier ou évaluer l'effet d'une molécule à grande échelle. Comme la plupart des gènes identifiés dans les pathologies du MN humaines possèdent des orthologues chez ces invertébrés ([Culetto 2000](#)), il a été possible de créer des modèles liés aux gènes SMN (pour revue : [Grice 2011](#)), SOD1 ([Watson 2008](#)), TDP-43 ([Wang 2011](#)), et FUS ([Murakami 2012](#), [Lanson 2012](#)). L'utilisation de ces modèles est surtout orientée pour les études des mécanismes moléculaires, notamment la recherche de partenaires d'interactions du gène ou de la protéine impliquée, avec, par exemple, la mise en évidence chez la drosophile de l'interaction de TDP-43 et FUS au sein d'un même complexe associé à l'ARN ([Wang 2011](#)). Par ailleurs, la faible identité entre certains de ces orthologues et les gènes humains, comme par exemple les *SMN-like* qui ne s'alignent qu'à 35% environ avec le gène SMN1 humain, présente toutefois l'avantage d'identifier les domaines conservés, essentiels à la fonction du gène et de son produit, comme le domaine permettant l'oligomérisation de SMN, identifié chez la mouche ([Miguel-Aliaga 2000](#)).

Les modèles invertébrés de SMA ou d'ALS ont été principalement obtenus par inactivation de gène (*knock-out*), par mutagenèse aléatoire, en utilisant un agent mutagène comme le méthanesulfate d'éthyle ([Chan 2003](#)), ou par mutagenèse dirigée en utilisant des transposons ([Chang 2008](#)). Ces techniques ont notamment permis d'identifier l'effet chez la

drosophile de mutations de SMN retrouvées chez l'homme, sur l'organisation des récepteurs au glutamate au niveau des jonctions neuromusculaires ([Chan 2003](#)). Certains modèles ont également été créés par une diminution ciblée de l'expression génique (*knock-down*) à l'aide d'ARN interférence. Ainsi, le *knock-down* de *smn-1* chez le nématode a conduit à des défauts de locomotion et à une diminution de l'espérance de vie des vers ([Briese 2009](#)). Le faible nombre de cellules et la transparence du SNC du nématode ainsi que la connaissance approfondie de celui de la mouche ont permis de mettre en évidence lors du développement du SNC des défauts d'organisation des circuits neuronaux liés à une faible quantité de protéine SMN fonctionnelle ([Briese 2009](#), [Lloyd 2010](#), [Imlach 2012](#)).

1.1.3.2 Modèles murins

Parmi les modèles vertébrés, les rongeurs sont les plus communément utilisés. En effet, les souris et les rats ont des cycles de reproduction rapide et sont peu exigeants à élever, ce qui facilite la création et le maintien de nouvelles lignées par transgénèse. Ces modèles murins permettent à la fois d'étudier la pathogénie des maladies du MN dans le SNC de mammifères et de démontrer l'efficacité d'une molécule ou d'une approche thérapeutique sur un grand nombre d'individus.

1.1.3.2.1 Modèles murins induits

Concernant la SMA, il existe de nombreux modèles induits de souris présentant différentes formes (sévérités) de la pathologie (pour revue : [Sleigh 2011](#)). Contrairement à l'homme, la souris ne possède que la version non répétée du gène *Smn* et n'a pas de copies centromériques SMN2. Ainsi, la délétion complète par recombinaison homologue de ce gène unique aboutit au décès précoce des embryons de souris, tandis que la suppression d'un seul des deux allèles ne provoque pas de phénotype apparent ([Schrank 1997](#)).

Pour créer un modèle murin de SMA présentant les mêmes niveaux de protéine SMN fonctionnelle et les mêmes types de défauts tissulaires et cellulaires que ceux observés chez les patients, la première stratégie utilisée a été d'introduire dans le génome murin des copies du gène SMN2 humain, ce qui rend les embryons de souris transgéniques viables ([Hsieh-Li 2000](#), [Monani 2000](#)). Les souris « SMN2 » ainsi obtenues (*Smn*^{-/-} ; *SMN2*^{+/+}) avec une à deux copies *smn2*, présentent à la naissance un phénotype indissociable de celui des souriceaux

non-affectés, puis à partir de 2 jours une détérioration rapide de l'état général menant à la mort avant l'âge de 7 jours ([Monani 2000](#)). Au cours de cette période, les souriceaux présentent une diminution des mouvements, des tremblements et une respiration difficile, signes d'une faiblesse musculaire, qui s'amplifient ensuite au niveau des membres jusqu'à empêcher les animaux de se relever lorsqu'ils sont sur le côté. A leur mort, les souriceaux affectés ont une taille et un poids (environ 1,5 g) nettement plus faibles que les animaux sains du même âge (en moyenne 4,5 g). Les souris portant quatre copies SMN2 ou plus présentent un phénotype beaucoup plus modéré, voir sain, avec une espérance de vie similaire aux animaux non porteurs de mutation. Ceci a montré qu'une augmentation modeste de la quantité de protéine SMN fonctionnelle à partir de SMN2 est capable de restaurer un phénotype sain, faisant de SMN2 une cible thérapeutique pour renforcer l'expression de SMN dans les MN ([Monani 2000](#)).

Le modèle « SMNΔ7 », initialement créé dans le but d'étudier le rôle de SMNΔ7, le transcrit non fonctionnel produit à partir du gène SMN2, dérive du modèle « SMN2 » auquel a été ajouté le transgène SMNΔ7, c'est-à-dire l'ADN complémentaire de SMN1 sans l'exon 7 (*Smn*^{-/-} ; *SMN2*^{+/+} ; *SMNΔ7*^{+/+}) ([Le 2005](#)). Les souris « SMNΔ7 » ont une espérance de vie moyenne de 13 jours, contre 5 jours pour le modèle « SMN2 », et un poids maximal de 3 g. Le modèle « SMNΔ7 » représente également une forme sévère de SMA, mais avec un phénotype plus modéré que le modèle « SMN2 » puisque les symptômes apparaissent plus tardivement. En effet, la faiblesse musculaire est visible à partir de l'âge de 5 jours et devient plus prononcée à partir de 10 jours, avec des tremblements et des difficultés à se déplacer ([Le 2005](#)). Ce phénotype plus modéré est probablement lié au fait que la protéine SMNΔ7 est capable de former des complexes SMN avec la protéine fonctionnelle, ce qui augmente sa stabilité. Ce modèle « SMNΔ7 » est actuellement le modèle murin de SMA de type I le plus utilisé, à la fois pour comprendre les processus de neurodégénérescence à l'origine de la maladie et pour développer des stratégies thérapeutiques.

D'autres stratégies ont été mises au point pour diminuer l'expression du gène *Smn* murin. Une technique de *knock-in*, utilisée pour perturber l'épissage de *Smn* de façon similaire à SMN2, a donné un modèle (*Smn*^{2B/-}) présentant une SMA de sévérité modérée, proche des formes humaines de type II, l'espérance de vie des souris étant d'environ un mois ([Bowerman 2009](#)). Une autre technique utilisant le système de recombinaison conditionnel Cre-*loxP* a permis la création de modèles présentant une absence complète de l'expression de *Smn* dans

des tissus ciblés (pour revue : [Sleigh 2011](#)). Ceci a notamment permis de mettre en évidence qu'une forte réduction hépatique de SMN mène à de sévères défauts développementaux et fonctionnels du foie chez des embryons de 18 j, associés à une forte mortalité néonatale révélant un rôle majeur de la protéine SMN dans le fonctionnement des hépatocytes ([Vitte 2004](#)).

Concernant l'ALS, différents modèles de souris et de rats transgéniques ont été créés suite à l'identification des gènes impliqués chez les patients atteints de forme familiale.

Les plus décrits et les plus utilisés sont les modèles SOD1, qui portent des copies du gène humain avec les mutations identifiées chez des patients atteints d'ALS, notamment la mutation SOD1^{G93A}. Ces modèles ont confirmé un gain de fonction toxique des protéines SOD1 humaines mutées pour les MN (pour revue : [Van Den Bosch 2011](#)).

Les souris SOD1^{G93A} présentent une perte des MN spinaux et une dénervation qui se traduit par une faiblesse musculaire progressive menant à une paralysie des membres puis à la mort vers l'âge de 5 à 6 mois ([Gurney 1994](#)).

Des rats transgéniques SOD1^{G93A} ont également été créés. Leur plus grande taille permet des manipulations plus complexes comme la recherche de métabolites dans le LCS, les rats ayant un volume de LCS 10 à 20 fois supérieur à celui des souris ([Nagai 2001](#)). Ces rats présentent les mêmes symptômes que les souris, mais avec une progression plus rapide, les premiers signes apparaissent vers l'âge de 4,5 mois et la survie moyenne de ces animaux est de 5 mois ([Nagai 2001](#)).

Ces modèles ont permis de faire des progrès importants dans la connaissance de la maladie, notamment de mieux comprendre le rôle des différents types cellulaires dans la progression de la maladie ([Van Den Bosch 2011](#)). Ils ont toutefois montré des limites dans la prédiction de l'effet de médicaments neuroprotecteurs. En effet, plusieurs molécules qui se sont révélées efficaces dans ce modèle n'ont pas montré d'efficacité lors d'essais thérapeutiques chez l'homme ([Zhu 2002](#), [Gordon 2007](#)).

A noter, que ces modèles ne représentent que les formes familiales d'ALS liées au gène SOD1 et non pas les formes sporadiques qui sont beaucoup plus fréquentes chez l'homme. Ces limitations soulignent l'intérêt de développer des modèles ALS différents, basés sur plusieurs déterminants biologiques de la maladie.

Ainsi, plus récemment, un certain nombre de souris transgéniques ont été créés, porteuses de mutations identifiées sur d'autres protéines impliquées dans la pathogénie de l'ALS chez l'homme.

Après l'identification de mutations affectant les protéines FUS et TDP-43, des modèles, incluant d'une part un KO du gène FUS/TLS chez la souris et la surexpression d'une forme mutée chez le rat (pour revue [Lanson 2012](#)), et d'autre part la surexpression toxique de TDP-43 mutant ou sauvage chez la souris et le rat ([Wang 2010b](#), [Zhou 2010](#)), ont été créés afin de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans la pathogénie de l'ALS. Ces animaux présentent, comme pour la pathologie humaine, un défaut au niveau des axones moteurs menant à une dénervation musculaire et à une paralysie progressive ([Zhou 2010](#), [Lanson 2012](#)). L'étude de ces modèles murins a montré que ce défaut axonal est lié à une agrégation aberrante dans le cytoplasme des protéines FUS/TLS et TDP-43 qui deviennent insolubles par ubiquitinylation ou phosphorylation, ce qui aboutit à une diminution de l'activité de ces protéines dans le métabolisme des ARN au sein du noyau, et/ou à l'apparition d'une fonction toxique des inclusions cytoplasmiques ([Zhou 2010](#), [Huang 2011](#), [Lee 2011](#)).

D'autre part, l'importance des facteurs de croissance dans la pathogénie de l'ALS a été mise en évidence par l'intermédiaire de mutations de gènes codant pour le CNTF (pour *ciliary neurotrophic factor*) ou le VEGF (souris VEGF^{Δ/Δ}) chez des souris. Dans ces deux cas, les animaux présentent des symptômes progressifs apparaissant à l'âge adulte et incluant une dégénérescence des MN et une atrophie musculaire, mais sans provoquer de paralysie ni affecter leur survie ([Masu 1993](#), [Oosthuyse 2001](#)).

Enfin, un autre modèle intéressant porte une mutation au niveau du domaine de liaison aux microtubules de la dynactine, ce qui aboutit à l'altération du transport axonal, un mécanisme pathogénique commun à la SMA et à l'ALS ([Lai 2007](#)). Ces souris montrent un phénotype d'atteinte des MN à partir de l'âge de 10 mois selon un mécanisme dominant négatif aboutissant à des accumulations non fonctionnelles des protéines du cytosquelette et de transport vésiculaire.

Selon une approche différente, les modèles *Cra* pour « *Cramping* » et *Loa*, pour « *Legs at odd angles* » ont été obtenus indépendamment en utilisant de la N-nitroso-N-éthylurée, un agent mutagène ([Hrabé de Angelis 2000](#), [Rogers 2001](#), respectivement). Ces deux modèles présentent différentes mutations ponctuelles dans le gène codant pour la dynéine, protéine motrice impliquée dans le transport rétrograde le long des microtubules. Au niveau

histologique, les souris hétérozygotes présentent à partir de l'âge de 16 mois une diminution importante du nombre de MN des cornes antérieures de la moelle, associée à une dénervation musculaire et à une diminution de la vitesse du transport axonal rétrograde, ainsi qu'à une morphologie altérée des fibres musculaires ([Hafezparast 2003](#)). Ces modèles sont ainsi particulièrement intéressants pour l'étude de la pathogénie de la SMA et de l'ALS, puisqu'ils illustrent la relation commune à ces deux maladies entre les défauts de transport axonal et la dégénérescence des MN.

En plus des modèles SMA et ALS, l'identification du gène impliqué dans la SBMA, celui codant pour le récepteur aux androgènes, et des défauts génétiques provoquant la maladie : la forte augmentation des répétitions du trinuécléotide CAG au sein de ce gène ([La Spada 1991](#)), a permis la création de plusieurs modèles de souris présentant différents degrés de sévérité de SBMA ([McManamny 2002](#), [Katsuno 2003](#)). Ces modèles ont permis de mettre en évidence la relation entre la sévérité de la dégénérescence des MN et le nombre de répétitions poly-Q dans le gène codant pour le récepteur aux androgènes, probablement par la perte de la fonction du récepteur et/ou par l'apparition d'une toxicité liée aux répétitions dans les MN ([Banno 2012](#), [Katsuno 2012](#)).

1.1.3.2.2 Modèles murins spontanés

Un certain nombre de dégénérescences spontanées du MN ont été décrites chez la souris. Si aucun de ces modèles murins ne montre toutes les caractéristiques pathologiques de la SMA ou de l'ALS humaines, l'étude de ces modèles présentant naturellement une perte des MN peut également permettre de mieux comprendre la pathogénie des maladies du MN en identifiant des processus biologiques et des protéines impliqués dans la dégénérescence des MN ou la réduction du nombre d'axones moteurs. Dans ce contexte, trois modèles murins spontanés de maladie du MN ont été particulièrement étudiés : la souris *Wobbler*, la souris *Pmn* et la souris *Nmd*.

Les souris *Wobbler* (vacillant) se caractérisent par une dégénérescence des corps cellulaires des MN et des axones moteurs de la moelle et du tronc cérébral ([Duchen 1968](#)), due à une mutation à transmission autosomale récessive du gène codant pour VPS54, un facteur impliqué dans le trafic des vésicules de transport intracytoplasmique ([Schmitt-John 2005](#)). Les régions du SNC atteintes rapprochent la pathologie *Wobbler* de l'ALS humaine, toutefois, la description d'une dégénérescence neuronale plus générale, avec une atteinte

précoce au niveau du cervelet, du thalamus et du tronc cérébral ainsi qu'un défaut de spermiogénèse éloigne cette pathologie murine d'une pure maladie des MN ([Rathke-Hartlieb 1999](#), [Heimann 1991](#)).

Les souris *Pmn*, pour « *progressive motor neuronopathy* », montrent une dégénérescence des axones moteurs restreinte aux MN de la moelle à partir de l'âge de 2 semaines, et une disparition presque complète des axones distaux à 5 semaines, associées à une faiblesse musculaire et une paralysie des membres menant à la mort des animaux vers l'âge de 6 semaines ([Schmalbruch 1991](#)). Ces souris *Pmn* présentent une mutation du gène codant pour la chaperonne E tubuline-spécifique menant à la déstabilisation de la protéine tubuline et ainsi à un nombre réduit de microtubules et à la dégénérescence des axones ([Martin 2002](#)), ce qui souligne encore une fois la relation existant entre les mécanismes de transport axonal et les processus pathogéniques menant spécifiquement à la perte des MN de la moelle.

Les souris *Nmd*, pour « *neuromuscular degeneration* », sont caractérisées par une atteinte spécifique des MN des cornes ventrales de la moelle responsable d'une atrophie musculaire apparaissant caudalement et progressant crânialement, suivie d'une paralysie évoluant rapidement jusqu'à la mort des animaux vers l'âge de 3,5 semaines ([Cook 1995](#)). Ces souris présentent une mutation à transmission autosomale récessive du gène *Smbp2* codant pour une hélicase/ATPase qui colocalise avec les machineries liées au métabolisme de l'ARN ([Cox 1998](#)). De façon intéressante, des mutations du gène IGHMBP2, l'homologue chez l'homme de *Smbp2*, ont été retrouvées chez des patients atteints d'amyotrophie spinale avec détresse respiratoire, une variante des formes infantiles de SMA caractérisée par une atteinte plus prononcée des muscles distaux ([Grohmann 2001](#)). Ceci met à nouveau en lumière le lien entre les mécanismes de régulation du métabolisme de l'ARN et la dégénérescence des MN.

1.1.3.4 Modèles « gros animaux »

Les mammifères de plus grande taille, comme les chats, les chiens ou les primates non-humains, jouent un rôle prépondérant dans les études précliniques, c'est-à-dire dans le transfert de preuves de concept établies chez les rongeurs vers l'application clinique chez l'homme. En effet, leur masse et leur anatomie sont plus proches de celles de l'homme, ce qui est particulièrement pertinent pour le choix des doses d'injections de molécules thérapeutiques et l'étude de leur dissémination dans l'organisme. Leur espérance de vie plus

importante permet aussi des études à long terme et le suivi de potentiels effets secondaires. Il est également possible, puisque leur système immunitaire est plus proche de celui de l'homme que celui des rongeurs, d'analyser les réponses immunes déclenchées par les traitements.

Modèles induits

La création de modèles gros animaux induits permet d'étudier sur le plan clinique et histologique l'implication de mécanismes pathogéniques identifiés au préalable chez l'homme. Dans le cas de l'ALS par exemple, la surexpression de TDP-43 dans la moelle de macaque (*Macaca fascicularis*) adulte, a été réalisée par injection intraspinale d'AAV1 recombinant pour le gène TDP-43 humain sauvage au niveau de l'intumescence cervicale et du côté de la main dominante, à deux doses : 10^{13} et 5.10^{13} vg/kg. Cette surexpression de TDP-43 a confirmé, dans un modèle animal proche de l'homme, le rôle pathogénique de cette protéine dans le processus neurodégénératif de la maladie ([Uchida 2012](#)). En effet, les premiers symptômes sont apparus 2 semaines après l'injection, avec des difficultés à prendre des objets, liées à une faiblesse motrice au niveau du coude. A la fin de l'étude, 2 à 5 semaines après l'apparition de ces symptômes, les muscles de la main dominante sont devenus totalement paralysés et l'atrophie musculaire s'est propagée au côté controlatéral, avec au niveau électrophysiologique, une diminution de la taille du potentiel d'action musculaire progressant jusqu'à une complète inexcitabilité au stade terminal. Histologiquement, la protéine TDP-43 exogène (taguée) a été retrouvée autour du site d'injection avec une diffusion allant jusqu'à la moelle thoracique, incluant des MN, en proportion plus transduits du côté ipsolatéral. Plus précisément, les MN transduits ont été localisés au niveau de la lamina IX de Rexed, c'est-à-dire essentiellement des MN α innervant des muscles proximaux, ce qui est en corrélation avec la progression des symptômes. Ces MN ont perdu l'expression nucléaire de la protéine TDP-43 endogène et ont présenté une mauvaise localisation des protéines endogène et exogène sous forme de granules au niveau cytoplasmique, associée à une accumulation aberrante de neurofilaments, de façon équivalente à ce qui a été observé chez les patients ALS.

D'autre part, il devrait bientôt être possible d'obtenir un modèle gros animal de SMA dont la génétique est proche de celle de l'homme, particulièrement utile pour les études précliniques. En effet, une équipe a apporté la preuve du concept du KO SMN chez le porc (*Sus scrofa*), avec ajout de copies SMN2 humaines comme chez la souris ([Lorson 2008](#),

[Lorson 2011](#)). Les animaux ainsi obtenus devraient être aujourd'hui en cours d'évaluation phénotypique.

Modèles spontanés

Parmi les modèles gros animaux spontanés, certains présentent des atteintes non familiales d'étiologie inconnue. C'est le cas des chevaux et de la maladie du MN équine, décrite depuis plusieurs années ([Cummings 1990](#)), pour laquelle les facteurs responsables de la dégénérescence des MN n'ont pas encore été clairement identifiés ([Mohammed 1993](#), [de la Rúa-Doménech 1995](#), [Mohammed 2007](#)). La perte des MN de la moelle et du tronc cérébral de ces chevaux a été récemment associée à une augmentation de l'expression de TDP-43 ([El-Asaad 2012](#)).

Une pathologie similaire a été récemment décrite chez le porc, que les auteurs ont désigné comme maladie du MN porcine spontanée ([Wohlsein 2012](#)).

Des études génétiques, épidémiologiques et physiopathologiques dans ces modèles pourraient permettre à l'avenir d'identifier de nouveaux facteurs de risque génétiques ou environnementaux susceptibles de déclencher les formes sporadiques de maladies du MN.

Concernant les modèles de formes familiales, plusieurs races de vaches montrent une forme infantile à transmission autosomique récessive de dégénérescence de MN de la moelle suivie de faiblesse et d'atrophie musculaires, proche de la SMA humaine de type I ([el-Hamidi 1989](#), [Troyer 1993](#), [Agerholm 1994](#), [Pumarola 1997](#)). Cette SMA bovine a été associée à une mutation du gène FVT1, codant pour la sphingosine réductase, une enzyme impliquée dans le métabolisme des sphingolipides, et notamment des sphingomyélines, composants principaux des gaines axonales de myéline ([Krebs 2007](#)).

Une maladie comparable a été décrite chez un mouton qui présente une faiblesse musculaire dès l'âge de 1 semaine associée à une perte des MN de la moelle ([Anderson 1999](#)). La pathologie ovine a récemment été reliée à une nouvelle mutation touchant un acide-aminé du site catalytique de AGTPBP1, une carboxypeptidase qui joue un rôle dans le protéasome ([Zhao 2012](#)).

L'identification de nouvelles mutations responsables de la perte de MN dans ces modèles animaux spontanés pourrait permettre de mieux comprendre les processus pathogéniques à

l'origine de la dégénérescence des MN chez l'homme, en particulier dans les cas de formes familiales non diagnostiqués génétiquement.

Néanmoins, dans le cas de la SMA bovine par exemple, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre le gène responsable FVT1, et la SMA non liée à SMN chez l'homme ([Parkinson 2008](#)).

Les carnivores domestiques présentent eux aussi des cas de maladies du MN. La SMA canine à transmission autosomale dominante a été décrite chez un épagneul breton. Elle est caractérisée par une faiblesse musculaire apparaissant vers l'âge de 6 à 8 semaines et progressant rapidement vers une complète tétraplégie entre 13 et 20 semaines pour les homozygotes qui meurent à environ 5 mois, tandis que les premiers signes n'apparaissent qu'à partir de 10 mois pour les hétérozygotes ([Cork 1979](#), [Blazej 1998](#)). Ces symptômes résultent de lésions au niveau de la moelle, plus particulièrement d'une dégénérescence des axones moteurs avec une accumulation de neurofilaments menant à la mort des MN, caractéristiques neuropathologiques proches de celles observées dans les formes infantiles de la SMA humaine. L'origine génétique de cette atteinte n'est pas encore connue aujourd'hui. La maladie du MN canine est depuis décrite essentiellement au niveau histologique, notamment en ce qui concerne la jonction neuromusculaire qui présente une fonctionnalité et une morphologie altérées avant l'installation de la dénervation musculaire ([Balice-Gordon 2000](#), [Rich 2002](#), [Carrasco 2004](#)).

Un autre modèle canin, décrit initialement comme présentant une forme de myélopathie dégénérative, a été rapproché récemment de l'ALS humaine après l'identification de la région chromosomique associée à la pathologie, contenant SOD1 ([Awano 2009](#)). Ces chiens présentent tardivement, à partir de 8 ans, une spasticité et une ataxie proprioceptive des membres postérieurs, signes d'atteinte des MN pyramidaux, évoluant ensuite vers une paraplégie. Ce chien pourrait constituer l'un des modèles gros animal le plus proche de l'ALS humaine. Néanmoins, l'apparition tardive des symptômes rend difficile l'utilisation d'un tel modèle pour des études précliniques.

La maladie du MN féline a été décrite chez une famille de chats de race Maine Coon, avec une transmission autosomale récessive ([He 2005](#)). Les premiers signes cliniques, visibles entre l'âge de 10 et 12 semaines, sont une faiblesse et un tremblement musculaires particulièrement prononcés pour les membres postérieurs, qui se traduisent par des anomalies de démarche et de posture. Les atteintes des muscles proximaux des membres contraignent les

chats à prendre une posture particulière avec les articulations du tarse et du carpe rapprochées, et les parties terminales des membres tournées de 30° vers l'extérieur pour gagner en stabilité, tandis que l'atrophie des muscles rachidiens provoque une forte courbure du dos (**fig7a**). Cette amyotrophie est clairement apparente à l'âge de 20 semaines, puis progresse lentement jusqu'à atteindre un plateau clinique autour de l'âge de 8 mois ([He 2005](#)).

L'apparition des premiers signes cliniques se fait en même temps que l'apparition d'anomalies musculaires détectables par EMG, plus précisément des fibrillations et des décharges à hautes fréquences dans les membres antérieurs et postérieurs indiquant un processus précoce de dénervation musculaire entre 12 et 14 semaines. De plus, entre l'âge de 8 et 11 semaines, l'amplitude du CMAP mesuré dans le muscle *soleus* est significativement diminuée (**fig7b**) ([Wakeling 2012](#)), suggérant une perte ou une absence précoce de fonctionnalité d'un certain nombre de jonctions neuromusculaires. À cet âge, la dénervation de la plaque motrice coïncide avec l'apparition de l'atrophie musculaire.

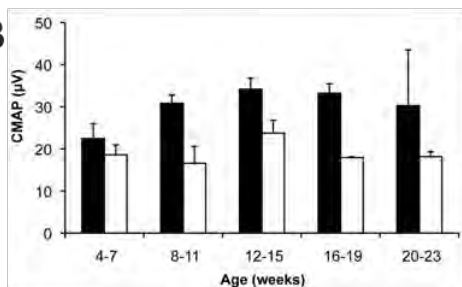
Le comptage des axones moteurs dans les racines ventrales de la moelle lombaire indique qu'au moment de l'apparition des signes cliniques, les chats malades ont en moyenne 40% moins d'axones moteurs que les chats sains (**fig7c, d**) ([Wakeling 2012](#)). Plus précocement, dès l'âge de 8 semaines, une diminution spécifique des axones de large calibre apparaît, en concordance avec le fait qu'à l'âge de 21 semaines, la majorité des fibres musculaires atrophiées sont de type II (rapides), donc innervées par des axones de large calibre.

Cette diminution du nombre d'axones moteurs n'a pas de répercussion sur le nombre global de MN dans la corne ventrale de la moelle jusqu'à l'âge de 21 semaines (**fig7e**). Néanmoins, la présence de chromatolyse et d'un noyau acentrique dès l'âge de 8 semaines suggère qu'un processus neurodégénératif a lieu précocement, menant plus tardivement, après la perte des axones, à la diminution progressive des corps cellulaires des MN, peut-être *via* un mécanisme de dégénérescence rétrograde. L'évolution des symptômes des chats LIX1^{-/-} est récapitulée dans le **tableau 2**.

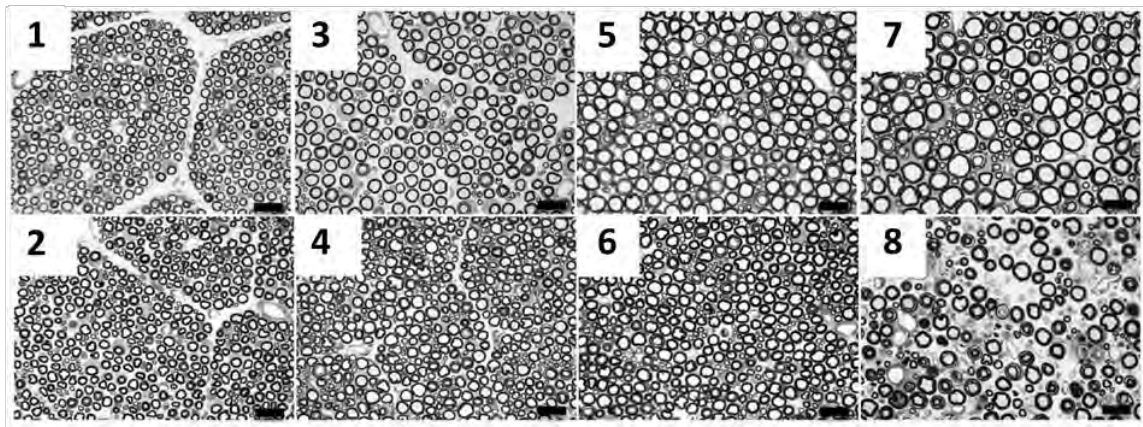
A



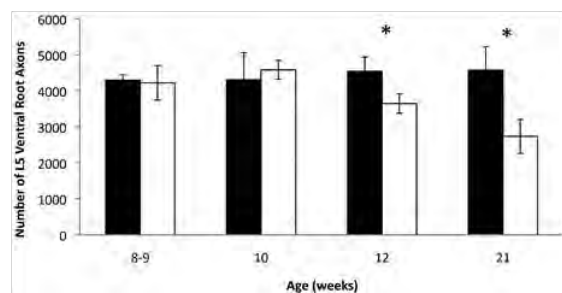
B



C



D



E

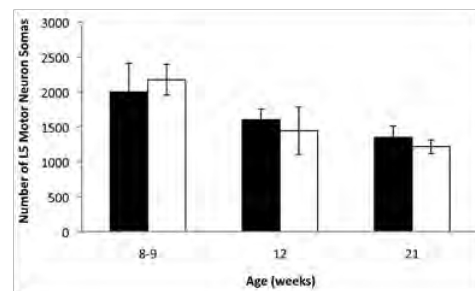


Fig.7) Caractéristiques cliniques et histologiques de la pathologie du motoneurone féline. (A) Photographies de chats $LIX1^{+/+}$ (1) et $LIX1^{-/-}$ (2) âgés de 20 semaines. (B) Composante musculaire du potentiel d'action (CMAP) mesurée dans le muscle soleus après stimulation du nerf sciatique pour des chats sains (histogrammes pleins) et malades (histogrammes vides).

(Fig.7), suite) (C) Marquages ou bleu de toluidine des racines ventrales de la moelle en région lombaire réalisés chez des chats sains (1, 3, 5, 7) et malades (2, 4, 6, 8) âgés de 4,5 semaines (1, 2), 8 à 9 semaines (3, 4), 12 semaines (5, 6) et 21 semaines (7, 8). Échelle : 20 μ m. (D) Nombre total d'axones myélinisés au niveau des racines ventrales de la moelle en région L5 pour des chats sains (histogrammes pleins) et malades (histogrammes vides). Un astérisque représente une différence statistiquement significative évaluée par test de Student ($p < 0,03$). (E) Nombre de corps cellulaires de MN évalué sur coupe de la moelle ventrale en région L5 marquée au crésyl violet pour des chats sains (histogrammes pleins) et malades (histogrammes vides). Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Tiré de ([Wakeling 2012](#)).

Âge des chats	Symptômes observés chez les chats LIX1 ^{-/-} par rapport aux chats sains
3 jours	pas de différence
5 semaines	pas de différence
8 semaines	- présence de chromatolyse et de noyaux acentriques dans les motoneurones de la corne ventrale - absence de développement des axones de large calibre
10 semaines	- légère atrophie musculaire - premiers symptômes neurologiques - pas de perte d'axones moteurs ni de jonctions neuromusculaires (mauvais fonctionnement ?)
12 semaines	- atrophie musculaire nette (surtout les fibres II) - symptômes neurologiques et EMG : dénervation - dégénérescence des jonctions neuromusculaires - absence nette de développement des axones de large calibre - diminution d'environ 40% du nombre total d'axones dans les racines ventrales
21 semaines	- atrophie musculaire sévère (surtout les fibres II) - absence d'axone de large calibre - dénervation sévère - débuts de perte des corps cellulaires dans les cornes ventrales de la moelle - les corps cellulaires des MN restants sont de plus petit diamètre
Chats plus âgés	- ralentissement de la progression des symptômes - espérance de vie des chats LIX1^{-/-} ?

Tab.2) Chronologie de l'évolution des symptômes chez le chat LIX1^{-/-}.

Au niveau génétique, les chats malades ne montrent aucun défaut d'expression du gène SMN ([He 2005](#)). En revanche, la pathologie féline est liée à une importante délétion d'environ 140 kb au niveau du chromosome A1q ([Fyfe 2006](#)). Le locus concerné contient les gènes LIX1 pour *limb expression 1*, et LNPEP pour *leucyl/cystinyl aminopeptidase*. La délétion s'étend du troisième intron de LIX1 au premier intron de LNPEP, et les deux gènes se trouvant dans un sens de transcription opposé, les exons 4 à 6 de LIX1 et les exons 2 à 18 de LNPEP sont concernés par la délétion.

Le gène LNPEP code pour une enzyme membranaire et sécrétée qui dégrade un grand nombre de peptides et d'hormones au niveau du placenta, du cœur, du rein ou encore de l'intestin ([Laustsen 1997](#)), et est également retrouvée dans le CNS ([Fyfe 2006](#)). Un KO murin de ce gène a indiqué que l'enzyme est également impliquée dans le recrutement de GLUT4, un transporteur de glucose. Néanmoins, les souris KO ne montrent aucun défaut d'homéostasie du glucose ni de phénotype neuromusculaire, ce qui suggère que ce gène n'est pas directement impliqué dans la perte des MN félins ([Keller 2002](#)).

Le gène LIX1 est moins bien décrit et code pour une protéine dont la fonction n'est pas encore connue. L'expression du gène LIX1 a été relevée de façon transitoire et précoce dans les bourgeons des membres lors du développement embryonnaire du poulet, d'où le nom du gène ([Swindell 2001](#)). Une autre observation faite chez la souris a indiqué une expression de LIX1 croissante, depuis les derniers stades de gestation jusqu'à l'âge adulte, dans différentes parties du CNS et plus spécifiquement au niveau des MN de la corne ventrale de la moelle et des ganglions rachidiens dorsaux ([Moeller 2002](#)). Chez de jeunes chats, l'expression de LIX1 est également concentrée au CNS, en particulier dans la moelle, le thalamus et le tronc cérébral, et est aussi retrouvée au niveau du rein et du cœur ([Fyfe 2006](#)). Ces données suggèrent que LIX1, et non LNPEP, serait le gène responsable de la pathologie féline.

La protéine LIX1 comporte 281 acides aminés et sa séquence est conservée au cours de l'évolution puisqu'elle présente une identité de 97% et 92% avec celle de l'homme et de la souris, respectivement ([Fyfe 2006](#)). Les portions de séquence les plus conservées concernent les résidus 29 à 99, dont la structure secondaire prédite correspond à un domaine de liaison à l'ARN double brin. Ce domaine, commun à un certain nombre de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN et dans les processus pathogéniques conduisant à la perte des MN, comme TDP-43, SMN et FUS ([Saunders 2003](#)), suggère qu'un mécanisme pathogénique lié

au métabolisme de l'ARN pourrait être à l'origine de la dégénérescence des MN chez le chat, comme dans différents modèles animaux de maladies du MN et chez l'homme.

Une autre séquence conservée de la protéine LIX1, les 100 derniers acides aminés du côté C-terminal, présente très probablement une structure surenroulée de type *coil-coiled* ([Swindell 2001](#)), permettant potentiellement une interaction avec d'autres protéines possédant cette structure secondaire ([Beck 1998](#)). Parmi les partenaires potentiels de LIX1, une étude chez *Drosophila melanogaster* a montré que *Lft* (pour *Lowfat*, initialement appelé CG13139, l'orthologue de LIX1 chez la mouche), ainsi que la protéine LIX1 humaine, peuvent interagir avec *Fat* et *Dachsous*, composants d'une voie de signalisation régulant la polarité cellulaire ([Mao 2009](#)).

Enfin, une autre séquence fortement conservée de LIX1 est la région non traduite en 5' du gène (5'UTR), d'une taille d'environ 400 bp ([Fyfe 2006](#)). Cette 5'UTR a une structure secondaire prédite en tige-boucle, structure présente sur de nombreux ARN messagers pour en moduler la stabilité ou la traduction, ce qui suggère un contrôle post-transcriptionnel important pour l'expression de la protéine LIX1.

Plusieurs études ont tenté de mettre en relation chez l'homme des cas de SMA non liés à SMN avec LIX1, mais n'ont trouvé dans tous les cas aucune association ([Fyfe 2006](#), [Parkinson 2008](#), [Sasongko 2010](#)). D'autre part, afin de mieux comprendre le rôle de LIX1, un KO LIX1 murin a été réalisé par *gene trapping* au niveau de l'intron 1 ([Wakeling 2011](#)). La perte de l'expression de LIX1, effective chez les souris *Lix1*^{-/-} obtenues, n'affecte pas la survie des animaux et ne provoque aucune atteinte clinique ou histologique. En revanche, les souris produisent naturellement un transcript LIX1 alternatif de 465 bp contenant une partie de l'intron 4 et les exons 5 et 6, les 121 derniers acides aminés étant communs au LIX1 complet. L'expression de ce *Lix1alt*, concentrée au CNS, semble spécifique aux rongeurs. Cette étude suggère que la fonction portée par la partie C-terminale de la protéine LIX1 pourrait être suffisante pour empêcher la dégénérescence des MN chez la souris KO.

Bien que la génétique de la pathologie féline soit différente de ce qui est observé chez l'homme, le chat LIX1 représente un modèle pertinent de la SMA humaine de type III, particulièrement intéressant pour étudier la dégénérescence axonale qui survient dans un grand nombre de pathologies du MN (voir **tab3** pour un résumé des grands mécanismes pathogéniques identifiés chez les modèles murins de SMA et d'ALS ainsi que chez le chat). En effet, comme le chat LIX1 présente à la fois une chromatolyse des corps cellulaires des

MN et une diminution du nombre d'axones moteurs, l'étude de ce modèle félin pourrait permettre de déterminer si le mécanisme de la dégénérescence des MN a pour origine un défaut somatique ou axonal, et ainsi de proposer des éléments de réponse à une question centrale concernant la pathogénie de la SMA.

Ce modèle félin, pertinent pour tester des approches thérapeutiques compatibles avec un développement clinique, présente également l'avantage de permettre, plus facilement que dans les modèles rongeurs de petite taille, la mise au point de méthodes d'évaluation phénotypique qui peuvent potentiellement être appliquées à l'homme pour le suivi de la maladie et l'estimation de sa sévérité. En particulier, les techniques d'enregistrements EMG et les mesures des CMAP sont facilement transposables aux patients SMA et inversement, ce qui peut aboutir à terme à une amélioration progressive des techniques de suivi électrophysiologique des maladies du MN ([Swoboda 2005](#)).

Introduction

Mécanismes	Modèles murins SMA	Modèles murins ALS	Chat LIX1
dégénérescence des MN centraux	NON	OUI	NON
Apoptose / perte des corps cellulaires des MN	OUI, tardif (Tsai 2006)	OUI (Bruijn 1998)	OUI, tardif
dénervation, altération fonctionnelle de la jonction neuromusculaire	OUI, précoce (Hao 2012)	OUI, tardif (Dupuis 2009 , Lagier-Tourenne 2012)	OUI, 12 semaines
implication de la cellule musculaire	décrit dans SMNΔ7 (Cifuentes-Diaz 2001)	décrit dans SOD1 ^{G93A} (Wong 2010 , Van Den Bosch 2011)	?
défauts développementaux	controversé (McGovern 2008 , Sleigh 2011)	NON	?
déficit de croissance axonale	OUI (Fallini 2012a)	NON	OUI
altération du transport axonal	OUI (Rossoll 2009 , Fallini 2012a)	OUI (Puls 2003)	?
accumulation de neurofilaments et/ou de protéines non fonctionnelles dans les axones	OUI (Cifuentes-Diaz 2002 , Torres-Benito 2012)	OUI (King 2012)	NON
implication du métabolisme de l'ARN	OUI (Burghes 2009 , Workman 2012)	TDP-43 (Zhou 2010 , Lee 2011), FUS/TLS (Lanson 2012)	PROBABLE
altération de la fonction mitochondriale	NON	OUI (Dupuis 2004)	?
excitotoxicité	NON	OUI (Van Den Bosch 2006)	NON
stress oxydatif	NON	OUI (Hensley 2006)	NON
astrogliose	NON	OUI (Wallis 2012)	NON

Tab.3) Récapitulatif des grands mécanismes pathogéniques identifiés chez les modèles murins de SMA et d'ALS et chez le chat LIX1.

I.2 Transfert de gène dans le système nerveux central à l'aide de vecteurs AAV recombinants

I.2.1 Thérapie génique

La thérapie génique regroupe un ensemble d'approches qui consistent à transférer une information génétique portée par un ADN ou un ARN à un organisme dans le but d'apporter une information génétique manquante ou de corriger une information défectueuse. La nature et la fonction des séquences nucléotidiques dépendent de l'objectif du transfert. Il peut s'agir, dans le cas d'une stratégie de remplacement de gène, d'une séquence codante ou d'un gène entier avec les éléments de régulation pour qu'il soit exprimé par la cellule hôte. Des séquences non codantes, comme des ARN antisens ou des ARN interférents, généralement de plus petite taille, peuvent également être utilisées pour leur capacité à reconnaître des séquences du génome hôte et d'en modifier l'expression. Enfin, l'édition de gène, c'est-à-dire la modification du génome hôte comme par exemple l'excision d'une mutation, est permise par des technologies plus récentes, comme les TALENs ([Pennisi 2012](#)), ou les nucléases à doigt de zinc ([Händel 2011](#)), dont la séquence codante peut également être apportée par transfert de gène ([Ellis 2013](#)). Quel que soit le transgène, l'organisme hôte est considéré comme génétiquement modifié. En conséquence, la thérapie génique doit se doter d'un cadre légal et éthique, avec notamment la mise en avant du danger potentiel du transfert de gène aux lignées germinales ([Schuettrumpf 2006](#), [Favaro 2009](#)).

Le développement d'une stratégie de thérapie génique dépend des modèles animaux disponibles, et plus particulièrement de leur génétique. En effet, pour améliorer le phénotype d'une pathologie donnée, il faut en connaître la cause génétique pour pouvoir définir le transgène ou le type de modification génétique à réaliser. Il faut ensuite déterminer la cible thérapeutique, c'est-à-dire le ou les tissus dans lesquels doit être effectuée la modification génétique. Enfin, il faut choisir l'outil de thérapie génique, qui peut être une simple séquence nucléotidique, transgène nu, ou bien une séquence complexée à un vecteur. Pour que la séquence nucléotidique atteigne le noyau, où doit avoir lieu la modification génétique, elle doit franchir la membrane cellulaire, traverser le cytoplasme puis la membrane nucléaire. Or, un acide nucléique nu et exposé ne permet pas une telle pénétration de manière efficace, en particulier lors d'une administration *in vivo* ([Lukacs 2000](#)). Au contraire, un vecteur enveloppant la séquence d'intérêt peut permettre de franchir les membranes par diffusion passive ou par des mécanismes plus actifs impliquant la reconnaissance d'un récepteur. Il

existe deux grands types de vecteurs : les vecteurs synthétiques et les vecteurs d'origine virale. Les vecteurs synthétiques sont composés de lipides cationiques ou de polymères cationiques pour former des polyplexes et lipoplexes, structures amphiphiles protégeant la séquence nucléotidique et lui permettant de franchir les membranes (pour revue : [Pichon 2010](#)). Ces vecteurs non-viraux présentent l'avantage par rapport aux virus de pouvoir être produits à faible coût et rapidement, mais surtout de façon contrôlée, avec une composition finale bien définie, ce qui est particulièrement intéressant pour les applications cliniques. Toutefois, si les polyplexes et lipoplexes sont constamment améliorés, notamment avec l'optimisation de leur synthèse et de leurs composants ([Wei 2013](#)), leur efficacité *in vivo* en ce qui concerne le nombre de cellules transfectées, ainsi que le niveau et la persistance à long terme de l'expression est nettement plus faible que celle obtenue avec les vecteurs viraux ([Guo 2011](#)).

Les vecteurs d'origine virale tirent profit des propriétés particulières des virus, acaryotes spécialisés au cours de l'évolution pour le transfert de leur matériel génétique et son expression par la cellule hôte afin d'assurer leur réplication. Cette spécialisation fait des virus un outil de transfert de gène d'une efficacité aujourd'hui inégalée ([Vannucci 2013](#)). Pour utiliser un virus comme vecteur, il est nécessaire d'identifier les gènes codant pour sa réplication et sa capsid afin de produire des particules déficientes pour la réplication. La plupart du temps, le transgène d'intérêt est inséré à la place de gènes essentiels pour le cycle viral, et les autres éléments pathogènes potentiels sont neutralisés. Le choix du type de virus à utiliser dépend ensuite de :

- son tropisme, c'est-à-dire le type cellulaire pouvant être transduit, dépendant principalement des protéines de la capsid qui vont reconnaître des motifs membranaires et déclencher des mécanismes actifs d'internalisation,
- sa capacité d'encapsulation, c'est-à-dire la taille maximale de la séquence nucléotidique pouvant être encapsidée à la place du génome viral,
- sa persistance dans les tissus, souvent liée à la forme du génome viral intracellulaire (intégré ou épisomique, linéaire ou circulaire)
- son immunogénicité et sa capacité à échapper à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte.

I.2.2 Généralités sur les AAV

Les virus les plus couramment utilisés comme vecteurs de thérapie génique sont les lentivirus, les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV) et le virus de l'herpès (HSV). Malgré leur capacité d'encapsidation de 4,7 kb, limitée par rapport à la capacité maximale de 30 kb des adénovirus ou de 150 kb des HSV, les AAV sont particulièrement intéressants pour une application clinique parce qu'ils sont associés à des réponses cellulaires et humorales modérées et de faibles réponses inflammatoires ([Bessis 2004](#)), qu'ils présentent une forte efficacité de transduction maintenue à long terme ([Nathwani 2011](#)), et qu'il existe un grand nombre de variants capsidiques décrits, ou sérotypes ([Gao 2005](#)), proposant un large spectre de tropismes cellulaires.

I.2.1.1 Biologie de l'AAV

Caractéristiques générales de l'AAV

L'AAV est un virus non enveloppé de petite taille de la famille *Parvoviridae*, et du genre *Dependovirus*. Son matériel génétique restreint ne suffit pas à sa réplication en l'absence d'un virus auxiliaire comme l'adénovirus, le HSV, le virus de la vaccine ou encore le papillomavirus. Son génome ADN simple brin d'environ 4700 bases contient deux gènes, *cap* et *rep*, encadrés par deux séquences répétées inversées, ou ITR pour *inverted terminal repeat*, présentant une structure en tige-boucle de 145 bp ([fig8a](#)). Le gène *cap* code pour les protéines VP1, VP2 et VP3, qui s'assemblent pour former une capside icosaédrique. Le gène *rep* code pour les protéines Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40, qui jouent un rôle dans la transcription et la réplication du génome viral, avec les ITR qui servent d'origine de réplication. Plus précisément, la structure double brin des ITR formée par les associations palindromiques des séquences B et B', C et C' puis A et A', permet de créer une amorce pour les ADN polymérases cellulaires qui répliquent le génome de l'AAV. L'association de Rep78 et Rep68 au site RBE (*Rep-binding element*) de l'ITR ainsi que leurs activités hélicase et endonucléase permettent la coupure de ce second brin au niveau du site *trs* (*terminal resolution site*) de l'ITR, ainsi que la linéarisation de la structure tige-boucle pour rendre possible la réplication de l'ITR. Une fois le génome répliqué, les protéines Rep52 et Rep40 en facilitent l'insertion dans la capside préformée pour constituer un nouveau virion. En l'absence d'activation par des facteurs auxiliaires, Rep78 et Rep68 répriment la transcription de l'ensemble des gènes viraux ([Pereira 1997](#)). Ainsi en phase de latence, l'AAV persiste sous forme intégrée dans le

Introduction

génomme hôte ou bien sous forme extra-chromosomique. L'intégration de l'AAV sauvage a lieu préférentiellement au niveau du site AAVS1, dans le chromosome 19 chez l'homme, qui présente une séquence RBE et un site *trs* ([Henckaerts 2009](#)). Cette intégration peut également avoir lieu de façon plus aléatoire, comme suite à des recombinaisons non homologues au niveau de cassures double brin ([Miller 2002](#)). En dehors de cette intégration, l'AAV sauvage est supposé se maintenir sous forme d'épisomes, comme décrit pour les AAV recombinants ([Penaud-Budloo 2008](#)), mais cela est très peu documenté, et les proportions relatives de formes intégrées et épisomiques sont difficiles à déterminer pour l'AAV sauvage.

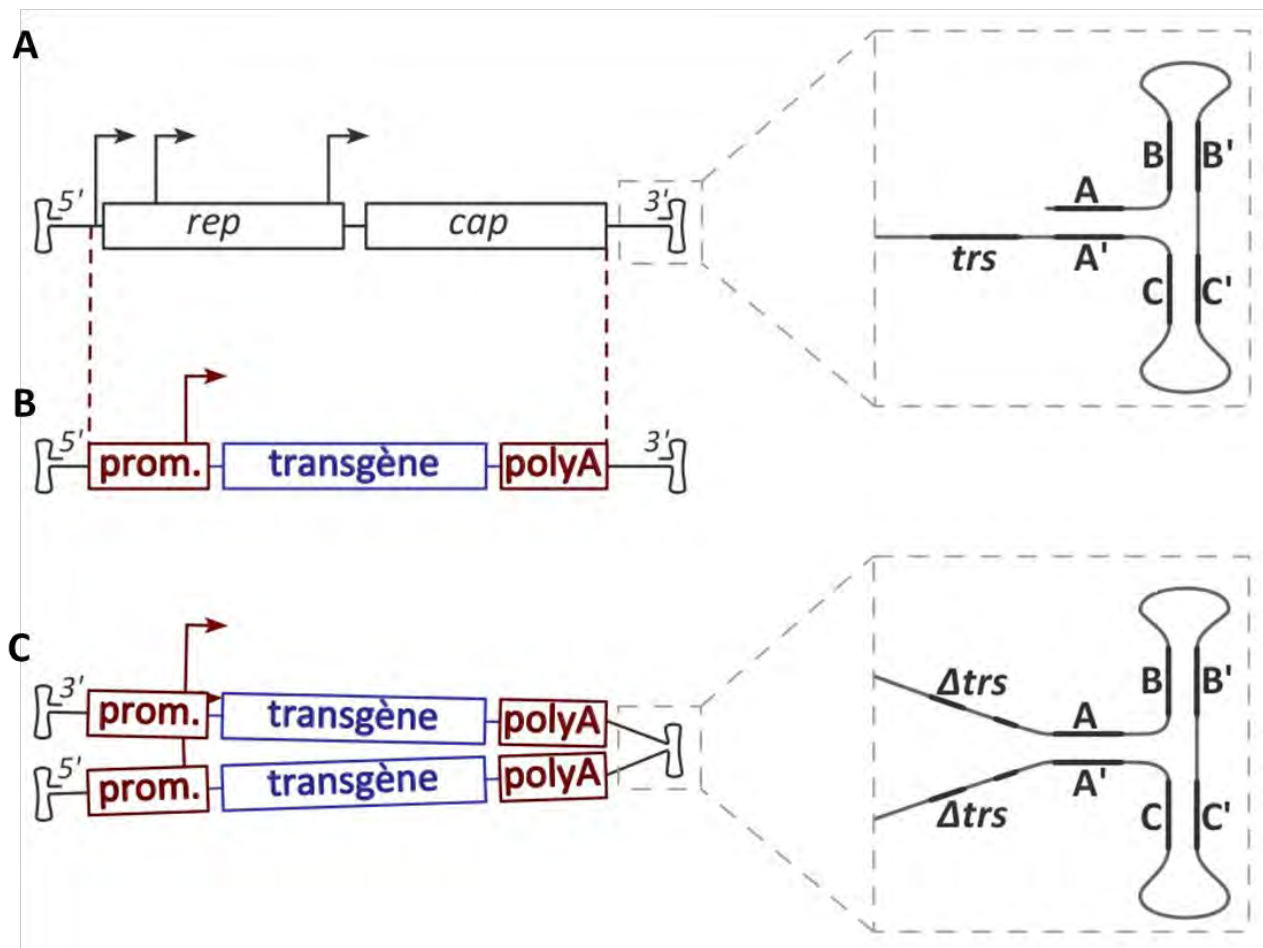


Fig.8) Génome de l'AAV et structure de l'ITR. (A) AAV sauvage, (B) AAV recombinant, (C) AAV recombinant double brin ou scAAV. *trs* : terminal resolution site, *prom.* : promoteur.

AAV recombinant

Un vecteur de thérapie génique dérivé de l'AAV peut être obtenu grâce au remplacement des gènes *rep* et *cap* par une cassette contenant le transgène d'intérêt (**fig8b**). L'AAV recombinant produit possède ainsi une cassette transgénique encadrée des séquences ITR et contenue dans une capside pour former un vecteur viral non répliquatif. Le génome de l'AAV étant constitué d'un ADN simple brin, celui-ci doit être converti en ADN double brin dans la cellule hôte pour être transcriptionnellement actif. Comme l'étape de synthèse du brin complémentaire par la machinerie cellulaire est une étape limitant l'efficacité du virus recombinant ([Fisher 1996](#)), une méthode a été développée pour produire un virus encapsidant directement les deux brins complémentaires : l'AAV auto-complémentaire ou scAAV pour *self-complementary AAV* ([McCarty 2001](#)). Ceci est possible grâce à la mutation du site *trs* de l'un des deux ITR, ce qui empêche la coupure par les protéines Rep78 /68 et la séparation du second brin néo-synthétisé ([McCarty 2003](#)) (**fig8c**). Chez la souris adulte, le vecteur scAAV a montré une efficacité nettement supérieure à l'AAV simple brin pour l'expression de l'érythropoïétine mesurée en suivant l'hématocrite sur une période de 25 semaines après injection intramusculaire, mais aussi dans le cerveau pour l'expression de la GFP 6 semaines après injection intracérébroventriculaire ([McCarty 2003](#)). Toutefois, la taille maximale de la cassette pouvant être insérer dans ces vecteurs scAAV est divisée par deux, soit environ 2,5 kb, puisque la forme dimérique ne doit pas excéder la capacité d'encapsidation de l'AAV, d'environ 5,2 kb d'ADN simple brin ([Lai 2010](#), [Wu 2010](#), [Dong 2010](#), [Hirsch 2010](#)).

Capsides, reconnaissance cellulaire et tropismes

La capside des AAV recombinants est générée à partir du gène *cap* issu de variants sérologiques naturels ou artificiels de l'AAV. Le premier sérotype à avoir été étudié et utilisé en tant que vecteur viral est l'AAV2. Ainsi, le gène *rep* utilisé pour la production d'AAV recombinants est presque toujours celui de l'AAV2 ([Rabinowitz 2002](#)). Parmi le grand nombre de génotypes d'AAV identifiés ([Gao 2005](#)), 12 sérotypes aux propriétés uniques sont aujourd'hui utilisés pour produire des AAV recombinants ([Schmidt 2008](#)). Chacun de ces sérotypes présente une surface capsidique propre qui conditionne les interactions avec l'organisme hôte, en particulier la liaison du virus à sa cellule cible puis son internalisation. La reconnaissance entre l'AAV et sa cible dépend de récepteurs et corécepteurs situés sur la membrane plasmique de la cellule cible qui, une fois activés, déclenchent le mécanisme d'internalisation. Ces récepteurs primaires assurant la reconnaissance cellulaire sont des

protéoglycanes, la spécificité provenant de la partie glycane, avec un héparane sulfate pour les AAV2, 3 et 6 ; un acide sialique pour les AAV1, 4, 5, 6 et 7 ; et un galactose pour l'AAV9 ; les récepteurs primaires des AAV8, 10, 11 et 12 n'étant pas encore déterminés ([Asokan 2012](#)). Les corécepteurs jouent un rôle important dans les mécanismes d'internalisation, et sont essentiellement des récepteurs à des facteurs de croissance, exception faite du récepteur de la laminine pour les AAV 2, 3, 8 et 9 ([tab4](#)). Le passage de barrières tissulaires comme les parois endothéliales dépend aussi de ces récepteurs. La spécificité capsidé – récepteurs/corécepteurs détermine ainsi le tropisme cellulaire du vecteur, mais également son mode d'internalisation et son type de trafic intracellulaire pour atteindre le noyau.

Concernant l'internalisation de l'AAV, plusieurs mécanismes ont été proposés par des études de transduction *in vitro* utilisant la microscopie et des lignées cellulaires déficientes pour des facteurs d'endocytose :

- l'endocytose clathrine-dépendante : suite à l'activation du récepteur et du corécepteur, la membrane cellulaire s'invagine sous l'action de la dynamine qui permet la polymérisation de la clathrine pour former des vésicules à manteau de clathrine ([Bartlett 2000](#)),
- la macropinocytose : un autre type d'endocytose avec formation de vésicules de plus grande taille suite à l'interaction de l'intégrine $\alpha V\beta 5$ avec la petite protéine G Rac1 puis avec le cytosquelette ([Sanlioglu 2000](#)),
- l'endocytose cavéoline-dépendante : comme avec la clathrine, les vésicules sont refermées grâce à l'action de la dynamine sur les cavéolines, mais à partir d'invaginations préexistantes particulières, les cavéoles, pour former les cavéosomes, un compartiment de l'endosome à pH neutre ([Bantel-Schaal 2008](#)),
- et la voie CLIC/GEEC, pour *Clathrin independent carrier / Glycosyl-phosphatidyl-inositol enriched endocytosis compartment*, une voie décrite plus récemment, dépendante des facteurs GRAF1, Cdc42 et Arf1 permettant la formation de la vésicule *via* la dynamine et le cytosquelette ([Nonnenmacher 2011](#)).

Introduction

Sérotyp	Origine	Récepteur	Corécepteur	Tropisme décrit	Immunoprévalence chez l'homme
AAV1	primate non humain	acide sialique N-glycosylé	-	muscle squelettique, SNC, voies respiratoires, foie	élevée
AAV2	homme	héparane sulfate	FGFR/HGFR, LR, intégrine	foie, muscle squelettique	élevée
AAV3	homme	-	HGFR/LR	hépatocarcinome et hépatoblastome	
AAV4	primate non humain	acide sialique O-glycosylé	-	rétine	
AAV5	homme	acide sialique N-glycosylé	PDGFR	SNC, voies respiratoires, rétine	faible
AAV6	homme	acide sialique N-glycosylé/héparane sulfate	EGFR	muscle squelettique, voies respiratoires	élevée
AAV7	primate non humain	-	-	foie, muscle squelettique, rétine	
AAV8	primate non humain	-	LR	foie, muscle squelettique	relativement faible
AAV9	homme	galactose	LR	SNC, muscle squelettique, rétine	relativement faible
AAV10	primate non humain	-	-	SNC	-
AAV11	primate non humain	-	-	-	-
AAV12	primate non humain	-	-	-	-

Tab.4) Principales caractéristiques des sérotypes d'AAV les plus couramment utilisés. Un tiret indique que l'élément n'est pas décrit. FGFR : récepteur du facteur de croissance de fibroblaste, HGFR : récepteur du facteur de croissance d'hépatocytes, LR : récepteur de la laminine, PDGFR : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes, EGFR : récepteur du facteur de croissance de l'épiderme. Adapté de ([Boutin 2010](#)) et ([Asokan 2012](#)).

Devenir moléculaire

Suite à son internalisation, l'AAV se retrouve isolé du cytoplasme dans une vésicule d'endocytose destinée à fusionner avec le compartiment endosomal. Celui-ci comporte des endosomes précoces et tardifs auxquels correspondent une acidité croissante, puis les lysosomes au pH encore plus faible. Des travaux montrant une forte diminution de l'efficacité de transduction suite à des micro-injections directement dans le cytoplasme ([Ding 2005](#)) ou après inhibition de l'acidification des endosomes ([Douar 2005](#)), indiquent que cette acidification progressive dans le compartiment endosomal est nécessaire à l'infectiosité des particules d'AAV. En effet, ces modifications de pH conduisent à des changements conformationnels des protéines de la capsid qui libèrent un domaine phospholipase A2 situé dans la partie N-terminale de VP1 permettant l'échappement endosomal, et des signaux de localisation nucléaires sur VP1 et VP2 ([Nam 2011](#)). Après la sortie des particules du compartiment endosomal et leur accumulation autour du noyau, l'AAV traverse la membrane nucléaire selon un mécanisme qui n'est pas encore décrit. Bien que la petite taille de l'AAV soit compatible avec un passage au travers des pores nucléaires, l'inhibition de ce type de transport nucléaire n'a pas d'impact sur l'efficacité de transduction ; tandis que des mutations pour les motifs de liaison PDZ de VP1 empêchent la pénétration dans le noyau, ce qui suggère un mécanisme actif faisant intervenir des facteurs de translocation nucléaire reconnaissant VP1 ([Popa-Wagner 2012](#)).

Il est possible que la particule d'AAV entre dans le noyau intacte, et il semble que la façon dont se dégrade la capsid pour libérer le matériel génétique soit dépendante de la taille du génome empaqueté, et varie selon qu'il s'agisse d'un génome simple ou double brin ([Horowitz 2012](#)). Une fois dans le noyau, le devenir moléculaire de la séquence transgénique, ainsi que sa réplication et sa transcription dépendent essentiellement de la cellule hôte. Comme décrit précédemment pour l'AAV sauvage, la séquence transgénique doit nécessairement être double brin pour fixer l'ARN polymérase cellulaire et amorcer sa transcription, et la réplication du génome simple brin par l'ADN polymérase cellulaire est un processus peu efficace en l'absence des protéines Rep et d'un virus auxiliaire, ce qui explique la cinétique d'expression plus rapide des vecteurs scAAV ([Wang 2003](#)). Dans le noyau, en l'absence d'expression de Rep78 et Rep68 l'AAV recombinant s'intègre très peu fréquemment dans le génome de l'hôte et de façon non site-spécifique ([Miller 2005](#)). Grâce à des techniques de LAM-PCR et de séquençage haut débit, ces événements rares d'intégration ont pu être observés et leur fréquence estimée entre 10^{-4} et 10^{-5} par génome diploïde dans le

muscle et le foie de macaques injectés par voie intraveineuse ou intramusculaire ([Nowrouzi 2012](#)). Bien que probablement en relation avec les cassures double brin ([Gellhaus 2010](#)), le mécanisme d'intégration de l'AAV recombinant n'est pas encore clairement établi ; sa caractérisation serait pertinente notamment d'un point de vue clinique pour éviter des effets secondaires particulièrement sévères liés à l'activation d'oncogènes ([Hacein-Bey 2003](#)). De façon bien plus fréquente, l'AAV recombinant adopte différentes formes de persistance extra-chromosomique, qui peuvent être linéaires ou circulaires, monomériques ou concatémériques, en proportions qui varient en fonction de la quantité de génomes vecteurs, du tissu, de l'espèce et du génotype de l'hôte ([Penaud Budloo 2008](#)). En effet, un génome d'AAV converti en double brin est reconnu par la cellule comme présentant une cassure double brin au niveau des ITR linéarisés. Les facteurs de cette reconnaissance ont été identifiés comme impliqués dans les voies de la réparation de l'ADN par recombinaison ([Choi 2006](#)). Des facteurs de recombinaison non homologues seraient à l'origine de la circularisation des génomes viraux, ou recombinaison intramoléculaire, pour former des monomères d'AAV double brin circulaires, et la recombinaison homologue pour la concatémérisation, ou recombinaison intermoléculaire, c'est-à-dire l'association de plusieurs molécules d'AAV pour former des polymères ([Duan 2003](#)). Enfin, il a été montré que ces formes épisomales de l'AAV pouvaient être associées à des histones de l'hôte pour former des nucléosomes et une structure chromatinienne ([Penaud Budloo 2008](#)). Ce type d'interaction vecteur/hôte peut avoir des conséquences sur le niveau d'expression du transgène, en particulier par le biais de mécanismes de régulation épigénétique ([Léger 2011](#)).

1.2.1.2 Production d'AAV recombinant

L'efficacité de transduction du vecteur, le niveau d'expression du transgène et l'innocuité clinique de l'AAV recombinant dépendent également du procédé de production. Cette production est réalisée à partir d'un plasmide « vecteur » dans lequel a été clonée la cassette transgénique, flanquée des ITR et contenant classiquement, c'est-à-dire lorsque l'objectif du transfert de gène est l'expression d'une protéine, un promoteur, une séquence codante et une séquence de poly-adénylation. La production des particules d'AAV proprement dite est le plus souvent réalisée dans des cellules HEK293, exprimant de façon constitutive les protéines E1 de l'adénovirus de type 5, qui font partie des facteurs viraux auxiliaires nécessaires à la réplication de l'AAV. Ces cellules HEK293 sont transfectées avec le plasmide « vecteur », un deuxième plasmide contenant les gènes *rep* et *cap* dont dépend le sérotype du vecteur (sans

Introduction

les ITR), et un troisième plasmide contenant les fonctions auxiliaires manquantes constituées des gènes E2, E4 et VA RNA de l'adénovirus ([Salveti 1998](#)) (**fig9**). Après extraction, les particules sont purifiées en fonction de leur densité par ultracentrifugation sur un gradient de chlorure de césium ou sur un gradient d'iodixanol, ou bien en fonction de leur charge par chromatographie à échange d'ions (pour revue : [Ayuso 2010](#)), ou encore par chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps ou de peptides. Cette étape de purification est évidemment critique pour les applications *in vivo* puisqu'elle détermine la qualité du produit et la présence de contaminations qui sont susceptibles d'entraîner des effets indésirables. Ces contaminations peuvent être d'origine bactérienne : des fragments plasmidiques avec notamment les gènes de résistance aux antibiotiques ([Chadeuf 2005](#)), d'origine humaine : des protéines ou des fragments d'ADN des cellules HEK293 peuvent être encapsidés ou co-purifiés avec les particules ([Ye 2011](#)), ou bien d'origine virale : des séquences auxiliaires peuvent être co-purifiées avec les particules produites ou être encapsidées, notamment les séquences *rep* et *cap* de l'AAV, avec le risque de formation de particules compétentes pour la réplication ([Nony 2004](#), [Ye 2011](#)). Ainsi, un lot de vecteur peut être contaminé par différentes espèces moléculaires et peut contenir une population de particules hétérogènes difficiles à caractériser de façon exhaustive (**fig9**). Enfin, pour un vecteur destiné à une application clinique chez l'homme, il est nécessaire d'utiliser des techniques et des produits bien caractérisés et répondant à des normes, notamment la norme BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) ou GMP (*Good Manufacturing Practice*) ([Allay 2011](#)).

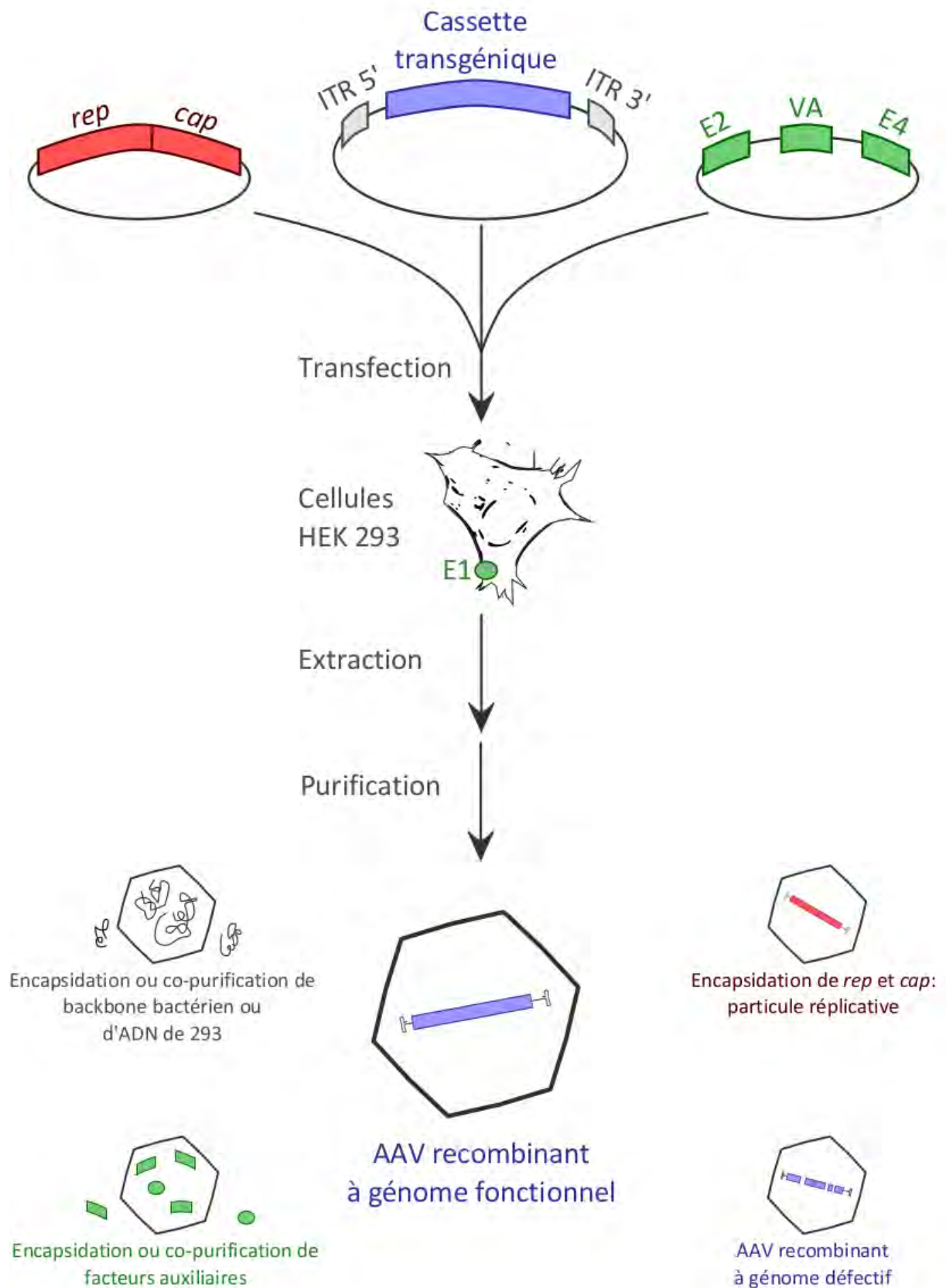


Fig.9) Production d'AAV recombinant par tri-transfection et contaminations possibles dans le lot purifié.

Introduction

Le lot de vecteur est ensuite titré pour quantifier le nombre de génomes viraux (vg), soit par dot-blot avec une sonde spécifique du transgène, soit par qPCR, et le nombre de particules infectieuses (pi), notamment à l'aide d'un test RCA, pour *replication center assay*, réalisé sur culture cellulaire. Le titre obtenu varie bien sûr selon les méthodes de production et de purification, mais également selon les sérotypes d'AAV. Pour des sérotypes qui sont produits efficacement comme le 8 ou le 9, le titre est d'environ 10^{12} vg pour 10^8 cellules, soit une quantité maximale de vecteur de $4 \cdot 10^{13}$ vg après purification, ce qui correspond au nombre maximum de cellules raisonnablement manipulables dans un laboratoire de recherche. Il s'agit d'un inconvénient majeur pour une application à des modèles gros animal ou à l'homme pour des tests précliniques ou cliniques, c'est pourquoi il est nécessaire de modifier profondément le procédé de production. Actuellement, le procédé permettant d'obtenir les plus forts titres d'AAV repose sur l'utilisation de baculovirus. En effet, une des étapes limitantes de la production en cellules HEK293 est la transfection, qui n'est efficace que dans un volume de culture limité. Si un adénovirus peut être utilisé efficacement pour apporter les fonctions auxiliaires, il est en revanche peu désirable que des particules adénovirales intactes se retrouvent avec le produit AAV final, ce qui risquerait de mener après l'administration chez l'animal ou chez l'homme à la formation de particules d'AAV sauvages et à des infections adénovirales provoquant de fortes inflammations. Avec un baculovirus recombinant pour apporter *rep*, *cap* et les fonctions auxiliaires, le risque est plus faible puisqu'il s'agit d'un virus spécifique d'insectes et que, s'il est capable d'infecter les cellules de mammifères, il ne peut en revanche pas s'y répliquer. De plus, l'utilisation de cellules d'insecte Sf9, qui poussent en suspension, permet des productions en bioréacteurs et l'utilisation de baculovirus recombinants permet d'obtenir des titres supérieurs à 10^{15} vg pour un réacteur de 50 L ([Galibert 2011](#)). Cette échelle de production est essentielle pour les applications cliniques ou précliniques utilisant des modèles gros animaux, pour lesquels des doses élevées de vecteur peuvent être nécessaires afin de pouvoir comparer à ce qui est réalisé chez les rongeurs, une fois rapporté au poids (vg/kg).

1.2.1.3 Utilisation d'AAV *in vivo*

L'efficacité d'une stratégie de transfert de gène *in vivo* à l'aide d'un vecteur AAV dépend en partie du sérotype d'AAV utilisé. En effet, selon la population de cellules dans lesquelles le transgène doit s'exprimer, un sérotype peut être plus efficace qu'un autre si son récepteur y est plus souvent représenté ([Michelfelder 2009](#)). Par conséquent, des modifications ciblées de

Introduction

la capside peuvent également être intéressantes pour accentuer le tropisme d'un vecteur AAV. Dans le cas de l'AAV2, il a été montré que la modification du motif HSPG de liaison à son récepteur permet d'augmenter l'affinité du vecteur pour les myocytes tout en diminuant son affinité pour les hépatocytes lorsqu'il est injecté en systémique chez la souris ([Lee 2012](#)).

En plus du sérotype d'AAV, le type d'injection détermine la manière dont le vecteur peut atteindre sa cible. L'injection peut être réalisée directement dans l'organe cible de façon locale. C'est le cas pour les applications aux pathologies de la rétine, pour lesquelles l'AAV injecté directement en sous-rétinien est particulièrement efficace ([Weber 2003](#)). Néanmoins, certains organes ne sont pas directement accessibles, c'est le cas par exemple des bronches qui nécessitent une nébulisation du vecteur pour qu'il soit délivré en intranasal ([Beckett 2012](#)). De plus, si des injections locales sont efficaces, il peut être nécessaire selon le contexte pathologique d'obtenir une transduction plus globale de plusieurs organes à la fois. Concernant par exemple la transduction du muscle squelettique, les injections intramusculaires sont efficaces pour l'expression du transgène, voire pour la correction phénotypique du muscle ciblé, comme cela a été montré dans un modèle de souris atteint de myopathie tubulaire ([Buj-Bello 2008](#)). Toutefois, pour appliquer une telle stratégie à tous les muscles du corps, une injection plus globale doit être envisagée, comme une injection intraveineuse qui permet d'obtenir chez des chiens nouveau-nés une transduction musculaire robuste au niveau de l'ensemble du corps ([Yue 2008](#)). L'inconvénient de ce type d'injection systémique est qu'une partie du vecteur se retrouve piégée dans des organes non ciblés, notamment dans le foie ([Forsayeth 2011](#)), ce qui peut être à l'origine d'une toxicité ou d'une réaction immune susceptible de compromettre l'expression à long terme du transgène ([Le Guiner 2011](#)).

Le transfert de gènes dans le SNC par injections de vecteurs AAV est généralement utilisé soit dans le cadre d'essais thérapeutiques précliniques de pathologies neurologiques ou de traumatismes du tissu nerveux, soit au contraire pour créer des modèles animaux induits de ces maladies et pour en étudier la pathogénèse (pour revue [Ruitenbergh 2002](#), [Bockstael 2011](#)). Dans le cadre des essais précliniques, la stratégie de transfert de gène est évidemment déterminée par le contexte pathologique, la cible cellulaire au sein du SNC et le transgène thérapeutique. Néanmoins, la nature et l'efficacité de ce transfert au sein du tissu nerveux dépendent aussi fortement du sérotype d'AAV choisi et du mode d'administration du vecteur. Ces facteurs sont discutés dans les chapitres suivants, organisés en fonction du mode

d'administration du vecteur dans le SNC, en trois grandes stratégies : les injections intracérébrales, les injections intramusculaires ou systémiques, et les injections dans le LCS.

Les injections directes dans la moelle (c'est-à-dire intraspinales) ne feront pas l'objet d'un chapitre puisque ces stratégies sont difficilement applicables à l'homme car trop invasives. Toutefois, ce type d'injection peut être utilisé dans le cadre d'une lésion de la moelle ou des nerfs ([Eaton 2002](#), [Blits 2003](#)), ou encore, à un niveau expérimental chez les rongeurs, pour comparer l'efficacité de transduction de différents sérotypes d'AAV ([Snyder 2011](#)).

I.2.3 Transfert de gène dans le SNC par injection intracérébrale de vecteurs AAV

I.2.3.1 Les différentes structures cérébrales ciblées et leurs applications cliniques

Pour traiter une pathologie neurodégénérative ou soigner un traumatisme du tissu nerveux, les injections intracérébrales (IC) d'AAV présentent l'avantage de cibler et de transduire directement la structure affectée, ou indirectement *via* un autre territoire du tissu nerveux relié fonctionnellement à cette dernière. En effet, l'injection IC est généralement réalisée dans une structure cérébrale précise, après craniotomie, selon des coordonnées stéréotaxiques établies dans de nombreuses espèces ([Franklin 1997](#), [Paxinos 1986](#), [Markowitsch 1977](#), [Palazzi 2011](#), [Burman 2009](#), [Paxinos 2008](#)), ainsi que chez l'homme ([Mai 1997](#)).

Noyaux gris centraux

Les noyaux gris centraux, c'est-à-dire le striatum, le pallidum, le noyau sous-thalamique et la substance noire, interconnectés au sein d'un réseau complexe responsable de l'initiation du mouvement volontaire (voir section I.1.1 et **fig4b**), ont fait parties des premières structures cérébrales ciblées avec un AAV au cours des stratégies d'injections IC. En effet, les noyaux gris centraux sont impliqués notamment dans la maladie de Parkinson, la deuxième pathologie neurodégénérative la plus fréquente chez l'homme, qui est caractérisée par la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire. Ainsi, la première injection IC d'AAV chez l'animal a consisté en une administration intrastriatale d'AAV2 recombinant pour la tyrosine hydroxylase humaine, une enzyme impliquée dans la synthèse de dopamine.

Introduction

Cette stratégie a été appliquée à des rats préalablement traités avec de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), une toxine induisant la perte des neurones dopaminergiques par stress oxydatif, spécifiquement au niveau de la substance noire *via* le mécanisme de capture de la dopamine ([Hanrott 2006](#)). Les injections intrastriales d'AAV2 ont abouti à une expression de la tyrosine hydroxylase dans les neurones du striatum, associée à une amélioration phénotypique des animaux traités ([Kaplitt 1994](#)).

Une approche similaire a été utilisée, peu de temps après, chez une souris modèle de mucopolysaccharidose de type VII (MPSVII), une maladie de surcharge lysosomale due à un défaut enzymatique responsable de l'accumulation de catabolites dans les lysosomes ([Skorupa 1999](#), [Bosch 2000](#)). L'injection d'AAV2 recombinant pour l'enzyme manquante, la β -glucuronidase, dans le striatum des souris MPSVII a mené à une réduction nette des lésions neurologiques de la maladie dans un vaste territoire du cerveau, ce qui suggère que, dans le cadre des maladies de surcharge, l'enzyme lysosomale peut être exprimée à partir d'un site d'injection unique, disséminer dans le cerveau et être recaptée par les neurones à distance du site d'injection.

Le profil de transduction de vecteurs AAV dans le SNC s'est néanmoins révélé dépendant à la fois du site d'injection et du sérotype utilisé ([McCown 1996](#), [Tenenbaum 2000](#), et pour revue [Tenenbaum 2004](#)). Quelques études ont tenté de comparer l'efficacité de transduction neuronale de différents sérotypes d'AAV après injection dans le striatum de souris et ont ainsi montré que :

- un AAV1 recombinant pour la GFP injecté à une dose de $5 \cdot 10^8$ vg dans le striatum mène à une plus forte dispersion du signal GFP dans cette structure cérébrale et à une plus forte expression de la protéine dans les neurones et dans les cellules gliales des noyaux gris centraux, par rapport à un AAV2 injecté dans les mêmes conditions ([Wang 2003](#)),
- après injections dans le striatum et la substance noire, les AAV de sérotypes 1, 5, 7 et 8 transduisent principalement les neurones et présentent, à forte dose (environ 10^{11} vg/kg), une efficacité de transduction supérieure à celle obtenue après injection d'AAV2. En termes d'intensité d'expression, les AAV5 et 7 se sont révélés plus efficaces à faible dose (environ $5 \cdot 10^9$ vg/kg) par rapport à l'AAV8 ([Taymans 2007](#)),
- après injections d'environ 10^{10} vg dans le striatum, le thalamus, l'hippocampe et le cortex, les AAV9 et 10 permettent d'induire la plus forte expression de β -glucuronidase comparé aux sérotypes 7 et 8. De plus, l'AAV9 mène à une expression du transgène dans des sites

Introduction

éloignés de la zone d'injection, probablement par transport axonal rétrograde des particules virales ([Cearley 2005](#)).

De manière concordante avec ces derniers résultats, il a été montré que l'administration intrastriatale d'AAV9 entraîne chez la souris MPSVII une correction de lésions neurologiques plus étendues qu'avec l'AAV2 ([Cearley 2005](#)),

De même, dans le cadre d'un essai préclinique de la maladie de Parkinson, la protection des neurones dopaminergiques chez le rat traité au préalable avec de la 6-OHDA, s'est révélée plus importante après une injection intrastriatale d'AAV9 recombinant pour l'érythropoïétine par rapport à l'administration de vecteur AAV2 ([Xue 2010](#)).

La stratégie d'injection dans les noyaux gris centraux a également été appliquée à une autre maladie de surcharge lysosomale, la leucodystrophie métachromatique (MLD), causée par un défaut en arylsulfatase A (ARSA) et une accumulation de sulfatides dans les neurones et les cellules gliales ([Sevin 2005](#), [Sevin 2006](#)). Pour atteindre les cellules gliales, un AAV5-ARSA a été injecté simultanément dans les noyaux gris centraux et dans la capsule interne de souris ARSA-KO ([Sevin 2005](#), [Sevin 2006](#)), ce qui a abouti à une expression de l'enzyme ARSA à long terme dans de nombreux neurones et astrocytes de l'ensemble du cerveau et du tronc cérébral, associée à une amélioration des performances motrices des souris. Ces résultats ont par la suite été confirmés avec un AAV10-ARSA injecté dans le même contexte chez la souris MLD, après l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie ([Piguet 2012](#)). Comparé aux résultats obtenus avec l'AAV5, l'AAV10 a permis une transduction plus efficace à des temps précoces post-injection, associée à une activité ARSA plus élevée dans les neurones et les oligodendrocytes de l'ensemble du cerveau, et une correction plus rapide de la pathologie.

Des injections IC d'AAV au niveau des noyaux gris centraux ont ensuite été transposées à des modèles gros animaux afin d'en vérifier l'efficacité en termes d'expression du transgène, avant une éventuelle application clinique à l'homme. Ces études ont montré que :

- contrairement aux comparaisons réalisées chez la souris ([Taymans 2007](#)), l'AAV5 n'aboutit à aucune transduction détectable dans le cerveau du chat, tandis que les AAV1 et 2, injectés à une dose de 2.10^{11} vg dans les noyaux gris, le cortex et la matière blanche du cerveau, sont efficaces pour faire exprimer la β -glucuronidase humaine aussi bien dans la matière grise que dans la matière blanche, avec une efficacité plus importante pour l'AAV1 ([Vite 2003](#)),

Introduction

- l'injection de 3.10^{11} vg d'AAV8 dans les noyaux gris et le cortex de primate marmoset (*Callithrix jacchus*) induit l'expression de la GFP dans les neurones de ces structures ([Masamizu 2010](#)),
- l'injection IC de 4.10^{11} ou 2.10^{12} vg d'AAV5, aussi bien dans les noyaux gris centraux que dans la matière blanche, mène chez le macaque (*Macaca fascicularis*) à une forte expression d'enzyme ARSA dans le cerveau ([Colle 2010](#)).

Cette dernière étude a indiqué qu'une stratégie thérapeutique utilisant des injections IC d'AAV dans le but de traiter une maladie neurodégénérative, en l'occurrence la MLD, mise au point initialement dans un modèle rongeur ([Sevin 2005](#), [Sevin 2006](#)), peut potentiellement être applicable à l'homme en termes de tolérance et d'efficacité d'expression du transgène dans les structures cérébrales ciblées ([Colle 2010](#)). Les résultats de ces études vont prochainement mener à un essai clinique de la MLD chez l'homme par injection IC d'AAV ([NCT01801709](#)).

Une telle preuve de concept a également été établie dans un modèle canin spontané de mucopolysaccharidose de type I ([Ciron 2006](#)), une maladie de surcharge lysosomale caractérisée par un défaut en enzyme lysosomale α -L-iduronidase (IDUA). Chez des chiens MPSI âgés d'environ 3 mois et présentant déjà les premiers signes cliniques de la MPSI, des injections de 5.10^{11} vg d'AAV5-IDUA au niveau du putamen et de la matière blanche du centre ovale ont abouti à une large dispersion du génome viral dans le cerveau et à une expression étendue d>IDUA associée à une réduction des lésions tissulaires inflammatoires caractéristiques de la pathologie MPSI ([Ciron 2006](#)). La stratégie a par la suite été testée chez le macaque avec des injections dans le putamen et la capsule interne de 10^{10} vg d'AAV1, 2 ou 5, ce qui a abouti à une expression d>IDUA au niveau des sites d'injection et à une diffusion homogène de l'enzyme dans le cerveau pour les trois sérotypes, avec toutefois un plus grand nombre de copies de vecteurs dans les structures transduites pour les AAV1 et 5 ([Ciron 2009](#)).

Noyaux cérébelleux profonds

Les noyaux cérébelleux profonds constituent une autre structure intéressante à cibler par injection IC d'AAV du fait de leur connexion axonale non seulement avec le cortex cérébelleux, mais aussi avec le tronc cérébral et la moelle épinière ([Matsushita 1997](#), [Matsushita 1999](#)). Cette voie a initialement été explorée chez la souris pour transduire les cellules de Purkinje avec un AAV2 ([Kaemmerer 2000](#)). L'approche a ensuite été utilisée dans

Introduction

le cadre de la maladie de Niemann-Pick de type A (NPA), une maladie de surcharge lysosomale causée par une déficience en sphingomyélinase acide (ASM) et une accumulation de sphingomyéline dans les lysosomes. Parallèlement à des injections d'AAV2 dans l'hippocampe ([Passini 2005](#), voir [section suivante](#)), des AAV de sérotype 1, 2, 5, 7 et 8 recombinants pour l'ASM humaine ont été injectés dans les noyaux cérébelleux profonds à une dose de 2.10^{10} vg chez des souris ASM-KO ([Dodge 2005](#)). Les résultats de cette étude ont indiqué que l'AAV1 est le sérotype le plus efficace pour restaurer l'expression de l'enzyme, réduire les lésions de surcharge dans l'ensemble du cerveau et améliorer les fonctions motrices.

Plus récemment, cette stratégie d'injections de vecteur AAV dans les noyaux cérébelleux profonds a été utilisée pour traiter une autre maladie de surcharge lysosomale, la gangliosidose GM1 caractérisée par un défaut en β -galactosidase provoquant l'accumulation de gangliosides dans l'ensemble du SNC. Un AAV1 recombinant pour la β -gal a été injecté à une dose de 7.10^{10} vg chez des souris GM1 simultanément dans les noyaux cérébelleux profonds et dans le thalamus, ce qui a abouti à une diffusion plus importante de l'enzyme β -gal, notamment dans le cervelet et la moelle, par rapport à des injections intrathalamiques seules ([Baek 2010](#)).

Ces études montrent que des injections IC dans les noyaux cérébelleux profonds permettent de cibler et de traiter un vaste territoire du SNC, ce qui est particulièrement pertinent pour le traitement des manifestations neurologiques des maladies de surcharge lysosomales. Néanmoins, cette stratégie d'injection, encore jamais testée dans des modèles gros animaux, pourrait s'avérer plus difficilement applicable à l'homme par rapport à des injections intrastriales du fait de la plus faible accessibilité du cervelet chez ce dernier.

Hippocampe

L'hippocampe est une structure du cerveau présentant une forte plasticité et jouant un rôle essentiel dans les processus de mémorisation. L'hippocampe est une des premières structures atteintes dans la maladie d'Alzheimer, une maladie caractérisée par une hyperphosphorylation de la protéine tau associée aux microtubules, et par son accumulation en enchevêtrements filamenteux dans les neurones cholinergiques (pour revue [Kosik 1990](#)), et par la formation de plaques extracellulaires de dépôts de peptide β -amyloïde (pour revue [Hardy 2002](#)). Enfin, l'hippocampe est également connu pour être impliqué dans l'initiation de

Introduction

crises d'hyperactivité neuronale, à l'origine des crises d'épilepsie ([Schwartzkroin 1994](#)). Ces données expliquent qu'un certain nombre d'équipes ont testé des injections d'AAV dans l'hippocampe dans le cadre de la lutte contre la maladie d'Alzheimer ou pour réduire les lésions consécutives aux crises d'épilepsie.

Chez les rongeurs, plusieurs sérotypes d'AAV ont été testés par injections IC au niveau de l'hippocampe :

- Chez la souris, à une dose de 10^9 vg, les AAV7 et 8 ont mené de façon comparable à une forte expression de GFP dans l'hippocampe, avec quelques structures distales ciblées suggérant un transport rétrograde des particules virales à partir du site d'injection ([Taymans 2007](#)).
- Chez le rat, à une dose de 7.10^9 vg, l'AAV8 est plus efficace que les AAV1, 2 et 5 en termes d'intensité d'expression de GFP, de volume d'hippocampe transduit et de diffusion aux autres structures ([Klein 2006](#)).
- Toujours chez le rat, les AAV9 et 10 injectés à une dose de 10^{11} vg ont abouti à une expression de GFP plus importante que pour les AAV8 et 43, avec une diffusion plus importante pour l'AAV9, probablement due selon les auteurs à un transport rétrograde ([Klein 2008](#)).

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, des injections au niveau de l'hippocampe d'AAV codants pour un anticorps anti-peptide β amyloïde chez des souris atteintes de la maladie ont montré :

- une diminution des dépôts amyloïde à long terme avec un AAV2 injecté à une dose de 2.10^9 vg ([Fukuchi 2006](#)),
- une même réduction avec un AAV1 injecté à une dose de 10^9 vg, associée à une diminution de la quantité de protéines tau insolubles et une amélioration de la mémoire spatiale des souris traitées ([Ryan 2010](#)),
- une réduction des dépôts et une régression de la pathologie, avant et après l'âge de formation des plaques, avec 10^9 vg d'AAV5 ([Hudry 2010](#)).

Une autre stratégie utilisée pour lutter contre la neurodégénérescence au sein de l'hippocampe a consisté à apporter chez le rat un AAV2 recombinant pour le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), un facteur angiogénique ayant également des propriétés neurotrophiques ([During 2006](#)), ou un AAV2 recombinant pour une protéine kinase

Introduction

calmoduline-dépendante ayant une implication connue dans la plasticité neuronale ([Poulsen 2007](#)). Ces deux études ont conduit à une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémoire des rats traités, évaluées à l'aide du labyrinthe aquatique de Morris en mesurant la vitesse à laquelle les animaux atteignent une plateforme immergée.

Des injections dans l'hippocampe de rats ont également été réalisées dans le cadre du traitement de l'épilepsie, en utilisant des vecteurs AAV1 ou AAV2 recombinants pour le neuropeptide Y ([Richichi 2004](#), [Noè 2008](#), [Noè 2010](#)), ou un vecteur AAV2 recombinant pour la galanine ([Lin 2003](#)), deux peptides inhibant physiologiquement les signaux excitateurs du cerveau. Ces études ont montré, d'une part que des injections d'AAV au niveau de l'hippocampe permettent une expression suffisante de ces peptides pour réduire nettement la fréquence et la vitesse d'apparitions de crises provoquées artificiellement par de l'acide kaïnique ou par stimulation électrique, et d'autre part que l'AAV1 aboutit à nouveau à une transduction plus étendue que l'AAV2 dans l'hippocampe.

Afin de transposer ces résultats concernant le traitement de l'épilepsie à l'homme, la stratégie d'injection IC au niveau de l'hippocampe a été appliquée au macaque rhésus (*Macaca mulatta*) avec environ 2.10^{10} vg d'AAV2 recombinant pour la GFP, et a montré une expression robuste du transgène dans l'hippocampe, notamment au niveau des neurones pyramidaux, avec toutefois une forte hétérogénéité et des fuites de vecteurs importantes, en particulier dans le LCS des ventricules ([Leung 2011](#)).

Cortex cérébral

Le cortex cérébral est constitué des corps cellulaires des neurones supérieurs organisés en six couches différentes, avec depuis la surface :

- la couche 1 composée essentiellement de dendrites et d'axones,
- la couche 2 avec des neurones pyramidaux de petite taille recevant des connexions internes du cortex,
- la couche 3 avec des neurones pyramidaux de taille moyenne émettant des connexions internes au cortex,
- la couche 4 contenant les noyaux des neurones recevant des connexions du thalamus et de l'hémisphère controlatéral,
- la couche 5 avec les neurones pyramidaux de grande taille connectés aux MN de la moelle,
- et la couche 6, polymorphique, envoyant des connexions au thalamus.

Introduction

L'administration intracorticale de vecteurs AAV peut avoir des répercussions cliniques dans un certain nombre de pathologies neurodégénératives touchant les neurones corticaux, comme les maladies de surcharge lysosomale ou le syndrome de Rett. Comme pour les autres structures cérébrales ciblées, l'étendue et le niveau d'expression du transgène semble dépendants du sérotype utilisé. Ainsi, il a été montré que des injections IC au niveau :

- du cortex visuel de souris aboutit à une transduction de neurones et d'astrocytes pour les sérotypes double brin 1, 2, 6, 7, 8 et 9 dès 2 jours post-injection, ainsi qu'une transduction des cellules gliales plus efficace pour les vecteurs scAAV2 et 9 ([Lowery 2009](#)),
- du cortex visuel de marmosets et de macaques mène à une transduction essentiellement neuronale avec des AAV8 et 9, avec un transport rétrograde au thalamus ([Masamizu 2011](#)),
- du cortex sensorimoteur de rats conduit à une efficacité de transduction neuronale plus importante pour l'AAV1 par rapport à l'AAV5, les AAV3 et 4 présentant une faible transduction, et les AAV2, 6 et 8 une transduction moyenne, avec un faible marquage des astrocytes pour les sérotypes 1, 2, 5, 6 et 8 ([Hutson 2012](#)).

Les injections IC au niveau du cortex ont été appliquées à des modèles de lésions traumatiques. Un AAV2 recombinant pour une protéine à doigt de zinc activant la transcription du VEGF administré chez un rat présentant des lésions cérébrales induites par percussion de fluide, c'est-à-dire par surpression d'un liquide au contact de la dure-mère, a permis d'améliorer la récupération fonctionnelle post-lésionnelle ainsi que le diamètre des capillaires sanguins, probablement par une action locale du VEGF à la fois neuroprotectrice et angiogénique ([Siddiq 2012](#)). La même approche a été utilisée chez une souris présentant une occlusion d'une artère cérébrale, avec un AAV2 recombinant pour l'adiponectine, une cytokine jouant un rôle dans les ischémies grâce à effets anti-athérosclérose et anti-inflammatoire, ce qui a mené à une amélioration significative des fonctions neurologiques et à une augmentation du nombre de capillaires ([Shen 2013](#)).

Des injections intracorticales ont aussi été réalisées chez des souris nouveau-nées atteintes du syndrome de Rett, une maladie génétique caractérisée par un défaut en protéine liée aux CpG méthylés 2 (MECP2), et se traduisant notamment par la disparition des mouvements coordonnés de la main ([Gadalla 2013](#)). L'apport de la protéine MECP2 dans l'ensemble du cerveau de ces souris MECP2-KO avec un AAV9 administré dans le cortex cérébral en période néonatale a conduit à une augmentation de la survie des animaux et à une amélioration significative du phénotype, en particulier des performances motrices.

Une combinaison d'injections intracorticales, subcorticales et intracérébelleuses a également été utilisée dans le cadre de la maladie de surcharge lysosomale NPA (voir section [noyaux cérébelleux profonds](#)) pour une future application clinique. En effet, l'administration par ces voies d'AAV1 recombinant pour l'ASM chez des souris ASM-KO et chez des macaques (*Macaca fascicularis*), a abouti à l'expression de niveaux thérapeutiques d'enzyme dans de nombreuses régions du cerveau permettant ainsi d'envisager une application clinique à l'homme ([Bu 2012](#)).

1.2.3.2 Injection intracérébrale dans le but d'atteindre la moelle

Des injections IC d'AAV peuvent également être réalisées dans le but de transduire les neurones médullaires en ciblant une structure présentant des connexions axonales avec la moelle. Pour que la stratégie soit efficace, il faut que les particules injectées soient transportées le long d'axones regroupés en tractus, depuis la structure injectée jusqu'à la moelle. Selon la structure concernée, il peut s'agir de transport antérograde, c'est-à-dire dans le sens de l'influx nerveux, ou au contraire de transport rétrograde. Ce sens de transport axonal semble dépendre du sérotype d'AAV utilisé. En effet, une étude récente a montré, grâce à des injections IC au niveau des noyaux gris centraux, que l'AAV2 est essentiellement transporté de façon antérograde, tandis que l'AAV6 a un trajet presque exclusivement rétrograde ([Salegio 2013](#)).

Transport antérograde

Les principales structures ciblées pour obtenir un transport antérograde des particules AAV et/ou du transgène thérapeutique vers la moelle sont le cortex, projetant les influx des MN supérieurs à la moelle *via* le tractus corticospinal, et le tronc cérébral qui comprend plusieurs centres reliés à la moelle, dont le noyau rouge qui exerce un contrôle de tonus et de coordination à la moelle *via* le tractus rubrospinal. La matière blanche du cerveau (c'est-à-dire la capsule interne, la corona radiata et le centre ovale) contenant les axones de ces tractus peut également être visée.

La première mise en évidence d'un transport antérograde d'un transgène après injection IC d'AAV a été établie après injections d'AAV2-GFP chez des rats au niveau des noyaux parabrachiaux du tronc cérébral ([Chamberlin 1998](#)). Grâce à un marquage

immunohistochimique à l'hydrochloride de diaminobenzidine, les auteurs ont suivi la GFP dans les axones sur plusieurs mm depuis le site d'injection jusqu'à leurs terminaisons dans le cerveau, le tronc cérébral et la moelle, et ont comparé le remplissage des axones et de leurs terminaisons à d'autres marqueurs de transport intracellulaires comme les dextrans biotinylés ([Wylie 1998](#)). Les auteurs ont également observé des projections particulièrement distantes du site d'injection, avec notamment un marquage au niveau de la moelle sacrée. Le même type d'approche a par ailleurs été récemment utilisé pour étudier les circuits neuronaux impliqués dans l'acquisition de la mémoire ([Xu 2013](#)).

Le transport axonal des particules d'AAV depuis le cerveau jusque dans la moelle a par ailleurs été mis en évidence dans un modèle gros animal, le macaque fascicularis. Des injections dans le putamen et la capsule interne d'AAV1, 2 ou 5 recombinants pour l'enzyme IDUA sous le contrôle du promoteur PGK ont mené à un transport du génome viral à différents étages de la moelle, globalement plus important pour l'AAV5 comparés aux deux autres sérotypes ([Ciron 2009](#)).

Le noyau rouge est une structure du tronc cérébral impliquée dans le contrôle du tonus et de la coordination des muscles. Il reçoit ses afférences du cortex et du cervelet, et est connecté aux MN de la moelle *via* le tractus rubrospinal. De ce fait, les injections IC dans le noyau rouge pourraient s'avérer pertinentes dans le cadre de lésions de la moelle. En effet, le corps cellulaire du neurone présent dans le noyau rouge devient une cible intéressante pour transmettre un facteur neurotrophique au site de la lésion, en cas de section de moelle, par transport antérograde du vecteur et/ou de la protéine thérapeutique.

Ainsi, un AAV2 recombinant pour le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) injecté dans le noyau rouge chez le rat a abouti à une présence importante de BDNF à différents niveaux du tractus rubrospinal, associée à une réduction de l'atrophie des neurones du noyau rouge et de leur axone induite par une axotomie au niveau de C4 ([Ruitenbergh 2004](#)). Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe qui a indiqué la supériorité d'injections IC d'AAV2-BDNF dans le noyau rouge chez le rat sur des injections également dans le noyau rouge de BDNF seul ou apporté par un lentivirus pour obtenir une diminution des lésions de la moelle ([Kwon 2007](#)).

Ces résultats ont ensuite été transposés à des pathologies neurodégénératives pour lesquelles l'expression d'un transgène neuroprotecteur dans le cerveau et la moelle pourrait être bénéfique, comme l'ALS. Une comparaison a été réalisée chez le rat entre des injections

Introduction

d'AAV5 recombinant pour la GFP ou pour le GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*), un autre facteur neurotrophique, dans le cortex moteur ou le noyau rouge ([Foust 2008](#)). Les résultats obtenus ont indiqué une forte transduction neuronale au niveau des sites d'injections, avec des niveaux élevés de GDNF dans les faisceaux du tractus rubrospinal, mais pas dans le tractus corticospinal, ce qui suggère un transport axonal plus efficace du transgène thérapeutique lorsque les vecteurs AAV sont administré dans le noyau rouge par rapport à une injection intracorticale.

A noter, que l'efficacité de transduction des neurones du noyau rouge ou du cortex moteur et de leur faisceau axonal respectifs dépend encore une fois du sérotype d'AAV utilisé, les AAV de sérotypes 1 et 8 se sont révélés plus efficaces que les sérotypes 2, 3, 5 et 6 pour transduire le noyau rouge et le tractus rubrospinal ([Blits 2010](#)) ainsi que le cortex sensorimoteur et le tractus corticospinal ([Hutson 2012](#)) et pourraient de ce fait, être intéressant à tester en essais pré-cliniques chez l'animal dans le cadre de lésions traumatiques ou neurodégénératives de la moelle.

Transport rétrograde

Pour obtenir un transport rétrograde de particules d'AAV vers la moelle, les noyaux cérébelleux profonds représentent la structure préférentiellement ciblée. En effet, ces noyaux reçoivent de nombreuses afférences de la moelle, regroupées dans le tractus spinocérébelleux pour exercer vers le cortex une boucle de rétrocontrôle.

Pour cette raison, l'administration d'AAV1 et d'AAV2 au niveau des noyaux cérébelleux profonds a été choisie pour apporter un facteur neuroprotecteur, l'IGF1 (*insulin growth factor I*), chez la souris SOD1^{G93A} atteinte d'ALS ([Dodge 2008](#)). L'expression d'IGF1 a été retrouvée 20 jours après l'injection IC d'AAV1 comme d'AAV2 dans le cortex cérébelleux, le tronc cérébral et la moelle épinière, ce qui a augmenté modestement la survie des souris, avec une moyenne de 135 j pour les animaux traités IGF1, contre 120 j pour les souris injectées GFP. De manière surprenante, l'analyse histopathologique de la moelle des animaux injectés a révélé une protection des corps cellulaires des MN après les injections d'AAV1-IGF1 et non d'AAV2-IGF1, alors que l'amélioration clinique était équivalente entre les deux sérotypes. L'hypothèse avancée par les auteurs est que l'effet thérapeutique observé n'est pas directement lié à la survie des MN, mais implique d'autres types cellulaires sur lesquels l'IGF1 exerce également un effet. Après les injections d'AAV1 et d'AAV2-IGF1, une

atténuation de l'inflammation et de l'activation de la microglie a été mise en évidence, ce qui pourrait expliquer la modeste augmentation de l'espérance de vie des souris traitées avec les deux vecteurs ([Dodge 2008](#)).

Cette stratégie a été également utilisée chez la souris SMA de type III ($Smn^{-/-}$, $SMN2^{+/-}$). Dans cette étude, les injections d'AAV1-IGF1 dans les noyaux cérébelleux profonds ont mené à une expression d'IGF1 dans la moelle, suffisante pour réduire la perte des MN au point de maintenir une densité neuronale similaire à ce qui est observé chez les animaux sains ([Tsai 2012](#)). Toutefois, cette expression d'IGF1 n'a pas permis d'amélioration phénotypique pour les souris SMA traitées, *i.e.* une absence de correction de la morphologie des jonctions neuro-musculaires et des fibres musculaires associée à des performances motrices comparables à celles des souris non traitées. Ceci suggère que la survie des MN n'est pas suffisante pour assurer leur activité, plus précisément que le maintien du corps cellulaire ne suffit pas à préserver la fonctionnalité de la jonction neuro-musculaire dans le cadre de la SMA.

1.2.3.3 Applications cliniques actuelles

Les résultats issus de ces vingt ans d'études sur des modèles animaux ont permis d'envisager des perspectives cliniques aux stratégies d'injection IC de vecteur AAV pour traiter un certain nombre de maladies neurodégénératives. Ce paragraphe présente les principaux essais cliniques en cours utilisant des injections IC d'AAV chez l'homme.

Maladie de Canavan

La maladie de Canavan est une leukodystrophie caractérisée par des mutations touchant l'aspartoacylase qui conduisent à une accumulation de N-acétyl-aspartate dans les oligodendrocytes, ce qui se traduit par un défaut de myélinisation. Les manifestations cliniques apparaissent très précocement dans les premiers mois de la vie, et mènent au décès de l'enfant en quelques années. La maladie de Canavan a été la première pathologie pour laquelle un protocole de thérapie génique dans le SNC a été approuvé pour la clinique, avec des injections de 10^{12} vg d'AAV2 recombinant pour l'aspartoacylase sous le contrôle du promoteur NSE réalisées en bilatéral dans les lobes frontal, periventriculaire et occipital ([Janson 2002](#)). Malgré l'absence d'amélioration thérapeutique, l'essai clinique a permis de

démontrer la faisabilité et l'innocuité d'injections IC d'AAV2 chez l'homme. De plus, des niveaux modérés d'anticorps dirigés contre la capsid de l'AAV2 ont été retrouvés dans le sérum de 3 patients sur 10, sans augmentation significative de signaux inflammatoires ni de stimulation immunitaire ([McPhee 2006](#)). Aucun anticorps n'a été retrouvé dans le LCS suite aux injections IC.

Lipofuscinose

La céréïde-lipofuscinose juvénile, ou maladie de Batten, est une maladie de surcharge lysosomale à transmission autosomale récessive, caractérisée par des mutations de la tripeptidyl-peptidase lysosomale qui s'accumule dans les neurones et provoque leur mort. Les premiers signes apparaissent entre 2 et 4 ans et concernent des déficits cognitifs, une perte de la vision, des crises épileptiques et un mauvais développement moteur, menant au décès des patients entre 8 et 12 ans. Un essai clinique impliquant 10 enfants ayant reçu 2.10^{12} vg d'AAV2 recombinant pour l'enzyme tripeptidyl-peptidase fonctionnelle sous le contrôle du promoteur CAG dans de nombreuses régions corticales du cerveau ([Crystal 2004](#), [NCT00151216](#)), a montré une réduction significative de la progression de la maladie ([Worgall 2008](#)). Concernant l'innocuité du traitement, des anticorps anti-AAV2 ont été retrouvés dans le sérum de 4 patients, mais de façon très transitoire. Des effets secondaires sérieux ont en revanche été observés, notamment de fortes crises épileptiques. Bien que leur origine n'a pu être déterminée, les auteurs ont indiqué que ces effets n'étaient probablement pas liés à l'injection d'AAV2. Suite à des résultats obtenus avec un AAV10 permettant une meilleure efficacité thérapeutique dans un modèle murin de lipofuscinose ([Sondhi 2007](#)), un nouvel essai clinique a été récemment initié avec 9.10^{11} vg d'AAV10 injecté dans les mêmes régions cérébrales ([NCT00151216](#), [NCT01161576](#), [NCT01414985](#)).

Mucopolysaccharidose de type III

La MPSIII, ou syndrome de Sanfillipo, est causée par un défaut enzymatique menant à une forte réduction de la dégradation d'héparane sulfates qui s'accumulent dans le cerveau pour provoquer entre l'âge de 6 et 10 ans un retard progressif du développement cognitif associé à une hyperactivité et des troubles du comportement et du sommeil. Des injections IC d'AAV5 ou d'AAV2 recombinants pour l'enzyme fonctionnelle chez des jeunes souris MPSIII ont montré une nette réduction des accumulations et des lésions tissulaires ainsi qu'une

restauration d'un comportement normal ([Fu 2002](#), [Cressant 2004](#)). Ces résultats ont également été confirmés dans un modèle canin ([Ellinwood 2011](#)), ce qui a permis d'initier un essai clinique avec un AAV10 ([FR-0049](#)).

Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par des tremblements, une rigidité musculaire et une akinésie, dus à une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire, un centre responsable du contrôle de la motricité. Des injections dans le striatum de 10^7 pi d'AAV2 recombinant pour la décarboxylase AADC permettant la production de dopamine chez des singes verts (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) parkinsoniens, et sous le contrôle du promoteur CMV ont montré des niveaux élevés de dopamine associés à une amélioration comportementale sans les effets secondaires apparaissant habituellement suite aux administrations de fortes doses de dopamine ([During 1998](#)). Ces résultats ont donné suite à un essai clinique ([During 2001](#), [NCT00252850](#), [NCT00229736](#)), qui a révélé une absence d'effets secondaires à la thérapie génique, exceptée une hémorragie intracrânienne consécutive à la chirurgie chez un patient. Le transfert de gène permet des améliorations comportementales parfois modestes mais toujours significatives ([Kaplitt 2007](#), [Eberling 2008](#), [Christine 2009](#)).

Toutefois, bien qu'elle soit efficace, cette stratégie ne permet pas d'empêcher la dégénérescence des neurones dopaminergiques. C'est pourquoi une autre approche a été introduite en clinique chez des patients présentant une forme idiopathique de la maladie de Parkinson ([NCT00252850](#)), basée sur des résultats obtenus chez le rat 6-OHDA avec un AAV2-GDNF injecté dans la substance noire ([Mandel 1999](#)). Cet essai, utilisant un AAV2 recombinant pour un analogue du GDNF sous le contrôle du promoteur CAG injecté à une dose de 10^{11} à 5.10^{11} vg dans le putamen, a montré que l'approche est bien tolérée, sans effet secondaire autre que lié à la chirurgie, et qu'elle aboutit à des améliorations thérapeutiques qui ne peuvent pas être obtenues avec d'autres traitements existants ([Marks 2008](#)).

Maladie d'Alzheimer

Les travaux décrits précédemment ayant étudié des injections d'AAV au niveau de l'hippocampe dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (voir [section précédente](#)), ont également abouti à un essai clinique ([Mandel 2010](#), [NCT00087789](#)). Cet essai est basé sur un

Introduction

AAV2 recombinant pour le NGF (*nerve growth factor*), un facteur neurotrophique de la même famille que le BDNF, administré dans le noyau basal de Meynert, une structure fortement connectée à l'hippocampe ayant un rôle dans le contrôle des cycles veille/sommeil, atteinte dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Ces injections ont montrées une expression de NGF suffisante dans le noyau basal de Meynert pour restaurer le nombre et la fonction des neurones cholinergiques en réduisant les lésions tissulaires ([Bishop 2008](#)).

Leucodystrophie métachromatique

Enfin, basé sur les résultats précédemment décrits concernant la MLD (voir [section précédente](#)), un protocole utilisant un AAV10-CAG-ARSA a été approuvé pour une application clinique. L'essai, incluant des doses de 10^{12} ou 5.10^{12} vg de vecteur administrées dans la matière blanche des deux hémisphères cérébraux, en est actuellement à la phase de recrutement des patients ([NCT01801709](#)).

1.2.3.4 Limites de cette stratégie dans le cadre des maladies du motoneurone

Un certain nombre d'études a montré la capacité des vecteurs AAV à être transportés d'un site d'injection intracérébral jusque dans la moelle par transport antérograde ou rétrograde ([Ruitenber 2004](#), [Dodge 2008](#), [Ciron 2009](#), [Tsai 2012](#)). Cette stratégie pourrait être particulièrement intéressante dans le cadre d'un essai thérapeutique des maladies du MN, puisqu'en théorie, en fonction de la structure cérébrale ciblée, une seule injection d'AAV pourrait permettre d'atteindre tous les niveaux de la moelle. Par ailleurs, l'AAV est un vecteur peu toxique (pour revue [Kaplitt 2006](#)), ce qui a rendu possible plusieurs essais cliniques, dont les résultats ont confirmé l'absence d'effet secondaire lié à des injections IC d'AAV.

Néanmoins, bien que des résultats encourageants aient été obtenus avec des approches IC, ces injections, outre le fait qu'elles soient invasives, présentent une faible efficacité en termes de niveau d'expression du transgène thérapeutique dans la moelle. De plus, malgré une transduction efficace du tractus corticospinal ou du tractus rubrospinal, des injections IC de vecteurs AAV n'ont jamais abouti à une expression directe du facteur neuroprotecteur dans les MN de la moelle ([Foust 2008](#)), probablement parce qu'après avoir été transportés le long des axones, les vecteurs sont peu ou pas capables de passer la synapse pour pénétrer le MN. À noter également que, bien que le génome viral ait pu être détecté à la fois dans la moelle et les

Introduction

nerfs périphériques ([Ciron 2009](#)), une transduction des MN spinaux n'a jamais été décrite dans les études utilisant des injections IC de vecteur AAV9, qui ressort pourtant comme étant le sérotype le plus efficace en termes de diffusion et de tropisme neuronal ([Cearley 2005](#), [Klein 2008](#), [Gadalla 2013](#), [Masamizu 2011](#)).

En conclusion, les nombreux essais d'injections IC de vecteurs AAV chez les animaux ont prouvé :

- que, bien qu'invasive, cette stratégie est efficace pour faire exprimer un transgène au sein d'un nombre important de neurones dans le cerveau avec une étendue de transduction variant en fonction du site d'injection, du sérotype d'AAV et de la dose utilisés,
- qu'en fonction de ces différents paramètres, une variété de profils de transduction peut être obtenue, ce qui constitue un avantage vis-à-vis de l'ensemble très composite des maladies neurologiques,
- que cette stratégie thérapeutique peut être appliquée chez l'animal comme chez l'homme, sans induire d'effets secondaires tout en apportant un bénéfice clinique,
- et enfin qu'il est possible, en ciblant certaines structures cérébrales, de faire exprimer un transgène à la fois dans le cerveau et la moelle épinière, ce qui pourrait s'avérer intéressant à tester dans des modèles gros animaux, pour une application thérapeutique aux maladies neurodégénératives affectant la moelle.

I.2.4 Transfert de gène dans le SNC par injection périphérique de vecteurs

AAV

Les injections en périphérie du SNC représentent une alternative moins invasive aux injections IC ou intraspinales pour cibler la moelle. Les problématiques majeures de ces approches concernent néanmoins le passage de barrières tissulaires pour atteindre le SNC : la jonction neuromusculaire dans le cas des injections intramusculaires, et la barrière hémato-méningée pour les injections vasculaires.

I.2.4.1 Injection intramusculaire et transport axonal de l'AAV

Le muscle squelettique représente une cible intéressante au transfert de gène thérapeutique dans le cadre des maladies neuromusculaires. En effet, des injections intramusculaires (IM) d'AAV mènent à une expression à long terme du transgène dans le muscle ([Xiao 1996](#)). Cette stratégie a par ailleurs été appliquée avec succès chez des modèles rongeurs de myopathies, comme la dystrophie musculaire des ceintures ([Li 1999](#)) ou la dystrophie musculaire de Duchenne ([Wang 2000](#)).

L'injection IM d'AAV pourrait aussi être adaptée aux maladies du MN puisqu'elle permettrait aux particules AAV à la fois de transduire la fibre musculaire et de remonter l'unité motrice depuis la jonction neuromusculaire pour atteindre le MN.

La première mise en évidence de ce transport rétrograde a été établie dans le modèle de souris ALS SOD1^{G93A}. Une injection d'AAV2 recombinant pour le GDNF dans un muscle des quatre membres a abouti à une forte expression de GDNF dans les muscles injectés, ainsi que dans les jonctions neuromusculaires et les MN de la moelle ventrale ([Wang 2002](#)). Suite à ces injections, l'expression du facteur neuroprotecteur a permis, une augmentation significative non seulement du nombre total de MN par rapport aux souris SOD1^{G93A} traitées avec un AAV-LacZ, mais aussi une préservation des axones moteurs et de la fonctionnalité de leurs jonctions neuro-musculaires. Les mêmes résultats ont été obtenus chez la souris SOD1^{G93A} par des injections à l'âge de 60 j dans le quadriceps et les muscles intercostaux d'AAV2 recombinants pour le GDNF ou l'IGF1 ([Kaspar 2003](#)). Toutefois, malgré une neuroprotection significative, l'impact thérapeutique de ces deux travaux reste modeste, avec une survie moyenne des souris injectées GDNF de 114 j contre 101 j pour les animaux non traitée, et 146 j pour les souris injectées IGF1, contre 124 j pour les souris non traitées. Les

auteurs ont suggéré, dans les deux cas, qu'une neuroprotection plus précoce serait cliniquement plus bénéfique.

D'autre part, le transport rétrograde des particules d'AAV le long des nerfs dans ces deux études a été remis en question par une équipe qui a montré que seul le transgène GDNF, facteur sécrété, était exprimé dans les MN après des injections IM de vecteurs AAV2, contrairement au transgène cytoplasmique β GAL ([Lu 2003](#)), suggérant un transport axonal préférentiel des facteurs neuroprotecteurs, comme cela a été par ailleurs montré après injection IM de la protéine GDNF seule ([Leitner 1999](#)), plutôt qu'une remontée rétrograde des particules AAV2 jusqu'aux MN.

La capacité des particules AAV à être transportées le long des axones par un mécanisme de transport rétrograde semble dépendre du sérotype d'AAV utilisé. Une comparaison de l'efficacité des sérotypes 1, 2, 5, 7 et 8 injectés en IM, réalisée chez des souris *Spg7*^{-/-} atteintes de paraplégie spastique héréditaire, caractérisée par une dégénérescence des axones périphériques moteurs et des jonctions neuromusculaires, a montré que l'AAV1 aboutissait à une transduction des sites d'injections plus forte que les AAV2, 5, 7 et 8, et une expression de *Spg7* dans les MN conduisant à une amélioration significative des performances motrices ([Pirozzi 2006](#)). Le facteur *Spg7* étant une protéine intracytoplasmique, l'expression du transgène dans les MN serait dépendante d'un transport rétrograde des particules virales AAV plutôt que d'une captation de la protéine au niveau de la jonction neuromusculaire. Deux autres études ont comparé, chez le rat, différents sérotypes pour leur capacité de transport rétrograde le long des nerfs après injection IM. Dans la première étude, des AAV double brin de sérotypes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 recombinants pour la GFP ont été injectés dans le muscle extenseur du carpe ou dans le nerf sciatique, ce qui a mené :

- après IM à une transduction d'environ 4% des MN CTB-positifs avec le scAAV1, les autres vecteurs donnant des résultats plus faibles ou sous le seuil de détection,
- après injection intranerveuse à une transduction de 7% des MN CTB-positifs avec le scAAV1, les autres vecteurs étant inférieurs à 1%,
- et moins de 1% de MN transduits avec un vecteur AAV1 simple brin injecté dans les mêmes conditions ([Hollis 2007](#)).

Dans la deuxième étude, des AAV1, 2, 3, 4 et 5 recombinants pour un facteur neurotrophique, la neurotrophine 3 (NT3), ont été injectés dans le gastrocnémien, ce qui a

Introduction

mené à une expression importante de NT3 dans la moelle et les DRG, en particulier avec les sérotype 1 et 5 ([Petruska 2010](#)).

Bien que les résultats de ces études comparatives soient hétérogènes, il ressort que l'AAV1 semble particulièrement efficace pour atteindre et transduire les MN spinaux depuis le muscle.

Par ailleurs, l'AAV6, dont la capside présente une identité de séquence de 99.2% avec celle de l'AAV1 ([Wu 2006](#)) s'est révélé également relativement efficace pour être transporté du muscle aux MN chez la souris et y apporter, dans le cadre d'un essai thérapeutique de l'ALS, un ARN interférence dirigée contre la protéine SOD1 humaine mutée ([Towne 2008](#)), avec une réduction de l'ARNm SOD1 d'environ 90% et d'environ 60% pour la protéine SOD1. Cette équipe a testé des injections unilatérales du même vecteur dans le gastrocnémien de singe vert (*Chlorocebus sabaeus*) ([Towne 2010](#)), ce qui a mené à un fort signal GFP au niveau des racines ventrales de la moelle correspondant aux axones moteurs du nerf tibial, ainsi que dans la moelle ventrale avec une transduction des MN. De plus, si une réponse immune caractérisée par des infiltrations de macrophages et de lymphocytes a été observée dans le muscle injecté, aucune inflammation n'a été détectée dans la moelle. A la suite de ces résultats, cette équipe a appliqué cette stratégie de transgert de gène à la souris ALS SOD1^{G93A} avec un vecteur AAV6-shSOD1^{G93A}. Comme il avait été suggéré précédemment que traiter précocement la souris SOD1G93A pouvait avoir un impact clinique plus important ([Wang 2002](#), [Kaspar 2003](#), voir plus haut), les injections de vecteur AAV6-shSOD1^{G93A} dans le triceps sural ont été réalisées en période néonatale ([Towne 2011](#)). Un fort *knock-down* de SOD1 a été de nouveau retrouvé, aboutissant à une diminution de l'atrophie du muscle injecté ainsi qu'à un maintien du nombre de MN et des jonctions neuromusculaires. En revanche, aucune modification de l'inflammation et des dépôts d'ubiquitine n'a été observée, et les souris SOD1^{G93A} traitées n'ont montré ni amélioration des performances motrices, ni augmentation de leur survie. Les mêmes résultats ayant été obtenus en multipliant les sites d'injection (c'est-à-dire dans les muscles des quatre membres, de la face et du thorax ainsi que dans la cavité thoracique), les auteurs ont proposé deux hypothèses pour expliquer ces résultats :

- 1) la protection des MN spinaux n'est pas suffisante pour traiter les symptômes de l'ALS, et d'autres types cellulaires devraient être ciblés pour obtenir une diminution des effets pathologiques,

2) la transduction neuronale de l'AAV6 injecté en IM ne serait pas suffisamment efficace pour être appliquée à un corps entier, et un plus grand nombre de MN transduits serait nécessaire pour obtenir un bénéfice thérapeutique.

Dans le cadre de la SMA, un autre sérotype d'AAV : l'AAV9 codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur PGK, administré en IM dans le gastrocnémien de souris SMNΔ7 adulte ou nouveau-né, semble capable de cibler à la fois un grand nombre de MN tout le long de la moelle et également des cellules non-neuronales comme les astrocytes ([Benkhelifa-Ziyyat 2013](#)) . La GFP a également été retrouvée dans des myocytes du gastrocnémien controlatéral, des neurones du cerveau (cervelet, tronc cérébral) et des hépatocytes. Appliquée en bilatéral avec un scAAV9-SMN chez la souris SMNΔ7 nouveau-née, cette stratégie s'est traduite par un impact thérapeutique modeste, avec une survie moyenne des animaux traités de 26 jours, contre 12 jours pour les souris contrôles, et une absence de prise de poids. En revanche, après injection néonatale dans les quatre membres, une plus forte amélioration phénotypique a été observée, avec une survie moyenne de 163 jours et une prise de poids importante, associées à une nette restauration des performances motrices. Une expression plus forte et plus étendue du transgène au niveau de la moelle par rapport aux injections unilatérales explique ce bénéfice thérapeutique plus important. Bien qu'elle utilise une forte dose (10^{11} vg en bilatéral) dans un contexte pathologique différent des travaux précédents et qu'elle ne compare pas différents sérotypes, cette étude suggère que l'AAV9 serait particulièrement efficace pour transduire la moelle et les MN depuis le muscle squelettique.

En conclusion, les injections IM de vecteurs AAV sont parfois capables d'induire un transport rétrograde des particules virales le long des axones des nerfs périphériques et de transférer ainsi un gène au sein d'une petite population de MN. Trois sérotypes d'AAV semblent particulièrement efficaces : l'AAV1, 6 et 9.

1.2.4.2 Injection vasculaire et passage de la barrière hémato-méningée

Par rapport aux injections IM, les injections intraveineuses (IV) présentent l'avantage de pouvoir en théorie délivrer le vecteur AAV à de nombreux organes, par l'intermédiaire d'un geste clinique simple et peu invasif. Toutefois, le SNC est isolé de la circulation sanguine par la barrière hémato-méningée (BHM), constituée d'un assemblage de plusieurs membranes plasmiques (voir [fig2a](#)) qui limitent la pénétration de nombreux virus et substances dans le tissu nerveux depuis les capillaires, y compris les particules d'AAV. En effet, une étude

réalisée chez la souris a montré qu'un AAV2 injecté dans la veine de la queue ne peut pas transduire le cerveau sans un prétraitement avec une solution hypertonique de mannitol permettant de perméabiliser temporairement la BHM ([Fu 2003](#)).

Premiers résultats de transduction des MN à partir d'injections IV de vecteurs AAV sans prétraitement au mannitol

Des injections IV d'un AAV6-shSOD1^{G93A} (voir stratégie IM dans la [section précédente](#)) a été utilisé chez la souris SOD1^{G93A} pour une expression plus étendue dans la moelle que celle obtenue après injection IM du même vecteur ([Towne 2008](#)). Cette stratégie a mené à la transduction de MN sans mannitol dans l'ensemble de la moelle, mais avec une efficacité faible, puisque seuls 3 à 4% des MN étaient ciblés. Par contre, une très forte expression du transgène a été observée dans les muscles squelettiques, le cœur et le foie ainsi que dans les fibres sensibles dorsales de la moelle ([Towne 2009](#)). Ces travaux ont indiqué que des injections IV d'AAV6 permettent de transduire la moelle et les MN de façon étendue, mais à un faible niveau et probablement *via* la transduction des muscles squelettiques et un transport rétrograde, plutôt que par transduction directe du tissu nerveux depuis la circulation sanguine. Un profil similaire a été observé avec un AAV8-GFP chez la souris ([Foust 2008](#)). Une expression de GFP a été obtenue dans les DRG après injections IV néonatales, associée à la présence de la protéine GFP au sein des projections des neurones sensitifs dans la moelle dorsale, avec très peu de MNs ciblés.

La faible efficacité de ces vecteurs AAV6 et 8 pour exprimer un transgène dans les MN de la moelle peut être liée (i) à une faible capacité de transduction des MN par ces sérotypes en relation avec la présence dans les MN des récepteurs et corécepteurs permettant la pénétration intracellulaire des particules AAV, ou (ii) à des difficultés pour atteindre les MN, c'est-à-dire une faible capacité à traverser la BHM.

Comparaison de différents sérotypes d'AAV pour leur capacité à transduire les organes périphériques et le SNC à partir de la circulation sanguine : émergence de l'AAV9

Pour explorer la capacité de différents sérotypes d'AAV à franchir des barrières biologiques et à transduire un certain nombre d'organes à partir de la circulation sanguine, le tropisme général des vecteurs AAV 1 à 9, recombinants pour la luciférase, a été comparé chez

Introduction

la souris adulte après des injections IV et par une technique d'imagerie *in vivo* ([Zincarelli 2008](#)). Cette étude a montré :

- que les différents sérotypes sont répartis en trois groupes en fonction de leur capacité à transduire les organes périphériques à partir de la circulation sanguine : un groupe au tropisme faiblement étendu pour les AAV2, 3, 4 et 5 ; un moyen pour les AAV1, 6 et 8 ; et un tropisme fort pour les AAV7 et 9, pour lesquels la luciférase est exprimée dans l'ensemble du corps des souris à une intensité moyenne plus importante que pour les autres groupes ;
- que les vecteurs présentent deux cinétiques de transduction distinctes : une lente pour les AAV2, 3, 4 et 5 qui induisent une expression maximale de la luciférase au-delà de 100 j post-injection, et une rapide pour les AAV1, 6, 7, 8 et 9 dont l'expression maximale de la luciférase dans la plupart des organes peut être atteinte dès 7 j post-injection ;
- que l'AAV9 présente la plus large distribution (cœur, foie, poumons, muscles squelettiques et cerveau) et les plus hauts niveaux d'expression de la luciférase ;
- que l'AAV9 présente la clairance la moins importante, c'est-à-dire qu'il reste plus longtemps dans la circulation sanguine.

Bien qu'elle ne permette pas de présumer de son efficacité au sein de la moelle, cette étude a indiqué que l'AAV9 est, parmi ces sérotypes testés, celui qui présente la capacité d'expression la plus robuste dans de nombreux organes, y compris dans le cerveau après injection IV

Afin d'explorer plus spécifiquement la capacité de l'AAV9 à atteindre les MN après une injection systémique, notre équipe et une autre ont testé des injections IV de vecteurs AAV9-GFP chez des souris nouveau-nées, qui ne possèdent pas une BHM complètement développée en particulier concernant la couche astrocytaire entourant les vaisseaux sanguins ([Ek 2006](#), [Saunders 2009](#)), et adultes qui présentent une BHM totalement mature ([Duque 2009](#), [Foust 2009](#)). Ces travaux ont montré une forte transduction des MN à différents étages de la moelle, pour les nouveau-nées avec environ 60% des MN GFP-positifs en région lombaire, et pour les adultes avec jusqu'à 30% de MN transduits. Les mêmes résultats ont été obtenus chez le chat nouveau-né, avec 40% de MN GFP-positifs en régions cervicale et lombaire, et chez l'adulte avec environ 15% de MN transduits ([Duque 2009](#)). Ces données indiquent que, comparé à l'AAV6 qui a pourtant un fort tropisme neuronal et bénéficie d'un transport axonal efficace ([Towne 2010](#)), l'AAV9 atteint les MN avec une plus grande efficacité, ce qui suggère que ce vecteur est probablement capable de franchir plus facilement la BHM et d'atteindre

directement le corps cellulaire des MN à partir de la circulation sanguine, chez les nouveau-nés comme chez les adultes. Ceci a été confirmé par deux études de notre équipe. Premièrement, dans une étude non publiée, nous avons comparé, après injection IV chez le chat adulte, l'efficacité de transduction médullaire de l'AAV9 à celle de deux autres sérotypes présentant un fort tropisme neuronal : l'AAV5 ([Sevin 2005](#), [Ciron 2006](#), [Taymans 2007](#)) et l'AAV8 ([Klein 2006](#), [Blits 2010](#), [Masamizu 2010](#), [Hutson 2012](#)). Les résultats de ces injections ont indiqué que par rapport à l'AAV9 double brin qui a permis une transduction d'un grand nombre de MN tout le long de la moelle, aucune expression du transgène n'a été détectée dans la moelle avec l'AAV5, et l'AAV8 a abouti à une transduction uniquement des tractus sensitifs de la moelle dorsale. D'autre part, des injections IV d'AAV9 chez des rats, des chats et des chiens, nouveaux-nés et adultes, ont mené dans tous les cas à une transduction significative de la rétine, en particulier de l'épithélium pigmentaire rétinien ([Joussemet 2011](#)). Ces résultats suggèrent ainsi que l'AAV9 double brin est également capable de traverser la barrière hémato-rétinienne qui a une structure et une composition proches de la BHM.

Parallèlement à ces études, la capacité des sérotypes d'AAV simple brin 1, 8, 9 et 10 recombinants pour la GFP pour atteindre spécifiquement le SNC a été testée chez la souris nouveau-née ([Miyake 2011](#)). Cette étude a montré que tous les sérotypes testés sont capables de transduire des neurones au sein du SNC après des injections IV néonatales, néanmoins le niveau d'expression du transgène est nettement plus élevé avec l'AAV9. De nombreux organes périphériques tels que le foie, le cœur et le muscle squelettique ont aussi présenté une forte expression du transgène, quel que soit le vecteur. Cette transduction périphérique avait également été observée chez le chat avec l'AAV9 double brin ([Joussemet 2011](#)).

Application de la stratégie d'administration IV de vecteur AAV9 au modèle primate

Cette stratégie de transfert de gène dans le SNC par administration IV de vecteur AAV9 a été, par la suite, testée chez des primates non humains avant d'envisager une potentielle application à l'homme dans le cadre du traitement des maladies du MN. Une première étude a montré avec un scAAV9 injecté chez un macaque cynomolgus (*Macaca fasciculata*) nouveau-né, une transduction des MN tout le long de la moelle, de façon similaire à ce qui a été observé chez la souris nouveau-née ([Foust 2010](#)). Ces résultats ont été confirmés chez des macaques injectés à différents âges : 1 j, 30 j, 90 j et 3 ans, avec une transduction des MN et une diffusion du vecteur jusqu'au cerveau, et aux organes périphériques ([Bevan 2011](#)).

Influence de l'âge d'injection et de l'espèce sur l'efficacité de transduction des MN de l'AAV9

Néanmoins, l'âge d'injection semble avoir un impact important sur le nombre de MN transduits dans ces modèles primates. En effet, les macaques injectés à l'âge de 3 ans présentent une transduction des MN beaucoup plus faible que les animaux injectés avant l'âge de 90 jours. Des résultats similaires avaient été décrits chez le chat et la souris, indiquant que les injections chez des animaux dont le SNC et la BHM sont matures mènent préférentiellement à une transduction astrocytaire plutôt que neuronale dans le cerveau et la moelle ([Duque 2009](#), [Foust 2009](#)).

Du fait de l'influence majeure de l'âge d'injection sur le niveau de transduction neuronale après une injection IV de vecteur AAV9, deux études se sont intéressées au tropisme neuronal de l'AAV9 après des injections encore plus précoces en période prénatale, c'est-à-dire *in utero*.

La première a été réalisée chez la souris fœtale et nouveau-née et a décrit une efficacité de transduction neuronale plus importante après des injections de vecteur AAV9 réalisées *in utero* par rapport à des injections néonatales, avec plus de 90% de neurones et moins de 10% d'astrocytes transduits *in utero* contre 25% de neurones et 75% d'astrocytes transduits après des injections néonatales ([Rahim 2011](#)).

La deuxième étude a été réalisée *in utero* chez le macaque, et a indiqué des résultats similaires à ceux obtenus chez la souris, avec plus de 80% de neurones et moins de 20% d'astrocytes transduits ([Mattar 2013](#)).

Ces études confirment un tropisme cellulaire différentiel de l'AAV9 en fonction de l'âge d'injection. Les auteurs expliquent ce dernier point par le fait que l'astrogénèse est incomplète *in utero*, tandis qu'au contraire la neurogénèse est particulièrement active à cette période, ce qui pourrait avoir un impact sur l'expression cellulaire des récepteurs/ corécepteurs de l'AAV9 ([Rahim 2011](#)). De même, les récepteurs et corécepteurs de l'AAV9 sur les neurones et les astrocytes pourraient être exprimés différemment entre la période néonatale et la période adulte.

Outre l'âge d'injection, des différences ont également été observées en fonction de l'espèce animale dans laquelle est testé le transfert de gène. Une analyse réalisée en parallèle

Introduction

chez la souris et le macaque adultes a indiqué qu'une dose de 10^{13} vg/kg d'AAV9 injectée en IV chez la souris adulte permet de transduire les neurones et les astrocytes dans l'ensemble du SNC, avec une préférence pour les neurones ([Gray 2011b](#)). En revanche, la même dose appliquée au macaque adulte aboutit à une transduction plus faible du cerveau et des organes périphériques, associée à un ratio de neurones et d'astrocytes positifs déplacé en faveur des astrocytes ; ce qui est confirmé par une autre étude décrivant une transduction préférentiellement des astrocytes dans le cerveau de macaques adultes après injections IV d'AAV9 ([Samaranch 2012](#)).

D'autre part, ces études réalisées chez le primate ont montré une absence complète d'expression du transgène dans les neurones de la moelle en présence d'un faible titre sérique d'anticorps neutralisants dirigés contre la capsid de l'AAV9 avant l'injection IV du vecteur (1 :4) ([Gray 2011b](#)).

Application thérapeutique de la stratégie d'injection systémique de vecteur AAV9 dans le cadre des maladies du MN

L'impact clinique de ces stratégies a par la suite été testé dans le modèle murin sévère SMN Δ 7 par injections IV néonatales d'AAV9 porteur du cDNA SMN, aboutissant à des améliorations thérapeutiques sans précédent par rapport aux souris malades non traitées ayant une survie moyenne de 13 j. Ces résultats ont été décrit par 4 études utilisant l'injection IV de :

- $5 \cdot 10^{11}$ vg de vecteur scAAV9-CAG-SMN, permettant à 6 souris traitées sur 11 de vivre au-delà de 250 j ([Foust 2010](#)) ;
- 10^{11} vg de vecteur scAAV9-CMV-SMN, augmentant la survie moyenne des souris traitées à 70 j, certains animaux vivant au-delà de 190 j ([Valori 2010](#)) ;
- $5 \cdot 10^{10}$ vg de vecteur scAAV9-PGK-SMN, augmentant la survie moyenne des souris traitées à 160 j, certains animaux vivant au-delà de 340 j ([Dominguez 2011](#)) ;
- $2 \cdot 10^{10}$ vg de vecteur scAAV9-CAG-SMN, permettant à 2 souris traitées sur 6 de vivre au-delà de 200 j ([Glascock 2012a](#)).

L'augmentation de la survie des souris traitées a été accompagnée par une amélioration des performances motrices et une prise de poids. En plus des doses différentes, les hétérogénéités des résultats peuvent être expliquées par l'utilisation de cassettes d'expression différentes, incluant des promoteurs distincts (voir section I.2.6 Pistes d'amélioration concernant le

transfert de gène dans le SNC à l'aide de vecteurs AAV). La même stratégie a été appliquée à un modèle de SMA plus sévère, la souris SMN2 qui a une survie moyenne de 7 j ([Glascock 2012b](#)). Toutefois, des injections IV néonatales d'AAV9 à une dose de 2.10^{11} vg n'ont permis qu'une faible augmentation de la survie des animaux traités, avec une moyenne de 10 j et un maximum de 17 j. Pour expliquer ces résultats, les auteurs ont suggéré que la quantité d'AAV9 pénétrant le SNC est insuffisante par voie IV dans ce contexte, une fraction importante de vecteur étant captée en périphérie.

Enfin, des injections IV néonatales d'AAV9 ont été testées chez le rat pour cibler la moelle et étudier la pathogénèse de l'ALS ([Wang 2010b](#)). L'utilisation d'une forte dose, 2.10^{12} vg, d'un AAV9-GFP a conduit à une forte transduction neuronale dans la moelle et le cortex, avec notamment 30 à 80% de MN GFP-positifs, sans morbidité associée. En revanche, une surexpression de la protéine TDP43 humaine, récemment impliquée dans la pathogénie de l'ALS, par injection IV d'AAV9-TDP43, s'est traduite par l'apparition de symptômes proches de ceux observés pour l'ALS : des performances motrices altérées et une mortalité de 50% au bout de 4 semaines post-injection, causées par une atrophie des muscles des membres et une dégénérescence des MN, confirmant le rôle majeur de la protéine dans le processus neurodégénératif.

Cette étude a montré que, outre les potentielles retombées cliniques pour le traitement des maladies du MN, cette stratégie d'administration IV de vecteur AAV9 peut être également appliquée à la création de modèles animaux de maladies neurodégénératives afin d'en étudier les mécanismes physiopathologiques.

1.2.4.3 Limites de ces stratégies dans le cadre des maladies du motoneurone

Les injections d'AAV par voies IM et IV offrent une alternative moins invasive aux injections IC pour cibler indirectement le SNC. En effet, grâce à un transport rétrograde le long des axones moteurs, efficace en particulier pour les AAV1, 6 et 9, et grâce à la capacité plus importante de l'AAV9 à traverser la BHM, ces voies d'administration ont permis d'obtenir des bénéfices thérapeutiques importants dans des modèles rongeurs atteints de formes sévères de maladie du MN. Toutefois, ces deux modes d'injection présentent des faiblesses susceptibles de limiter leurs applications cliniques.

Introduction

La voie IM mène à une transduction efficace des MN mais avec une diffusion le long de la moelle limitée aux racines innervant le muscle injecté. Pour obtenir une transduction plus étendue, plusieurs études ont réalisé des injections multiples dans deux ou quatre membres, voir également dans des muscles respiratoires, ce qui a pour conséquence d'augmenter la charge virale et ainsi le risque de réponse immune ou inflammatoire, comme cela a été décrit chez le chien ([Herzog 2002](#)) et le lapin ([Flotte 2007](#)).

À l'inverse, la voie IV permet une diffusion importante du vecteur mais nécessite des doses plus importantes pour cibler efficacement les MN. En conséquence, la transduction périphérique augmente, avec un risque de toxicité liée à la surexpression du transgène dans des tissus non ciblés, comme cela a été montré avec la GFP dans le foie de souris ([Gray 2011b](#)). Une autre conséquence d'une plus forte présence du vecteur en périphérie et dans la circulation est le risque de transduction de cellules immunocompétentes et donc d'induction de réponse immune contre le transgène ([Wang 2005a](#), [Le Guiner 2011](#), [Nathwani 2011](#)). D'autre part, il a été montré que la transduction de la moelle peut être totalement inhibée par la présence, au moment de l'injection IV, d'anticorps circulants dirigés contre la capsid de l'AAV utilisé ([Gray 2011b](#)).

Pour les injections IM comme pour les injections IV, l'augmentation de la dose de vecteur aboutit à une augmentation de l'expression du transgène moins importante dans la moelle que dans les organes périphériques, comme les muscles squelettiques, le foie, le cœur, ou encore les gonades, avec un risque de transduction de la lignée germinale comme cela a été observé en IM chez le lapin à une dose de 10^{13} vg ([Flotte 2007](#)). Cette expression hors de la moelle peut être acceptable voire nécessaire pour des formes sévères de maladies du MN présentant des lésions périphériques, maladies pour lesquelles le rapport bénéfices/risques est profitable au patient. En revanche, elle est plus difficilement tolérable pour des maladies purement neuronales.

I.2.5 Transfert de gène dans le SNC par injection de vecteurs AAV dans le liquide céphalorachidien

Le liquide cérébro-spinal (LCS) circule entre les méninges dans l'ensemble du SNC (voir [I.1.1.1 Anatomie fonctionnelle de la moelle épinière](#)). L'administration d'AAV dans le LCS est ainsi potentiellement intéressante pour obtenir une diffusion du vecteur à l'ensemble du SNC tout en limitant en théorie sa dispersion en périphérie. Trois modes d'injection dans le LCS peuvent être envisagés : les injections intracérébroventriculaires, c'est-à-dire dans les ventricules latéraux du cerveau, les injections intracisternales dans la grande citerne située en région occipitale, et les injections intrathécales dans le cul de sac dural au niveau de la moelle lombaire.

I.2.5.1 Injection intracérébroventriculaire

Les injections intracérébroventriculaires (ICV) sont réalisées dans les ventricules latéraux du cerveau, en règle générale à l'aide de coordonnées stéréotaxiques établies pour un grand nombre d'espèces animales et chez l'homme ([Markowitsch 1977](#), [Paxinos 1986](#), [Franklin 1997](#), [Mai 1997](#), [Paxinos 2008](#), [Burman 2009](#), [Palazzi 2011](#)). Au sein du SNC, le LCS est produit et circule dans le système ventriculaire composé par les ventricules latéraux au niveau des hémisphères cérébraux, le troisième ventricule à la base de l'encéphale, et le quatrième ventricule dans le tronc cérébral qui se poursuit par le canal de l'épendyme au niveau de la moelle. Le système ventriculaire communique également avec l'espace sub-arachnoïdien situé entre l'arachnoïde et la pie-mère. Les ventricules latéraux sont les ventricules les plus volumineux et les plus riches en plexus choroïdes, des structures formées par des capillaires sanguins fenêtrés tapissés de cellules épendymaires permettant la sécrétion et la circulation du LCS dans le système ventriculaire, du cerveau vers la moelle.

Ainsi, des injections ICV de vecteurs AAV présentent théoriquement l'avantage de cibler à la fois le cerveau et la moelle.

La première étude utilisant des injections ICV de vecteur AAV a été réalisée chez le rat avec un AAV2-LacZ et a montré la faisabilité et l'innocuité d'une telle voie d'administration, avec une absence de toxicité liée au virus ([Rosenfeld 1997](#)). Toutefois, l'expression de β -Gal n'a été observée qu'au niveau des cellules épendymaires, et pas dans le parenchyme cérébral. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris adulte. En effet, contrairement à des

Introduction

injections IC d'AAV2-LacZ ([Lo 1999](#)), des injections ICV d'AAV2, 4 ou 5 ont mené à une transduction restreinte aux cellules épendymaires, avec une efficacité plus importante en termes du nombre de cellules transduites pour les AAV4 et 5 ([Lo 1999](#), [Davidson 2000](#)). Ces études indiquent que les vecteurs AAV2, 4 et 5 injectés en ICV ne sont pas capables de diffuser dans l'ensemble du cerveau adulte, probablement à cause de leur forte affinité pour les cellules épendymaires à l'interface du LCS et du tissu nerveux.

En revanche, chez la souris nouveau-née, l'utilisation d'un AAV2 recombinant pour la β -glucuronidase injecté par voie ICV a abouti à une transduction neuronale dans de nombreuses régions du cerveau, maintenue au cours du temps jusqu'à 12 mois post-injection ([Passini 2001](#)). Le profil d'expression obtenu, en particulier dans les couches superficielles du parenchyme cérébral et au niveau des méninges, suggère que les particules d'AAV ont diffusé dans le cerveau depuis l'espace subarachnoïdien. La même équipe a ensuite utilisé des AAV1 et 5 dans le même contexte, et a indiqué que l'AAV5 ne permet qu'une transduction limitée du cerveau chez la souris nouveau-née. L'AAV1 a en revanche été capable de transduire un plus grand nombre de neurones dans le parenchyme cérébral comparé à l'AAV2 ([Passini 2003](#)). Appliquée à la souris MPSVII, cette stratégie d'injections ICV utilisant un AAV1 recombinant pour la β -glucuronidase a conduit à une correction des lésions de surcharge dans un grand nombre de structures cérébrales, et ceci pendant au moins 1 an après l'injection ([Passini 2003](#)). Bien que l'AAV5 ait été montré peu efficace pour transduire les neurones du cerveau après injection ICV, une telle administration d'AAV5 recombinant pour une sulfamidase chez des souris MPSIII a néanmoins abouti à une correction de l'inflammation et des accumulations lysosomales dans le cerveau, associées à une amélioration des fonctions motrices et cognitives, probablement par un phénomène de sécrétion/recaptation de l'enzyme à partir des cellules épendymaires et des quelques neurones transduits ([Fraldi 2007](#)).

Cette stratégie a également été utilisée dans le cadre d'essais thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer chez la souris, avec des injections ICV néonatales d'AAV2 recombinant pour un fragment d'anticorps dirigé contre le peptide β -amyloïde qui ont mené à une diminution de 25 à 50% des dépôts de plaques A β ([Levites 2006](#)). Néanmoins, il a aussi été montré que cette stratégie entraînait une forte augmentation de peptide β -amyloïde dans les capillaires cérébraux, responsable de l'apparition d'hémorragies cérébrales ([Kou 2011](#)).

Ces travaux ont ainsi indiqué que des injections de vecteurs AAV1, 2 et 5 étaient capables de transduire le cerveau, mais seulement en période néonatale et aucune observation dans la moelle n'a été réalisée pour déterminer la transduction de MN.

Introduction

La première application de cette stratégie au transfert de gène dans la moelle pour traiter les maladies du MN est récente. Dans cette étude, un AAV8 porteur du cDNA SMN humain a été injecté simultanément dans les ventricules latéraux et dans la moelle lombaire de souris SMN Δ 7 nouveau-nées ([Passini 2010](#)). Deux vecteurs ont été utilisés : un ssAAV8-CAG-SMN à une dose de 5.10^{10} vg et un scAAV8-GUSB-SMN à 2.10^{10} vg. Le premier a abouti à une transduction de 35 à 40% des MN et à une augmentation significative du niveau de protéine SMN dans la moelle, associée à une diminution de la dégénérescence des MN et de l'atrophie des muscles, un maintien des jonctions neuromusculaires et une augmentation de la survie moyenne des souris à 50 j (contre 13 j pour les non traitées). Cependant, les souris traitées ont toutes développé, avant l'âge de 70 j, une nécrose sévère des membres postérieurs dont la cause n'a pas été déterminée. Le deuxième vecteur s'est révélé plus efficace, à la fois en termes de transduction des MN avec environ 65% des MN transduits et cliniquement, avec une survie moyenne de 157 j. Les souris traitées avec ce vecteur scAAV8 n'ont pas développé de nécrose, mais ont, en revanche, présenté vers l'âge de 250 j une détresse respiratoire importante, associée à une diminution du nombre de MN dans la moelle thoracique et à une augmentation du nombre de jonctions neuromusculaires anormales au niveau des muscles intercostaux. La dégradation tardive de l'état général des animaux suggère, pour les auteurs, qu'un traitement SMN en périphérie pourrait être requis dans ce modèle sévère de SMA, ce qui est cohérent avec le fait que les souris traitées en IV ne développent pas ces symptômes ([Foust 2010](#), [Dominguez 2011](#)).

Dans une autre étude, des injections ICV ont été réalisées chez la souris SMN Δ 7 nouveau-née avec un AAV9, en parallèle d'injections IV d'AAV9 qui avaient été montrées particulièrement efficaces pour transduire les MN ([Glascocock 2012a](#)). Une dose de 2.10^{10} vg de vecteur scAAV9-CAG-SMN administrée en ICV a permis une augmentation de la survie moyenne des souris à environ 125 j, la moitié des animaux vivant au-delà de 200j. Au contraire, les souris injectées par voie IV ont montré une survie moyenne de 30 j, associée à un gain de poids plus modeste. Pour les auteurs, cette différence est due au fait que l'AAV9 injecté en ICV est probablement capable de quitter le LCS et le SNC de la même façon qu'il traverse la BHM depuis la circulation sanguine après injection IV. De ce fait, les injections ICV permettraient à la fois de subvenir en priorité aux besoins de SMN dans le SNC, mais aussi de fournir aux organes périphériques une quantité de SMN suffisante pour obtenir une correction complète de la pathologie. Cette hypothèse expliquerait par ailleurs la différence avec les résultats obtenus en utilisant un AAV8 en ICV qui ont suggéré l'absence de

traitement des lésions périphériques, puisque ce vecteur aurait une plus faible capacité à traverser la BHM que l'AAV9.

La même équipe a également testé des injections ICV d'AAV9, toujours en parallèle d'injections IV, en période néonatale chez la souris SMN2, un autre modèle plus sévère de SMA ([Glascock 2012b](#)). Les injections ont abouti, dans les deux cas, à une forte expression de SMN dans la moelle à un niveau similaire à ce qui est retrouvé pour les souris saines $Smn^{+/-}$. Toutefois, les améliorations phénotypiques observées suite aux injections ICV ou aux injections IV sont restées modestes comparé aux souris malades non traitées. Ces résultats sont probablement liés au fait qu'un très faible niveau de SMN dans ce modèle murin SMA très sévère peut probablement affecter le développement des souris de manière globale et précoce et que le seul moyen d'obtenir une correction complète des souris SMN2 serait d'intervenir pendant le développement, *in utero*.

1.2.5.2 Injection intracisternale

Les injections intracisternales (ICis) présentent l'avantage par rapport aux injections ICV de ne pas nécessiter de chirurgie au niveau du crâne. En effet, les injections ICis sont réalisées au niveau de la grande citerne, ou citerne cérébellomédullaire, qui est située entre le cervelet et la moelle allongée, et ainsi accessible par une ponction sous-occipitale.

Les premières injections ICis chez la souris avec un vecteur scAAV2-GFP administré à une dose de 2.10^8 vg ont abouti à une transduction étendue du SNC, contrairement à ce qui avait été décrit après des injections IV ([Fu 2003](#)). L'expression de la GFP a été observée dans de nombreuses régions du cerveau, incluant les noyaux gris centraux, le cervelet, le cortex et le tronc cérébral, ainsi que dans la moelle, avec de nombreuses fibres transduites en région cervicale. Un nombre plus important de cellules transduites a été retrouvé dans des zones en contact avec le LCS. De plus, un prétraitement de mannitol a permis une expression de GFP plus intense et plus étendue dans le cerveau et la moelle, suggérant qu'une perturbation de la BHM pourrait favoriser la pénétration dans le SNC de vecteurs AAV injectés par voie ICis.

Suite à ces résultats, un AAV2 recombinant pour la *N*-acetylglucosaminidase a été utilisé en double injection ICis et IV, combinée avec un prétraitement de mannitol chez des souris MPSIII adultes ([Fu 2007](#)). Cette stratégie a mené à une augmentation significative de l'activité de cette enzyme dans le cerveau, associée à une augmentation de la survie des

Introduction

animaux : en moyenne 15 mois pour les souris injectées contre 8 mois pour les souris non traitées. Des injections ICis seules d'AAV2 recombinant pour la *N*-acetylglucosaminidase ont été, par la suite, réalisées chez la souris MPSIII adulte par la même équipe ([Fu 2010](#)). Après ces injections, une forte activité de *N*-acetylglucosaminidase a été retrouvée dans le cerveau, associée à un ralentissement dose-dépendant de la progression de la maladie. En effet, une dose de vecteur de 5.10^{10} vg a permis une augmentation de la survie moyenne des souris traitée d'environ 17 mois, contre 11 mois avec une dose plus faible de 10^{10} vg. Par ailleurs, aucune expression de l'enzyme n'a été mesurée dans les organes périphériques, suggérant que les effets thérapeutiques observés chez la souris MPSIII sont seulement dus à l'expression de *N*-acetylglucosaminidase dans le SNC.

La même dose de 5.10^{10} vg a également été utilisée en ICis pour apporter un AAV1 recombinant pour l'arylsulfatase A dans un modèle de souris atteint d'une autre maladie de surcharge lysosomale, la MLD ([Iwamoto 2009](#)). Cette injection a mené à une forte expression d'ARSA dans l'ensemble du SNC, en particulier dans le cervelet, le tronc cérébral et dans la moelle au niveau des fibres sensibles de la moelle dorsale et des neurones des DRG. L'augmentation d'expression d'ARSA dans ces régions s'est traduite par une réduction significative des accumulations de sulfatides, les auteurs n'ont cependant pas précisé l'impact de cette réduction sur le comportement des souris MLD.

L'ensemble de ces études montre que des injections ICis de vecteurs AAV constituent une stratégie intéressante pour traiter les manifestations neurologiques des maladies de surcharge lysosomale.

Plus récemment, l'injection ICis de vecteurs AAV a été testée chez le primate dans le but de déterminer l'efficacité de cette stratégie sur le transfert de gènes dans le SNC, pour une potentielle application thérapeutique aux maladies neurodégénératives, en particulier les maladies du MN.

Dans une de ces études, des injections ICis ont été réalisées avec un vecteur scAAV9-GFP en parallèle d'injections intraartérielles chez le macaque adulte ([Samaranch 2012](#)). Les deux voies ont abouti à une transduction de cellules et de fibres nerveuses dans l'ensemble du cerveau. Un plus grand nombre de cellules GFP-positives et une plus forte intensité de l'expression neuronale de la GFP ont été observés suite aux injections ICis, par rapport à l'injection systémique du vecteur, ainsi qu'une plus faible transduction des organes périphériques comme le foie ou la rate. Bien que de nombreux neurones pyramidaux GFP-

Introduction

positifs aient été retrouvés dans le cortex, la GFP a été majoritairement observée dans des astrocytes fibreux et protoplasmiques, confirmant le fort tropisme astrocytaire de l'AAV9 déjà décrit après injections IV chez la souris adulte ([Duque 2009](#), [Foust 2009](#)). Une transduction de cellules microgliales ou d'oligodendrocytes n'a en revanche pas été décrite.

Au niveau de la moelle, la même équipe a récemment montré une forte transduction neuronale chez le macaque adulte après injections ICis de 4.10^{13} vg de vecteur scAAV9 ou scAAV7 ([Samaranch 2013](#)). Pour les deux vecteurs, une dispersion similaire a été observée dans l'ensemble du SNC, avec de nombreux MN transduits dans la moelle. La transduction des MN a néanmoins été retrouvée majoritairement en région lombaire.

Dans ces études, un titre élevé ($>1:200$, déterminé par ELISA), d'anticorps dirigés contre la capside de l'AAV9 et circulants dans le sang avant l'injection inhibe presque totalement l'expression du transgène dans le SNC par rapport aux animaux considérés séronégatifs ($<1:50$). Ceci suggère que les injections ICis ne permettent pas aux particules AAV d'échapper à leur reconnaissance par le système immunitaire.

Une autre équipe a testé des injections ICis chez le macaque adulte de vecteurs scAAV recombinants pour la GFP, de sérotype 9 ou 2.5, un sérotype hybride possédant des composants de la capside de l'AAV2 et de l'AAV1. À une dose de 2.10^{12} vg, ces deux vecteurs ont abouti à une expression de la GFP répartie de façon homogène dans l'ensemble du SNC, notamment dans la moelle, le cortex, les noyaux gris centraux et le cervelet ([Gray 2013](#)).

Tous les animaux ont présenté dans leur sérum des anticorps dirigés contre la capside du vecteur injecté. Néanmoins, dans cette étude, contrairement aux données précédentes, la présence d'anticorps anti-AAV2.5 chez deux macaques avant l'injection de ce vecteur (1:32 et 1:128) n'a pas semblé diminuer l'efficacité du transfert de gène. D'autre part, aucun anticorps n'a été retrouvé dans le LCS des macaques injectés AAV9 ou AAV2.5.

Ces résultats semblent indiquer que si la quantité d'anticorps neutralisants est faible dans le sérum, ceux-ci ne se retrouvent pas dans le LCS à un niveau suffisant pour bloquer la transduction neuronale après administration ICis de vecteurs AAV.

1.2.5.3 Injection intrathécale lombaire

Comme pour les injections ICis, les injections intrathécales (IT) présentent l'avantage de ne pas nécessiter de chirurgie du crâne. En effet, les injections IT sont réalisées au niveau de la moelle dans l'espace subarachnoïdien par simple ponction entre les processus vertébraux, généralement entre L2 et L3 ou entre L3 et L4. De plus, les injections IT en région lombaire permettent d'éviter des lésions de la moelle puisqu'à ce niveau, le canal rachidien ne contient que les racines de la queue de cheval.

Cette voie d'administration a été initialement testée dans le cadre des maladies de surcharge lysosomale, en particulier chez la souris MPSVII pour apporter l'enzyme déficiente, la β -glucuronidase au sein du SNC ([Elliger 1999](#)). Après injection IT lombaire d'un vecteur ssAAV2 recombinant pour la β -glucuronidase chez des souris nouveau-nées, un fort niveau d'activité β -glucuronidase a été retrouvé dans la moelle autour du site d'injection. Une activité plus faible mais significative a été observée dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques, suggérant qu'une fraction de vecteur ssAAV2 a rejoint la circulation sanguine. Une faible activité de β -glucuronidase a également été mesurée dans le cerveau à un niveau suffisant pour réduire les lésions de surcharge lysosomale.

Pour déterminer si cette stratégie pouvait être efficace chez des souris MPSVII présentant déjà des lésions cérébrales, des injections IT d'AAV2- β Glu ont été par la suite réalisées chez des souris adultes, ce qui a mené à une élimination complète des vacuoles lysosomales dans le cerveau. Ce dernier point suggère que la voie IT est aussi efficace chez des animaux nouveau-nés que chez des animaux adultes pour cibler le SNC, contrairement à ce qui avait été décrit après des injections systémiques ou ICV de vecteurs AAV ([Passini 2001](#), [Foust 2009](#), [Gray 2011b](#)).

L'efficacité des voies IT et IV a été, par ailleurs, explorée avec un AAV2 recombinant pour l'enzyme IDUA chez des souris MPSI adultes ([Watson 2006](#)). Contrairement à la voie IV, les injections IT ont abouti à une activité forte et étendue d'IDUA dans le cerveau, en particulier dans le cervelet et les bulbes olfactifs. À la plus forte dose testée, 4.10^{10} vg, les niveaux d'IDUA dans le cerveau des souris MPSI injectées ont été retrouvés aussi élevés que pour des souris saines, avec un nombre de cellules présentant des vacuoles d'accumulation fortement réduites, voire nulles. En revanche, à une dose plus faible de 2.10^9 vg, la correction des lésions de surcharge lysosomale a été moins étendue suggérant que l'efficacité de la transduction neuronale est dose-dépendante après administration IT de vecteur AAV2.

Introduction

Ces études ont montré, que comme l'injection ICis, l'administration IT de vecteurs AAV est efficace pour réduire les lésions de surcharge dans le SNC de modèles rongeurs de maladies lysosomales.

Cette voie d'administration a également été utilisée dans le but de transduire les neurones sensitifs des ganglions rachidiens. Afin de déterminer si l'efficacité des injections IT pour transduire les DRG était sérotype dépendante, plusieurs vecteurs AAV recombinants pour la GFP ont été testés à une dose de 3.10^9 vg chez le rat adulte ([Storek 2006](#)). Trois mois après injection d'AAV1 ou 5, aucune expression n'a pu être détectée dans la moelle. Suivant l'hypothèse que la synthèse du brin complémentaire du vecteur n'est pas suffisamment efficace dans les tissus ciblés, des injections de vecteurs double brin ont ensuite été réalisées à la même dose. Ceci a mené à une forte expression de GFP avec un scAAV1, notamment dans les fibres dorsales et les méninges, une plus faible transduction avec un scAAV5, et pas d'expression détectable avec les scAAV2 et 3. L'expression de GFP a été retrouvée maximale pour le scAAV1 au niveau de la queue de cheval, c'est-à-dire au niveau du site d'injection, puis avec une intensité décroissante dans la moelle thoracique et cervicale, jusqu'au cerveau où aucune expression de GFP n'a été observée. Des résultats similaires ont été obtenus après injection IT lombaire de vecteur scAAV8-GFP à une dose de 3.10^{10} vg chez le rat adulte ([Storek 2008](#)). En effet, ces injections ont abouti à une forte expression de GFP dans les neurones sensitifs des DRG, avec un transport de GFP dans les axones des faisceaux grâciles au niveau de la moelle dorsale. De plus, l'expression de GFP dans des sous-types de neurones nociceptifs a conduit les auteurs à appliquer cette stratégie d'injections IT d'AAV dans les neurones sensitifs de la moelle pour lutter contre les douleurs chroniques en apportant un analgésique, la prepro- β -endorphine. Cette étude a montré une expression stable sur 3 mois de la prepro- β -endorphine dans les DRG et les fibres dorsales, se traduisant chez un modèle de rats présentant des douleurs neuropathiques chroniques, par une nette réduction de l'allodynie, un processus pathologique déclenchant des signaux de douleur en réponse à des stimuli normalement indolores.

L'intérêt d'injections IT de vecteurs AAV pour cibler la voie sensitive a également été souligné par d'autres études. Dans le but d'atteindre les neurones nociceptifs des DRG chez la souris, plusieurs voies ont été comparées en utilisant un vecteur AAV6 ([Towne 2009](#)). Environ 60% des cellules totales des DRG ont été retrouvées GFP-positives suite aux injections IT, contre 30% après injection dans le nerf sciatique, 5% en sous-cutané et 2% en

Introduction

IM, ce qui indique une nette supériorité de la voie IT pour cibler les neurones sensitifs des DRG.

Dans une autre étude, des vecteurs ssAAV5 et ssAAV8 recombinants pour la GFP ont été injectés par voie IT à une dose de 10^{11} vg chez des souris adultes après prétraitement de mannitol ([Vulchanova 2010](#)). Les deux vecteurs ont à nouveau abouti à une forte transduction des DRG et au transport de la GFP dans les fibres sensibles dorsales à tous les étages de la moelle ; transport qui a été confirmé par le fait qu'une section des racines dorsales de la moelle réduit fortement le signal GFP dans la moelle dorsale.

Cette étude a également été la première à mettre en évidence une transduction de MN dans la moelle après injection IT de vecteurs AAV.

Suite à ces résultats, plusieurs constructions ont été testées par cette voie pour optimiser le transfert de gène dans les MN, et en particulier déterminer l'effet du sérotype et du promoteur sur l'efficacité de transduction des MN.

Dans une première étude, une dose de 2.10^9 vg de vecteurs scAAV de sérotype 6 ou 9, recombinants pour la GFP sous le contrôle des promoteurs CMV ou CAG court, a été administrée par voie IT à des souris adultes ([Snyder 2011](#)). Un mois après l'injection, les quatre vecteurs ont abouti à une distribution similaire de l'expression de GFP, restreinte aux régions sacrée, lombaire et thoracique inférieure de la moelle, et absente dans les cellules du cerveau. Au niveau des MN, les effets du promoteur et du sérotype se sont révélés plus marqués. En effet, le vecteur scAAV9-CAG-GFP n'a pas permis de transduire les MN, par rapport au scAAV6-CAG-GFP pour lequel une faible quantité de MN GFP-positifs a été retrouvée. En revanche, les deux vecteurs scAAV-CMV-GFP ont montré une forte efficacité pour exprimer la GFP dans les MN, à un niveau plus élevé et plus étendu avec le sérotype 9, indiquant un effet à la fois du sérotype mais surtout du promoteur sur l'efficacité de transduction des MN après injection de vecteurs AAV dans le LCS, chez la souris adulte.

Cette même équipe a par la suite construit un nouveau promoteur hybride : le CBh issu du CAG, et l'a testé lors d'injections IT de vecteurs AAV chez la souris ([Gray 2011a](#), voir [1.2.6 Pistes d'amélioration concernant le transfert de gène dans le SNC à l'aide de vecteurs AAV](#) pour plus de détails) et chez de jeunes porcs adultes ([Federici 2012](#)). Afin d'optimiser cette stratégie de transfert de gène dans ce modèle gros animal, deux doses de vecteur AAV9 (2.10^9 vg/kg et 10^{10} vg/kg) et deux modes d'injections IT ont été utilisés : une première dite locale avec une simple ponction en région lombaire, et une deuxième qualifiée de diffuse avec

Introduction

l'introduction d'un cathéter au niveau lombaire pour administrer le vecteur à trois niveaux : en région cervicale, thoracique et lombaire. À un mois post-injection, une forte transduction de la moelle a été observée, incluant les MN des cornes ventrales, et au contraire une faible expression de la GFP dans les organes périphériques. Si les injections diffuses ont mené à une transduction efficace à tous les étages de la moelle, les injections locales ont en revanche abouti à un signal GFP concentré uniquement sur la moelle lombaire et sacrée. Un effet dose a également été observé, avec une transduction des MN nettement plus importante suite aux injections à la dose de 10^{10} vg/kg. Le comptage des MN GFP-positifs a ainsi indiqué d'une part que les injections à faible dose ($2 \cdot 10^9$ vg/kg) mènent à une transduction de moins de 20% des MN totaux dans l'ensemble de la moelle, et d'autre part que les injections à plus forte dose permettent une transduction de plus de 60% des MN, dans la moelle lombaire pour les injections locales et à tous les niveaux de la moelle pour les injections diffuses.

Des injections ICis ou IT de $5 \cdot 10^{12}$ vg/kg de vecteur scAAV9-CAG_{court}-GFP ont également été testées chez le porcelet nouveau-né ([Bevan 2011](#)). Trois semaines après, les deux voies d'administration ont abouti à une forte transduction des MN à tous les niveaux de la moelle. Toutefois, les auteurs n'ont pas réalisé de comptage du nombre exact de MN GFP-positifs, ce qui rend difficile une comparaison avec les résultats obtenus chez l'adulte. En dehors de la moelle, une expression de GFP a été retrouvée dans le cerveau, notamment dans le cervelet avec une forte transduction des cellules de Purkinje. Par ailleurs, aucune expression de GFP n'a été observée dans les organes périphériques, suggérant que la majorité du vecteur scAAV9 est restée localisée dans le SNC.

Après ces premiers résultats démontrant la capacité de l'AAV9 à cibler les MN une fois injecté dans le LCS par voie IT chez le porc, cette stratégie a été testée chez le macaque.

Des injections IT de vecteur scAAV9-CBh-GFP ou scAAV2.5-CBh-GFP à une dose de $2 \cdot 10^{12}$ vg chez le macaque adulte ont conduit aux mêmes observations qu'avec la voie ICis, c'est-à-dire une expression de GFP répartie de façon homogène dans la moelle, notamment au niveau des cornes ventrales ([Gray 2013](#), voir [section précédente](#)). Un plus grand nombre de neurones transduits ont également été retrouvés au niveau des DRG, indiquant une forte affinité des vecteurs AAV pour les neurones sensitifs après une administration IT, comme ce qui avait été suggéré chez le rat avec l'AAV8 ([Storek 2008](#)) ou l'AAV5 ([Xu 2012a](#)), et avec l'AAV9 chez la souris ([Snyder 2011](#)).

Jusqu'à récemment, la plupart des études ayant testé des injections IT d'AAV chez les rongeurs avaient montré une faible diffusion du transgène et une transduction essentiellement au niveau des DRG et des fibres sensibles de la moelle, soulignant surtout la pertinence d'une telle stratégie pour le traitement des douleurs chroniques.

Avec les sérotypes d'AAV8 et 9 injectés en IT, une proportion plus importante de MN a pu être transduite dans l'ensemble de la moelle, probablement grâce à la capacité de ces vecteurs à franchir les barrières cellulaires et donc à diffuser plus facilement dans le SNC, offrant ainsi de nouvelles opportunités pour le traitement des maladies du MN.

1.2.5.4 Limites de cette stratégie dans le cadre des maladies du motoneurone

Les injections d'AAV dans le LCS permettent dans l'ensemble une forte transduction du SNC tout en réduisant l'expression du transgène dans les tissus périphériques. Selon la voie d'abord, certaines régions du SNC sont préférentiellement ciblées, comme le cerveau par voie ICV, ou les niveaux inférieurs de la moelle et les DRG par voie IT lombaire.

Comme pour les injections systémiques, le sérotype d'AAV utilisé a un fort impact sur la diffusion et la pénétration du vecteur dans les structures nerveuses. En effet, l'efficacité de certains vecteurs pour atteindre les neurones peut être limitée par leur forte affinité pour l'épendyme et les plexus choroïdes, comme dans le cas des AAV2, 4 et 5 ([Davidson 2000](#)). Elle peut aussi dépendre de la capacité du vecteur à franchir certaines couches cellulaires, comme les astrocytes entourant le parenchyme médullaire. Un rôle de la BHM dans la diffusion du vecteur au niveau de la matière grise a également été suggéré par une nette augmentation de l'étendue des régions transduites par un AAV2 chez l'adulte, obtenue suite à un prétraitement de mannitol ([Fu 2007](#)).

Bien qu'un certain nombre d'études ait relevé une forte reproductibilité des profils de transduction, d'autres travaux ont en revanche indiqué une variabilité individuelle. Ainsi, pour 1 rat sur 6 injectés en IT avec 3.10^9 vg de vecteur scAAV1-CMV-GFP, aucune expression de GFP n'a été détectée dans la moelle ([Storek 2006](#)). Or, pour cet animal, un saignement observé suite au placement du cathéter pour l'injection IT lombaire a suggéré pour les auteurs qu'une majorité du vecteur a été administrée plutôt dans la circulation sanguine que dans l'espace subarachnoïdien. Chez le porc, des infiltrats de neutrophiles dans le parenchyme médullaire ont été décrits chez trois animaux sur douze injectés avec 2.10^9 vg/kg de vecteur

Introduction

scAAV9-CBh-GFP ([Federici 2012](#)). Puisque ces inflammations n'ont pas été associées à une activation d'astrocytes ou de cellules microgliales, les auteurs ont suggéré qu'elles étaient dues à la procédure d'injection. Ainsi, l'efficacité et l'innocuité des administrations d'AAV dans le LCS pour cibler la moelle peuvent être affectées par une procédure d'injection non optimale aboutissant à une fuite de vecteur dans le sang ou des lésions du tissu nerveux. Pour réduire ces risques, il est possible d'utiliser un agent radioopaque pour visualiser le site d'injection et suivre les flux de LCS par fluoroscopie, comme cela a été réalisé chez le porc ([Bevan 2011](#)) et le macaque ([Gray 2013](#)). Toutefois, cette technique est difficilement applicable à des animaux de plus petite taille ou ne supportant pas les anesthésies de longue durée.

Enfin, les injections dans le LCS ne semblent pas empêcher l'apparition d'anticorps dirigés contre la capsid de l'AAV dans la circulation sanguine. Une réaction immune contre le vecteur pourrait ainsi avoir un fort impact sur l'efficacité de transduction dans la moelle à long terme et il serait, par conséquent, particulièrement pertinent d'explorer l'évolution de la réponse immune dirigée à la fois contre la capsid de l'AAV et contre le transgène au cours du temps dans des modèles gros animaux.

La présence d'anticorps neutralisants dans le sérum avant l'injection semble également inhiber totalement l'expression du transgène comme cela a été observé chez le macaque, avec des titres d'anticorps circulants supérieurs à 1:200 ([Samaranch 2012](#)). Néanmoins, un titre plus faible de 1:128 n'a pas paru affecter l'efficacité du transfert de gène ([Gray 2013](#)). Il pourrait donc être possible d'administrer des vecteurs AAV dans le LCS d'individus présentant de faibles titres d'anticorps neutralisants.

Par ailleurs, les injections d'AAV dans le LCS ne semblent pas mener à la présence d'anticorps dans le LCS, ou à un niveau trop faible pour pouvoir y être détecté. Ainsi, même si l'injection de vecteur AAV dans le LCS ne permet pas d'éviter une réaction immune humorale dirigée contre les protéines de la capsid, il pourrait être en théorie possible de réinjecter un vecteur AAV selon la même voie d'administration du fait de l'absence ou de la faible quantité d'anticorps présents dans le LCS, ce qui constituerait un autre avantage de cette stratégie d'injection comparé à l'administration IV de vecteurs AAV.

I.2.6 Pistes d'amélioration concernant le transfert de gène dans le SNC à l'aide de vecteurs AAV

L'efficacité, la spécificité et l'innocuité du transfert de gène avec un vecteur AAV dans le SNC peuvent être optimisées (i) en utilisant des promoteurs forts ou tissu spécifiques, (ii) à l'aide d'éléments de régulation tels que les séquences cibles de micro ARN permettant de restreindre l'expression du transgène, (iii) par modification du tropisme du vecteur à l'aide de variants de capside virale ou encore (iv) à l'aide de substances permettant le passage de la BHM.

I.2.6.1 Choix des promoteurs

Dans la mise au point d'une stratégie de transfert de gène, le choix du promoteur est prépondérant. En effet, dans un contexte cellulaire donné, la nature du promoteur détermine l'efficacité de la transcription du transgène et influence donc directement l'intensité de transduction. Certains promoteurs sont également tissus spécifiques, ce qui permet de limiter l'expression du transgène dans des tissus non ciblés si elle est indésirable. Pour cibler le SNC, deux types de promoteurs peuvent être utilisés : les promoteurs forts ubiquitaires et les promoteurs cellule-spécifiques.

Promoteurs forts ubiquitaires

Les promoteurs forts ubiquitaires permettent une transcription rapide et intense dans plusieurs types de cellules. Ils peuvent être d'origine virale, comme les promoteurs RSV (*rous sarcoma virus*) et CMV (*cytomegalovirus*), les virus présentant la capacité de transcrire fortement leurs éléments de réplication et les composants structuraux nécessaires lors de leur phase lytique. Ils peuvent aussi être d'origine eucaryote, certains gènes ayant physiologiquement besoin d'être fortement transcrits dans plusieurs tissus. Dans le SNC, c'est le cas de la phosphoglycérate kinase (promoteur PGK) ou de la β -glucuronidase (promoteur GUSB). Enfin, des promoteurs hybrides ont été créés pour tirer profit des promoteurs viraux et eucaryotes. Ceci est possible en identifiant les différents éléments constituant le promoteur, le cœur du promoteur avec le site d'initiation de la transcription ainsi que le site de liaison de l'ARN polymérase, et d'autre part des séquences reconnues par des facteurs de transcription.

Introduction

Ainsi, le promoteur CAG (*CMV enhancer/chicken β -actin*), est composé du site d'activation précoce du promoteur CMV et de la 5'UTR du gène codant pour la β -actine.

La taille du promoteur peut être un facteur limitant son utilisation, puisqu'un génome d'AAV recombinant est limité à 4,7 kb, ITR compris, voire seulement 2,2 kb pour un vecteur double brin. Les promoteurs CMV, PGK et GUSB sont assez compacts puisqu'ils sont tous d'une taille inférieure à 600pb. Le promoteur CAG est quant à lui plus long (1,6kb), ce qui le rend difficilement compatible avec un scAAV. Pour permettre son utilisation, une version courte de seulement 800 pb (CAG_{court}) a été construite. Comme le CAG_{long} , elle est constituée du site d'activation précoce du promoteur CMV et du cœur du promoteur *chicken β -actin*, mais avec un intron tronqué issu du virus SV40 à la place de la fin de la 5'UTR du gène codant pour la β -actine.

Ces différents promoteurs ont été utilisés au sein d'un vecteur AAV dans les études décrites dans les sections précédentes pour cibler le SNC. En particulier, une forte proportion de MN a été transduite dans la moelle avec :

- un scAAV9-CMV-GFP en IV chez le chat nouveau-né ([Duque 2009](#))
- un scAAV9-PGK-GFP en IV chez la souris nouveau-née ([Dominguez 2011](#))
- un scAAV8-GUSB-SMN en ICV chez la souris nouveau-née ([Passini 2010](#))
- un scAAV9- CAG_{court} -GFP en ICis ou en IT chez le porc nouveau-né ([Bevan 2011](#))

Toutefois, les études systématiques comparant plusieurs promoteurs dans le même contexte, (sérotipe, transgène, dose, voie d'injection, modèle animal et temps post-injection identiques) sont peu nombreuses, il est donc difficile d'identifier le promoteur le plus efficace pour une application dans le SNC.

Pour comparer l'efficacité du CMV et du CAG_{court} , les promoteurs les plus utilisés pour la transduction de la moelle, des injections IT de vecteurs scAAV-CMV-GFP ou scAAV- CAG_{court} -GFP de sérotipe 6 ou 9 ont été réalisées à une dose de 2.10^9 vg chez la souris adulte ([Snyder 2011](#)). Un mois après injection de ces quatre vecteurs, la diffusion la plus importante de l'expression de GFP a été observée avec le vecteur scAAV6-CMV-GFP. Le nombre de MN transduits a également été retrouvé plus important avec le promoteur CMV : environ 500 MN GFP-positifs avec le vecteur scAAV6-CMV-GFP et environ 700 avec le scAAV9-CMV-GFP, contre moins de 100 avec le scAAV6- CAG_{court} -GFP et aucun MN GFP-positif détecté avec le vecteur scAAV9- CAG_{court} -GFP. Une meilleure efficacité de transduction des MN du promoteur CMV par rapport au CAG_{court} a été confirmée par une autre étude de la même

équipe ([Gray 2011a](#)). Trois semaines après injection IT de vecteur scAAV9-GFP chez la souris, une immunohistochimie anti-GFP a en effet indiqué une forte transduction des MN avec le CMV tandis que le CAG_{court} a abouti à une expression majoritairement dans les cellules gliales. Toutefois, à un temps post-injection de 10 semaines, le niveau de transduction des MN par le promoteur CMV a été retrouvé nettement réduit. Cette extinction du signal produit par le CMV avait déjà été décrite dans d'autres études, notamment avec un AAV2 dans le cerveau de rat ([Klein 1998](#), [Tenenbaum 2004](#)), ainsi que dans le cerveau de souris avec un autre promoteur viral, le RSV ([Davidson 2000](#)). La principale hypothèse avancée par ces études pour expliquer cette inactivation est une hyperméthylation du promoteur viral. Néanmoins, celle-ci n'a été mise en évidence que dans le muscle de rat après injection d'adénovirus ([Brooks 2004](#)). Par ailleurs, aucune marque de méthylation n'a été détectée à long terme dans le muscle ou le foie sur un promoteur RSV au sein d'un vecteur AAV1 administré en IM ou en IV chez le macaque ([Léger 2011](#)).

Un nouveau promoteur a été construit pour tirer profit du fort tropisme neuronal du promoteur CMV et la stabilité au cours du temps du promoteur CAG_{court}. Ce promoteur hybride, appelé CBh, a ainsi montré une expression robuste dans les MN spinaux de souris 10 semaines après injection IT de vecteur scAAV9-CBh-GFP ([Gray 2011a](#)). Il a également permis de transduire un grand nombre de MN chez le porc adulte après injection en IT de 10^{11} vg/kg de scAAV9 ([Federici 2012](#)), et chez le macaque adulte après injection ICis de 10^{12} vg/kg de scAAV9 ou de scAAV2.5 ([Gray 2013](#)).

Promoteurs neurone-spécifiques

Un inconvénient des promoteurs forts ubiquitaires est qu'ils ne permettent généralement pas de restreindre l'expression du transgène au tissu ciblé. En effet, pour atteindre les MN de la moelle, des injections locales, ICis ou IT, de vecteur possédant un fort tropisme neuronal comme l'AAV9 aboutissent à une expression réduite mais significative dans les organes périphériques ([Federici 2012](#), [Samaranch 2012](#)). L'utilisation de promoteurs neurones spécifiques, comme le NSE (*neuron specific enolase*), le PDGF- β (*platelet-derived growth factor β -chain*) ou encore le promoteur de la synapsine-1 humaine (hSYN) peut en théorie limiter ce problème. En effet, des constructions AAV2 contenant les promoteurs NSE et PDGF- β ont montré une efficacité de transduction comparable voire supérieure à celle du CMV, plus stable au cours du temps dans les neurones de rats injectés en IC ([Klein 1998](#), [Wang 2005b](#)) ou en IT ([Xu 2003](#)). En revanche, la taille de 1,5 kb de ces promoteurs rend leur

utilisation difficile dans un vecteur scAAV, et aucune utilisation thérapeutique n'a encore été décrite. Le promoteur hSYN, de taille plus réduite (500 pb), a quant à lui été testé en parallèle du CAG dans un AAV6 en IC chez le rat. Dans les deux cas, une forte proportion des neurones de la substance noire a été transduite ([Decressac 2012](#)). Toutefois, l'efficacité du promoteur hSYN pour cibler les MN de la moelle n'est pas encore connue. Enfin, le petit promoteur murin de la MECP2 (*methyl-CpG-binding protein-2*), d'une taille de 229 bp, a été utilisé dans un scAAV9-GFP injecté en IV chez la souris à une dose de 2.10^{11} vg ([Gray 2011a](#)). Quatorze semaines post-injection, l'expression de la GFP a été retrouvée dans l'ensemble du SNC, spécifiquement au niveau des neurones. Toutefois, cette expression a été relevée à une faible intensité, et certains organes périphériques comme le foie, le cœur et le rein ont aussi montré des cellules GFP-positives, suggérant que le promoteur MECP2 n'est pas neurone-spécifique en dehors du SNC.

En conclusion, bien que de nouveaux promoteurs efficaces aient été décrits, notamment à l'aide de constructions hybrides, le choix du promoteur dépend de la stratégie envisagée et réside dans le meilleur compromis entre efficacité, spécificité et taille.

1.2.6.2 Modification de la capsid de l'AAV

Comme indiqué dans les sections précédentes, le sérotype du vecteur AAV utilisé a un fort impact sur l'efficacité de la stratégie pour cibler le SNC. La recherche de nouveaux variants d'AAV peut ainsi apporter de nouveaux profils de transduction. Une étude a comparé un AAV8-CAG-GFP à plusieurs sérotypes isolés de tissus de primates non humains, incluant les bb2, cy5, rh20, rh39 et rh43, pour transduire le cerveau après injection IC à une dose de 5.10^9 vg chez le rat adulte ([Lawlor 2009](#)). Ces injections ont montré au niveau des noyaux gris centraux une diffusion de l'expression de GFP et une intensité plus importantes avec les sérotypes cy5, rh20 et rh39. Ces sérotypes n'ont cependant pas encore été testés pour la transduction de la moelle, pour laquelle il pourrait être intéressant de les comparer en version sc avec un scAAV9.

Des sérotypes hybrides peuvent également être obtenus par une approche rationnelle en identifiant, parmi les différents éléments fonctionnels de la capsid, les composants variables conférant à chaque sérotype ses propriétés uniques. Ainsi, l'AAV2.5 possède une capsid

Introduction

d'AAV2 avec 6 acides aminés de l'AAV1, ce qui lui permet de présenter une meilleure affinité pour le muscle. Cet AAV2.5 a été utilisé par voie IM lors d'un essai clinique pour la dystrophie musculaire de Duchenne ([Bowles 2012](#)) et par injection IT chez le macaque adulte pour cibler les MN de la moelle ([Gray 2013](#)). Toutefois, cette stratégie ne permet d'obtenir que des combinaisons de tropisme avec les sérotypes existants et décrits.

Un autre moyen d'obtenir des variants d'AAV efficaces pour le transfert de gène dans le SNC est d'utiliser une approche d'évolution moléculaire dirigée de la capsid. Pour cela, une banque aléatoire de séquences *cap* est obtenue par mutagenèse dirigée ([Perabo 2003](#), [Müller 2003](#), [Maheshri 2006](#)), par PCR mutagène ([Pulicherla 2011](#)), ou encore par un mélange de séquences de capsides existantes pour constituer une banque chimérique aléatoire ([Li 2008](#), [Koerber 2008](#)). Les clones de vecteurs produits grâce à ces banques sont ensuite sélectionnés par différentes méthodes. Dans une première étude, l'ensemble des clones a été testé *in vitro*, puis chaque AAV a été sélectionné et identifié individuellement après amplification, avant d'être testés *in vivo* par injections IC chez le rat ([Koerber 2009](#)). Cette technique a ainsi permis de déterminer des variants des sérotypes 2 et 6 particulièrement efficaces pour la transduction d'astrocytes, jusqu'à 15 fois plus efficaces que les sérotypes dont ils sont issus. Une autre méthode a consisté à injecter directement des particules sauvages produites par une banque chimérique en IV chez le rat, puis d'extraire 3 j après le génome des particules ayant atteint le cerveau ([Gray 2010](#)). Trois cycles de sélection ont été effectués, au cours desquels les virus extraits ont été amplifiés par PCR, puis ont servi de matrice pour une nouvelle production virale qui a été de nouveau injectée. Par la suite, des particules AAV CAG GFP ont été produites à partir de séquences *cap* chimérique sélectionnée précédemment, puis ont été testées en IC chez le rat pour confirmer leur tropisme neuronal. Enfin, les variants recombinants sélectionnés ont été injectés par voie IV chez la souris à une dose de 5.10^{10} vg. Par analyse de la biodistribution du vecteur par qPCR et de l'expression de la GFP par immunohistochimie, cette étude a mis en évidence deux clones capables d'atteindre les neurones du cerveau depuis la circulation sanguine tout en ayant une faible affinité pour les organes périphériques, en particulier le foie, le cœur et les muscles squelettiques. Avec un objectif similaire, une dernière étude a utilisé une approche plus rationnelle basée sur la sélection des clones avec des critères bioinformatiques ([Pulicherla 2011](#)). Plus précisément, une banque a été créée par mutagenèse aléatoire à partir de la capsid de l'AAV9, et les clones produits présentant des mutations non pertinentes ont été éliminés. Les différents variants sélectionnés ont ensuite été testés en IV chez la souris avec une cassette d'expression contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur CAG. Une analyse

cinétique de la bioluminescence produite et de la biodistribution des vecteurs a montré que plusieurs clones, dont le clone 9.45, ont une transduction dans le foie diminuée d'environ 10 à 100 fois. Des résultats similaires ont par ailleurs été obtenus avec la même méthode appliquée chez la souris indiquant un tropisme hépatique réduit pour un variant de l'AAV8, l'AAV2i8 ([Asokan 2010](#)). L'utilisation de ces vecteurs AAV9.45 et AAV2i8 est ainsi particulièrement pertinente pour éviter une forte accumulation de vecteur dans le foie.

1.2.6.3 Utilisation de séquences cibles des micro-ARN

Un autre moyen de limiter l'expression du transgène est l'insertion d'éléments de régulation transcriptionnels ou post-transcriptionnels dans la cassette d'expression. Parmi ces éléments, les systèmes d'induction à la tétracycline Tet-On et Tet-Off ou au rtTA (*reverse transactivator*) ont été largement documentés dans un vecteur AAV. Toutefois, leur utilisation en clinique pour une stratégie visant à cibler le SNC est difficilement envisageable, du fait de la faible pénétration des drogues inductrices dans le SNC et de l'apparition de réponse immune contre les transactivateurs (pour revue dans le cerveau [Ch tarto 2013](#)).

L'utilisation de séquences cibles des micro-ARN peut en revanche proposer un moyen d'éviter l'expression du transgène dans un tissu donné de façon plus physiologique. En effet, les micro-ARN sont des petits ARN simple brin non codants qui jouent un rôle de régulation post-transcriptionnelle en reconnaissant leur séquence complémentaire sur un ARNm et en menant à l'inactivation ou la dégradation de ce dernier par le biais du complexe RISC, pour *RNA-induced silencing complex* (pour revue [Bartel 2004](#)).

Parmi ces micro-ARN, le miR122 est physiologiquement impliqué dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras, et il est exprimé spécifiquement dans le foie ([Esau 2006](#)). L'utilisation de la séquence cible du miR122 accolée à celle du transgène peut ainsi en théorie inhiber l'expression du transgène dans le foie. Trois répétitions de la séquence cible du miR122 ont été insérées au sein d'une construction scAAV9-CMV-GFP ([Geisler 2011](#)). Utilisée *in vitro*, cette construction a abouti à une nette réduction du signal GFP dans des hépatocytes par rapport à un scAAV9-CMV-GFP ne contenant pas les miR122. *In vivo*, injecté par voie IV à une dose de 7.10^{11} vg chez la souris adulte, le vecteur scAAV9-CMV-GFP-miR122 n'a pas permis la détection de cellules GFP-positives dans le foie, tandis qu'il transduit fortement l'ensemble du muscle cardiaque. Les mêmes résultats ont été obtenus par une autre équipe, avec un vecteur scAAV9 recombinant pour la luciférase sous le contrôle du

Introduction

promoteur CAG, injecté en IV chez la souris adulte à une dose de 10^{12} vg ([Qiao 2011](#)). L'insertion de cinq répétitions de miR122 dans le vecteur a abouti à une diminution de l'expression de luciférase dans le foie d'un facteur 50 par rapport au vecteur sans miR122.

Le miR142 est également intéressant pour la thérapie génique puisqu'il est exprimé spécifiquement dans les cellules de la lignée hématopoïétique, incluant les cellules présentatrices d'antigène ([Chen 2004](#), [Brown 2006](#)). Deux études ont utilisé la séquence cible du miR142 dans le but de prolonger l'expression du transgène en évitant une réponse immune dirigée contre le transgène due à la transduction des cellules présentatrices d'antigène. Dans la première étude, quatre répétitions de miR142 ont été insérées dans un vecteur scAAV9-CAG-Luc injecté en IV chez la souris adulte à une dose de 10^{12} vg ([Qiao 2011](#)). Le niveau de luciférase dans le foie, le muscle squelettique et le cœur a été retrouvé à 3 mois post-injection significativement plus faible qu'à 2 semaines post-injection. Toutefois, la même quantité de vecteur a été détectée dans ces tissus aux deux temps post-injection, et aucune expression de luciférase n'a été retrouvée dans les cellules mononuclées du sang, suggérant que la diminution du niveau de luciférase à 3 mois post-injection n'est pas liée à une réponse immune. La deuxième étude a en revanche montré que l'utilisation de quatre répétitions de miR142 dans une construction AAV1-CMV injectée à une dose de $5 \cdot 10^9$ vg chez la souris par voie IM, connue par ailleurs comme étant particulièrement immunogène ([Herzog 2002](#), [Flotte 2007](#)), a permis un maintien de l'expression du transgène au cours du temps, contrairement aux constructions sans miR142 ([Boisgérault 2013](#)).

Ainsi, dans le cadre d'une stratégie de transfert de gène dans le SNC, l'utilisation de séquences cibles de différents miRNA pourrait permettre d'éviter l'expression du transgène au niveau du foie et des cellules présentatrices d'antigène, et donc de limiter les potentiels effets indésirables liés à la transduction de tissus non ciblés.

Enfin, un prétraitement à l'aide de mannitol peut favoriser le passage de certains sérotypes comme l'AAV2 à travers la barrière hémato-méningée lors d'injection systémique ou intrathécale du vecteur ([Fu 2003](#), [Fu 2007](#)). Pour d'autres vecteurs comme l'AAV9 qui sembleraient avoir une capacité plus importante pour franchir les barrières cellulaires, le mannitol a peu d'effet ([Gray 2011b](#)). La composition du véhicule peut néanmoins avoir une influence sur le niveau de transduction neuronale induite par le vecteur AAV9 lorsque celui-ci est injecté dans le LCS. En effet, il a été montré que l'ajout de 5% de sorbitol dans la solution tampon de reprise du vecteur, contenant de plus une concentration de 350 mM de NaCl permet d'augmenter significativement, par rapport à un tampon PBS, le nombre de copies de

vecteur AAV9 dans la moelle et le cerveau de souris adultes injectées par voie IV ([Gray 2011b](#)). Il semble donc que la concentration et la nature des sucres ainsi que la force osmotique dans le tampon de formulation du vecteur puissent avoir un impact sur la reconnaissance par l'AAV de ses récepteurs cellulaires.

En conclusion, une stratégie de transfert de gènes dans le SNC à l'aide d'un vecteur AAV peut être optimisée d'une part au niveau du tropisme du vecteur, en modifiant la capside ou en utilisant des séquences cibles de micro-ARN pour diminuer la transduction de tissus non ciblés, ou encore en modifiant la composition du véhicule pour favoriser sa pénétration dans le SNC, et d'autre part au niveau de l'expression du transgène, le promoteur devant être choisi avec le meilleur compromis entre efficacité, spécificité et taille adapté à la stratégie envisagée.

II Résultats

«Un mathématicien est un aveugle qui, dans une pièce sombre, cherche un chat noir qui n'y est pas.»

Charles Darwin

II.1 Objectifs et description de l'étude expérimentale

II.1.1 Objectif général

L'objectif général de ce travail de thèse a été de tester différentes stratégies de transfert de gènes dans la moelle épinière d'un modèle félin atteint d'une pathologie du motoneurone à l'aide d'injections de vecteurs AAV, afin d'en évaluer leurs faisabilités, leurs innocuités et leurs potentielles efficacités thérapeutiques. Le transfert d'un gène neuroprotecteur à l'aide de vecteurs AAV dans la moelle de modèles animaux de maladie du MN est en effet pertinent dans le cadre du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SMA ([Foust 2010](#), [Valori 2010](#), [Dominguez 2011](#), [Glascok 2012a](#)) ou l'ALS ([Dodge 2008](#)).

Néanmoins, la mise au point d'un essai préclinique de thérapie génique des maladies du MN applicable à l'homme doit répondre à deux principales problématiques :

- le choix d'un mode d'administration du vecteur AAV transférable à l'homme en clinique, permettant d'apporter un gène thérapeutique dans l'ensemble de la moelle, dans un grand nombre de MN et/ou dans d'autres cellules comme les astrocytes ou la microglie, tout en assurant une expression de la protéine thérapeutique suffisamment importante pour enrayer le processus neurodégénératif,
- le choix du transgène thérapeutique à utiliser pour aboutir à un effet thérapeutique. Celui-ci dépend évidemment de la maladie ciblée et de sa génétique, comme c'est le cas pour l'apport du gène SMN dans les MN des patients SMA. Il peut s'agir également d'un facteur neuroprotecteur dont pourrait bénéficier en théorie un plus grand nombre de maladies du MN, SMA et ALS comprises.

Notre équipe a précédemment identifié l'AAV9 comme un vecteur particulièrement efficace pour transduire les MN dans l'ensemble de la moelle chez la souris et le chat après injection intraveineuse ([Duque 2009](#)). Une seule injection IV d'AAV9 recombinant pourrait ainsi permettre d'apporter de façon peu invasive un gène thérapeutique au sein des MN de patients SMA ou ALS. Plusieurs études ont par ailleurs déjà montré une amélioration clinique chez un modèle murin sévère de SMA (SMN Δ 7) après administration systémique d'AAV9 recombinants pour le gène hSMN1 ([Foust 2010](#), [Valori 2010](#), [Dominguez 2011](#), [Glascok 2012a](#)), ce qui a abouti à l'expression durable de SMN dans les MN. Néanmoins, une telle stratégie conduit également au transfert du gène thérapeutique et à son expression dans de nombreux organes périphériques, en particulier le cœur et le foie ([Duque 2009](#), [Miyake 2011](#)).

Si une telle stratégie est adaptée au traitement des formes sévères de SMA caractérisées par des lésions à la fois centrales et périphériques ([Vitte 2004](#), [Hua 2011](#)), il pourrait être plus pertinent d'utiliser un transfert de gène plus restreint au SNC pour les formes plus modérées de SMA (type II ou III) ou pour l'ALS. Il est donc nécessaire, parallèlement au développement clinique d'une stratégie systémique, de tester des administrations plus localisées de vecteurs AAV pour limiter la distribution et l'expression du transgène thérapeutique au SNC.

Au cours de ce travail de thèse, deux voies d'administration d'AAV restreintes au SNC ont été testées dans le modèle félin LIX1 : l'injection intracérébrale et l'injection intracisternale.

II.1.2 Choix du modèle animal

L'utilisation de modèles gros animaux de maladie du MN est particulièrement pertinente pour tester de telles voies d'administration de vecteurs AAV et pour en analyser leur efficacité dans la moelle, notamment dans le cadre d'une étude préclinique dont l'objectif final est de proposer une stratégie applicable à l'homme en clinique. En effet, si les modèles rongeurs sont utiles pour comprendre les mécanismes pathogéniques des maladies du MN et pour tester des stratégies thérapeutiques innovantes, les modèles gros animaux comme les carnivores domestiques ont l'avantage de présenter un cerveau et une moelle épinière de plus grande taille, plus proches anatomiquement et physiologiquement de ceux de l'homme que ne le sont ceux des rongeurs. De plus, le développement du système immunitaire des carnivores domestiques également plus proche de l'homme que les rongeurs ([Felsburg 2002](#), [Day 2007](#)), permet d'évaluer plus rigoureusement l'innocuité du transfert de gène en termes de réponse immune dirigée contre le vecteur ou contre le produit du transgène. Parmi les modèles gros animaux de maladie du MN, le chat LIX1^{-/-} présente une pathologie proche de la SMA humaine de type III progressant lentement puis se stabilisant à l'âge adulte. Comme chez l'homme, seuls les MN sont touchés et la pathogénèse de la maladie implique initialement une perte des jonctions neuromusculaires et des axones moteurs ([He 2005](#), [Fyfe 2006](#), [Wakeling 2012](#)). Cette pathologie de sévérité modérée permet au cours d'études à long terme, d'analyser à la fois le maintien au cours du temps de l'expression du transgène apporté par un AAV recombinant, et d'en évaluer l'impact thérapeutique sur l'évolution de la maladie. Le chat LIX1 est actuellement un des seuls modèles gros animal de maladie du MN réellement disponibles pour des essais précliniques de thérapie génique.

II.1.3 Stratégie expérimentale générale

Pour identifier une stratégie efficace de thérapie génique dans la moelle des chats LIX1, nous avons testé différentes voies d'administration d'un vecteur AAV avec deux transgènes potentiellement thérapeutiques, le facteur neuroprotecteur VEGF dans un premier temps, puis le gène LIX1 dont la délétion est responsable de la pathologie féline dans un second temps.

Cette étude expérimentale est divisée en trois parties décrites ci-dessous (**fig10**). Les deux premières correspondent respectivement à l'analyse de l'impact thérapeutique du VEGF et du LIX1. La troisième correspond à une cartographie plus précise de l'expression d'un transgène rapporteur dans le SNC après injection ICis de vecteur scAAV9, cette stratégie s'étant révélée prometteuse au cours des deux premières parties pour l'expression à long terme d'un facteur potentiellement neuroprotecteur dans la moelle de chat.

II.1.3.1 Évaluation de trois voies d'administration d'un vecteur AAV pour transférer le VEGF dans la moelle du modèle félin LIX1

Cette première partie qui a conduit à un article actuellement en révision dans le journal *Human Gene Therapy*, et a eu pour objectif de tester l'impact clinique chez le chat LIX1 de trois voies d'administration de vecteurs AAV recombinants pour le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), un facteur de croissance connu pour ses propriétés neuroprotectrices :

1. Dans un premier temps, nous avons testé l'administration par voie intracérébrale de vecteur AAV1 recombinant pour le VEGF, plus précisément par injections simultanées dans le cortex moteur et la capsule interne. En effet, comme ces deux structures cérébrales communiquent avec la moelle grâce au large regroupement d'axones du faisceau cortico-spinal, nous avons pensé qu'une seule injection de vecteur AAV devrait en théorie permettre de cibler tous les étages de la moelle par transport antérograde des particules virales. Cette voie d'administration a été testée chez le chat avec un vecteur AAV1 qui a été montré capable de transduire de nombreux neurones dans le cerveau de chat ([Vite 2003](#)), et qui est, de plus, particulièrement efficace pour être transporté le long des axones du tractus cortico-spinal ([Hutson 2012](#)).

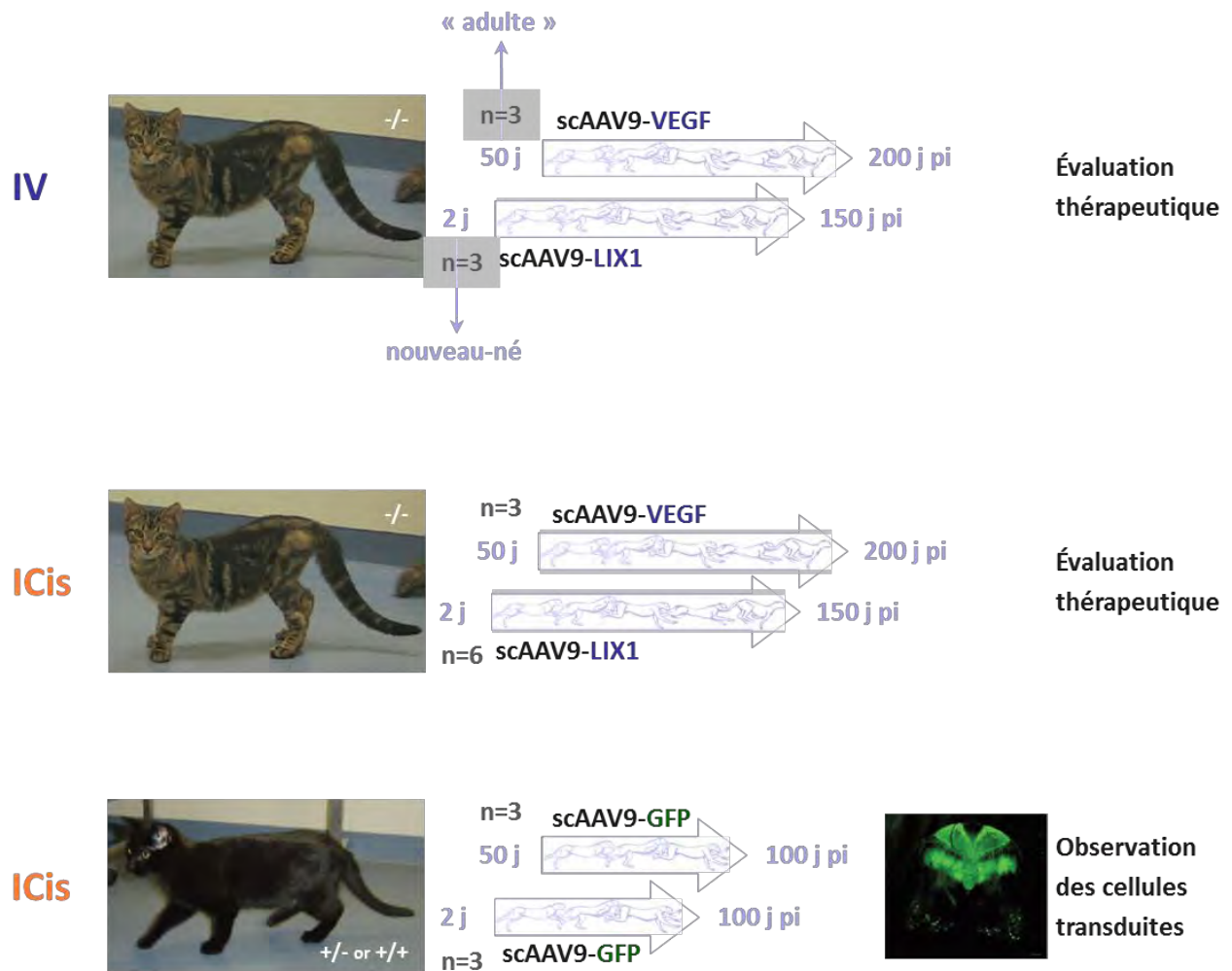


Fig.10) Résumé des trois grandes stratégies expérimentales de ce projet. « -/- » indique des chats $LIX1^{-/-}$ malades, « +/- » et « +/+ » des chats hétérozygotes ou homozygotes sains. IV : injections intraveineuses, ICis : injections intracisternales, j pi : jours post-injection

2. Dans un deuxième temps, nous avons testé une autre stratégie de transfert de gènes restreint au SNC, l'administration dans le liquide céphalorachidien au niveau de la grande citerne de vecteurs AAV1 et scAAV9-VEGF. En effet, des études récentes ont montré la pertinence d'injections de vecteur AAV9 dans le LCS pour cibler les MN de modèles rongeurs et gros animaux ([Snyder 2011](#), [Federici 2011](#), [Samaranch 2012](#), [Gray 2013](#)).

3. Enfin, ces deux voies d'injections restreintes au SNC ont été comparées à l'administration intraveineuse de vecteur scAAV9 chez le chat adulte et nouveau-né. Nous avons effectivement montré précédemment que l'AAV9 était capable, chez les rongeurs comme chez le chat, de traverser la barrière hémato-méningée pour atteindre les MN depuis la circulation sanguine ([Duque 2009](#)). Cette voie IV, moins invasive que les précédentes, présente aussi l'avantage de pouvoir être réalisée facilement chez des chatons nouveau-nés, ce qui pourrait être nécessaire lorsque la fenêtre thérapeutique est située à un âge précoce, comme c'est le cas pour les souris SMA de type I ([Foust 2010](#), [Passini 2010](#), [Valori 2010](#), [Dominguez 2011](#)).

Pour évaluer l'impact clinique de ces différents modes d'injection de vecteurs AAV chez le chat LIX1, nous avons utilisé comme transgène potentiellement thérapeutique le facteur neuroprotecteur VEGF. En effet, parallèlement à son action angiogénique (pour revue [Ferrara 2003](#)), de nombreuses études ont montré que le VEGF avait aussi une fonction neuroprotectrice *in vitro* et *in vivo* (pour revue [Rosenstein 2010](#)). *In vitro*, le VEGF réduit la mortalité cellulaire liée à l'ischémie et à la toxicité du glutamate dans une population de cellules neuronales en inhibant l'apoptose *via* la voie de signalisation AKT ([Jin 2000](#), [Matsuzaki 2001](#), respectivement). Il a également une activité neurotrophique en favorisant la croissance axonale ([Sondell 1999](#)), et permet d'induire la prolifération de précurseurs neuronaux ([Jin 2002](#)). Ces fonctions ont également été identifiées *in vivo*, notamment dans le cerveau de rats, indiquant que le VEGF protège et favorise la prolifération du tissu nerveux (pour revue [Greenberg 2005](#)). D'autre part, ces fonctions du VEGF ont été mises en relation avec des pathologies du MN puisque des niveaux réduits de VEGF ont été retrouvés chez les patients atteints d'ALS et la souris SOD1^{G93A} ([Lambrechts 2003](#), [Devos 2004](#), [Brockington 2006](#)), ainsi que chez la souris SBMA ([Sopher 2004](#)), suggérant qu'un défaut de production de VEGF est susceptible de provoquer une dégénérescence des MN ([Storkebaum 2004b](#)). Dans ce sens, une étude a montré que le *knock-out* chez la souris de l'élément de réponse à l'hypoxie du VEGF (souris VEGF^{δ/δ}) entraîne une perte progressive des MN similaire à ce qui est retrouvé dans l'ALS ([Oosthuyse 2001](#)). Enfin, la surexpression de VEGF dans la moelle de la souris ou de rat SOD1^{G93A}, soit après administration de protéine recombinante

([Storkebaum 2004a](#), [Zheng 2004](#), [Zheng 2007](#)) soit après injection IM d'AAV-VEGF ([Azzouz 2004](#)), est capable de ralentir la progression de l'ALS.

Dans cette première partie de l'étude, nous avons utilisé le cDNA de l'isoforme 164 du VEGF murin cloné dans un plasmide vecteur sous le contrôle du promoteur PGK, promoteur qui a été utilisé avec succès pour exprimer le cDNA humain SMN1 chez la souris SMN Δ 7 ([Duque 2009](#), [Dominguez 2011](#)). Nous avons administré 10^{12} vg/kg de vecteur AAV-PGK-VEGF par voie IC, ICis et IV chez des chats âgés d'environ 50 j, avant l'apparition des symptômes de la SMA féline. Tous ces chats jeunes adultes ont été immunosupprimés, contrairement aux chatons injectés en période néonatale, ce qui est considéré capable d'induire une tolérance immune vis-à-vis du produit du transgène. À la suite de ces injections, nous avons évalué :

- l'efficacité du transfert du gène VEGF dans la moelle de chats sains (chats +/- des portées LIX1) à 100 j post-injection, en recherchant le génome viral dans la moelle et le cerveau par une technique de qPCR, et l'expression du transgène mVEGF dans le SNC, le foie et les muscles par des techniques de RT-PCR et ELISA ;
- et l'efficacité thérapeutique à long terme du VEGF produit par les vecteurs AAV chez des chats malades LIX1^{-/-}, par un suivi pendant 150 j par des examens neurologiques et électromyographiques dont la mise au point a été décrite précédemment ([Wakeling 2012](#)).

Cette première partie, malgré l'absence d'impact clinique du facteur VEGF, a permis d'identifier chez le jeune chat adulte une voie d'administration du vecteur AAV9 particulièrement intéressante pour cibler l'ensemble de la moelle : l'injection ICis.

II.1.3.2 Transfert du gène LIX1 par injections intraveineuse et intracisternale d'AAV9 chez le chat LIX1 nouveau-né

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons utilisé comme second facteur potentiellement thérapeutique le cDNA LIX1 puisque la délétion de ce gène serait responsable de la pathologie du MN féline ([Fyfe 2006](#)). La relation entre la délétion du gène LIX1 et la dégénérescence des MN du chat est particulièrement intéressante car LIX1 possède un domaine de liaison à l'ARN ([Fyfe 2006](#)), comme un certain nombre de protéines impliquées dans des maladies du MN ([Saunders 2003](#), [Fallini 2012a](#)), et pourrait de ce fait

intervenir dans le métabolisme de l'ARN. Cette étude visant à réintroduire le gène LIX1 chez le chat LIX1^{-/-} pourrait donc confirmer à la fois l'efficacité clinique d'une stratégie de transfert de gène à l'aide de vecteur AAV dans la moelle, et l'implication de LIX1 dans la dégénérescence des MN félins.

Pour tester cette stratégie de réintroduction du gène LIX1 dans le modèle félin, nous avons utilisé un vecteur scAAV9 recombinant pour le cDNA LIX1 félin injecté chez le chat LIX1^{-/-}, en période néonatale du fait du rôle potentiellement précoce de LIX1 au sein du SNC (hypothèse d'une intervention dans le développement des MN). Nous avons ainsi évalué chez le chat nouveau-né deux approches précédemment testées avec le facteur VEGF chez le chat adulte :

- l'administration IV, c'est-à-dire la stratégie thérapeutique utilisée avec efficacité chez la souris SMN ([Foust 2010](#), [Valori 2010](#), [Dominguez 2011](#)),
- et l'administration ICis, susceptible de localiser davantage le vecteur au SNC.

Comme au cours de la première étude, pour ces deux approches de thérapie génique nous avons estimé à la fois :

- l'efficacité du transfert du gène LIX1 dans la moelle des chatons LIX1^{-/-} et LIX1^{+/-} à 150 j post-injections, en recherchant la présence du vecteur par qPCR et en quantifiant son expression par RT-qPCR ;
- et l'efficacité thérapeutique de ce transfert de gène LIX1 chez des chats LIX1^{-/-}, par un suivi neurologique et électromyographique, auxquels se sont ajoutées une mesure de la composante musculaire du potentiel d'action (CMAP) ([Wakeling 2012](#)), et une analyse accélérométrique grâce à l'appareil Locometrix®.

II.1.3.3 Cartographie de l'expression de la GFP dans le SNC de chats adultes et nouveau-nés après injection intracisternale d'AAV9

Parallèlement aux deux premières parties de l'étude qui ont eu pour objectif de tester différentes voies d'administration de vecteur AAV pour cibler les MN de la moelle et d'évaluer l'impact thérapeutique, la troisième partie de ce travail de thèse a eu pour but de mieux caractériser le transfert de gène dans le SNC félin après des injections ICis d'AAV9 en réalisant une cartographie de l'expression de la GFP chez des chats sains nouveau-nés et

adultes. Cette étude a porté sur la quantification précise de la proportion de MN transduits dans la moelle 30 j après injections ICis de vecteur scAAV9-CMV-GFP, et l'identification de la nature des cellules transduites dans l'ensemble du SNC. Cette cartographie de l'expression de la GFP dans le SNC félin a, en outre, été réalisée après injections ICis à la fois chez des chats adultes et des chats nouveau-nés pour vérifier l'impact de l'âge d'injection sur la nature des cellules transduites. En effet, une étude avait indiqué une transduction de MN plus importante après injections d'AAV9 chez la souris nouveau-née avec, en revanche, une proportion plus élevée d'astrocytes transduits chez les souris adultes ([Foust 2009](#)). Toutefois, ces données n'ont pas été confirmées par nos propres résultats en IV ([Duque 2009](#)), et n'ont jamais été décrites dans un modèle gros animal.

Pour étudier le tropisme de l'AAV9 dans le SNC après injections ICis chez le chat, nous avons utilisé comme transgène rapporteur le cDNA codant pour l'GFP (*green fluorescent protein*), dans la même construction que celle utilisée précédemment pour étudier la voie IV ([Duque 2009](#)). Nous avons injecté ce vecteur à une dose de 10^{12} vg/kg dans la grande citerne de 3 chats sains nouveau-nés et de 3 chats sains âgés de 50 j, puis analysé :

- l'expression de la GFP dans les différents territoires de la moelle et du cerveau,
- l'expression de la GFP spécifiquement dans les MN, avec une évaluation de la proportion de MN transduits dans les parties cervicale, thoracique et lombaire de la moelle,
- et la présence d'astrocytes et d'oligodendrocytes transduits dans la moelle et le cerveau.

Les résultats de cette étude complètent les deux premières parties expérimentales de ce manuscrit, en documentant une stratégie thérapeutique induisant les forts taux de protéines thérapeutiques dans la moelle des chats LIX1, et dont l'utilisation pourrait être envisagée en clinique pour traiter les maladies neurodégénératives de la moelle.

II.2 Évaluation de trois voies d'administration d'un vecteur AAV pour transférer le VEGF dans la moelle du modèle félin LIX1

Article en révision le 16/05/2013.

Human Gene Therapy

Human Gene Therapy

scAAV9 intracisternal delivery results in efficient gene transfer to the central nervous system of a feline model of motor neuron disease

Journal:	Human Gene Therapy
Manuscript ID:	HUM-2012-218.R1
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bucher, Thomas; INSERM, UMR1089 Colle, Marie-Anne; INRA, UMR703 Wakelin, Erin; Michigan State University, Department of Microbiology and Molecular Genetics Dubreil, Laurence; INRA, UMR703 Fyfe, John; Michigan State University, Department of Microbiology and Molecular Genetics Briot-Nivard, Delphine; INSERM, UMR1089 Maquigneau, Maud; INSERM, UMR1089 Raoul, Sylvie; INSERM, UMR1089 Cherel, Yan; INRA, UMR703 Astord, Stéphanie; INSERM, UMR974; Institut de Myologie, UPMC-AIM UM 76, INSERM U 974, CNRS UMR 7215 Duque, Sandra; INSERM, UMR974; Institut de Myologie, UPMC-AIM UM 76, INSERM U 974, CNRS UMR 7215 Marais, Thibaut; Institut de Myologie, UPMC-AIM UM 76, INSERM U 974, CNRS UMR 7215 Voit, Thomas; Institut de Myologie, UPMC-AIM UM 76, INSERM U 974, CNRS UMR 7215 Moullier, Philippe; INSERM, UMR1089 Barkats, Martine; Institut de Myologie, UPMC-AIM UM 76, INSERM U 974, CNRS UMR 7215 Joussemet, Béatrice; INSERM, UMR1089
Keyword:	AAV Vectors < A. Viral Vector Development, Neurologic - Includes inherited, progressive and acquired diseases < C. Disease Models and Clinical Applications

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

scAAV9 intracisternal delivery results in efficient gene transfer to the central nervous system of a feline model of motor neuron disease

Thomas Bucher¹, Marie-Anne Colle², Erin Wakeling³, Laurence Dubreil², John Fyfe³, Delphine Briot-Nivard¹, Maud Maquigneau¹, Sylvie Raoul¹, Yan Cherel², Stéphanie Astord⁴, Sandra Duque⁴, Thibaut Marais⁴, Thomas Voit⁴, Philippe Moullier^{1,5}, Martine Barkats⁴, Béatrice Joussemet¹.

¹ INSERM UMR1089, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France.

² INRA UMR703, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Nantes, France.

³ Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, USA

⁴ INSERM UMR974, Institut de Myologie, Faculté de Médecine, 105 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

⁵ Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA.

(#) Correspondence should be addressed to B.J.
Dr B Joussemet, PhD
Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM UMR1089
Institut de Recherche Thérapeutique 1
Université de Nantes
8 quai Moncousu
44007 Nantes Cedex 01, France.
Fax: (33) 2 28 08 04 16
Tel: (33) 2 40 08 04 15
e-mail: beatrice.joussemet@univ-nantes.fr

Running title: AAV-mediated VEGF expression in the spinal cord

Abstract

Based on previous studies suggesting that vascular endothelial growth factor (VEGF) could protect motor neurons from degeneration, adeno-associated virus vectors (serotypes 1 and 9) encoding VEGF (AAV.vegf) were administered in a limb-expression 1 (LIX1)-deficient cat – a large animal model of lower motor neuron disease - using three different delivery routes to the central nervous system. AAV.vegf vectors were injected into the motor cortex via intracerebral administration, into the *cisterna magna* or intravenously in young adult cats. Intracerebral injections resulted in detectable transgene DNA and transcripts throughout the spinal cord confirming anterograde transport of AAV via the corticospinal pathway. However, such strategy led to low levels of VEGF expression in the spinal cord. Similar AAV doses injected intravenously resulted also in poor spinal cord transduction. In contrast, intracisternal delivery of AAV exhibited long-term transduction and high levels of VEGF expression in the entire spinal cord, yet with no detectable therapeutic clinical benefit in LIX1-deficient animals.

Altogether, we demonstrate that: (i) intracisternal delivery is an effective AAV delivery route resulting in high transduction of the entire spinal cord, associated with little to no off-target gene expression (ii) however, in a LIX1-deficient cat model, VEGF expressed at high levels in the spinal cord has no beneficial impact on the disease course.

Keywords: AAV; intracisternal injections; motor neuron diseases

Introduction

The limb expression 1 (LIX1)-deficient cat represents a unique large animal model of lower motor neuron (MN) disease close to human spinal muscular atrophy (SMA) type III in severity and time of onset (Fyfe *et al.*, 2006; He *et al.*, 2005). Affected cats exhibit juvenile muscle atrophy, gait abnormalities and abnormal electromyograms (EMGs) beginning at 2 months of age, with disease progression reaching a plateau in adults, around 8 months of age (Wakeling *et al.*, 2011). Interestingly, motor axonal growth defects precede MN cell loss as it has been described in other animal models lacking survival motor neuron (SMN) gene (Kariya *et al.*, 2008; McWhorter *et al.*, 2003; Rossoll *et al.*, 2003). Of note, the LIX1 gene product whose absence is responsible for MN degeneration in cats possesses a RNA binding domain at its amino terminus suggesting its role in RNA metabolism (Fyfe *et al.*, 2006; Giot *et al.*, 2003). Similarly, a relationship between RNA metabolism and MN degeneration has also been described for different proteins implicated in human MN diseases like in SMA with SMN protein (Jablonka *et al.*, 2000; Lunn and Wang, 2008) or in amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Ito and Suzuki, 2011; van Blitterswijk and Landers, 2010). However, the relation between RNA metabolism and MN cell death is not yet fully understood.

In this study, we tested the therapeutic effect of the vascular endothelial growth factor (VEGF), a neuroprotective factor, in LIX1-deficient cats using three different gene delivery routes. Initially described as one of the major regulators of blood vessel formation (Ferrara *et al.*, 2003), the VEGF was also shown to induce anti-apoptotic and neuroprotective activities both *in vitro* and *in vivo* (Greenberg and Jin, 2005; Sathasivam, 2008; Storkebaum *et al.*, 2005). Moreover, intramuscular injections of a VEGF-encoding lentiviral vector increased the life expectancy of a mouse model of ALS (Azzouz *et al.*, 2004) and reduced levels of VEGF seem also to predispose mice and human to MN degeneration (Brockington *et al.*, 2006; Devos *et al.*, 2004; Lambrechts *et al.*, 2003; Oosthuysen *et al.*, 2001). Adequate spinal cord delivery of therapeutic factors represents another critical challenge to develop treatment for MN diseases, especially because the blood brain barrier (BBB)

prevents penetration of a majority of therapeutics into the central nervous system (CNS) (Borasio *et al.*, 1998; Lauria *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 1996; Ochs *et al.*, 2000). Recombinant adeno-associated virus (AAV) was shown to successfully deliver transgenes to the MNs in mice and large animal models after intramuscular (Hollis *et al.*, 2008; Kaspar *et al.*, 2003; Towne *et al.*, 2010) and more recently intravenous (IV) injections (Bevan *et al.*, 2011; Duque *et al.*, 2009; Foust *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2011b), resulting in prolonged survival of mouse models of SMA (Dominguez *et al.*, 2011; Foust *et al.*, 2010; Valori *et al.*, 2010). Direct intracranial injections of AAV vectors in structures with spinal cord connections, like the motor cortex, although invasive can also deliver a therapeutic factor to the spinal cord by an anterograde transport of AAV vectors (Ciron *et al.*, 2009; Dodge *et al.*, 2008; Foust *et al.*, 2008). Finally, AAV intrathecal injections have been shown to mediate transgene expression in the spinal cord of mice (Gray *et al.*, 2011a; Vulchanova *et al.*, 2010; Storek *et al.*, 2008) and pigs (Bevan *et al.*, 2011; Federici *et al.*, 2011) and potentially constitutes another efficient and less invasive gene therapy delivery route.

The purpose of this study was to test the therapeutic action of VEGF overexpression in the spinal cord of LIX1 cats using three different modes of AAV delivery with two AAV serotypes (AAV1 and AAV9) known for their neurotropism in cats (Duque *et al.*, 2009; Vite *et al.*, 2003). These two AAV serotypes were injected into the motor cortex, the *cisterna magna* or the jugular vein of young adult cats using an identical dose (1×10^{12} viral genome (vg)/kg). The biodistribution of AAV vectors and VEGF expression in the spinal cord was analysed in heterozygous *lix1*^{+/−} cats at three months post injection (pi) while the therapeutic efficacy of each gene transfer strategy was evaluated in homozygous affected *lix1*^{−/−} cats until six months pi. We found that intracisternal (ICis) injections of scAAV9 vector achieved sustained expression of the secreted neurotrophic factor both in the spinal cord and in the nerves while avoiding off-target expression in the liver. However, high and long-term expression of VEGF in the spinal cord did not prevent loss of motor axons and muscle denervation in *lix1*-deficient cats.

Material and Methods

Animals

Breeding LIX1-cats (heterozygous $lix1^{+/-}$ and homozygous $lix1^{-/-}$ animals) were obtained from John Fyfe (Laboratory of Comparative Medical Genetics, East Lansing, MI) and housed in the Boisbonne Center at Nantes Veterinary School (ONIRIS, Nantes, France). Kittens were genotyped as previously described (Fyfe *et al.*, 2006). Experiments were approved by the regional ethics committee and were carried out according to European guidelines for the care and use of experimental animals.

Vectors

Pseudotyped AAV1 and AAV9 vectors were generated by packaging AAV2-based recombinant ss or sc genomes into AAV1 and AAV9 capsids respectively, as previously described (Rabinowitz *et al.*, 2002) at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>). The AAV2 plasmids contain (i) the gene encoding GFP under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter in a sc genome or (ii) the gene encoding murine VEGF under control of the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter in an ss or sc genome. Physical particles were quantified by dot blot hybridization and vector titers are expressed as vector genomes per milliliter.

In vivo AAV injections

For intracerebral (ICra) injections (Table 1), solutions of ssAAV1 encoding VEGF (ssAAV1.vegf) were bilaterally injected into both the internal capsule and the motor cortex of 7 weeks old cats, under general anesthesia obtained by isoflurane inhalation (3% v/v) and morphine injection (0.2 mg/kg). All treated cats received 3 deposits of ssAAV1.vegf ($2 \times 15 \mu\text{l}$ in motor cortex and $20 \mu\text{l}$ in internal capsule) through 3 stereotactic tracks in each hemisphere (motor cortex: 5 mm caudal to the supraorbital arch and 29 mm rostral to the auditory canal, 3 and 5 mm lateral to the sagittal

suture, depth 3 mm, internal capsule: 21 mm caudal to the supraorbital arch and 13 mm rostral to the auditory canal, 8 mm lateral to the sagittal suture, depth 8.5 mm, flow 2 μ l/min). No side effect possibly related to surgery or vector deposits was noticed. For ICis injections (Table 1), solutions of both ssAAV1 and scAAV9 encoding VEGF or GFP were injected into the *cisterna magna* of 7 weeks old cats (1×10^{12} vg/kg in 1 ml/ kg per cat) under general anesthesia obtained by isoflurane inhalation (3% v/v). For IV injections (Table 1), scAAV9.vegf were injected into the jugular vein of 7-week old or 2-day old kittens (respectively 1×10^{12} and 1×10^{13} vg/kg in a volume of 1-2 ml). Seven-week old cats receiving ICra, ICis or IV AAV deliveries were immunosuppressed by mycophenolate mofetil (20 mg/kg/day) combined with cyclosporine whose dosage was adjusted once a week in order to maintain cyclosporinemia above 100 ng/ml. Before injections of the AAV vectors, the absence of AAV1 or 9-neutralizing antibodies was confirmed in serum of 7 weeks old cats and in mothers when neonatal kittens were injected. A unique control group made of three uninjected affected $lix1^{-/-}$ cats (C22, C23, C24) and one healthy $lix1^{+/+}$ cat (C21) was constituted, common to all injected cats (Table 1). This was made due to the restricted availability of $lix1^{-/-}$ cats.

Tissue preparation

Respectively 100 and 200 days after intracerebral (ICra), ICis or IV AAV.vegf injections, heterozygous $lix1^{+/+}$ and homozygous $lix1^{-/-}$ animals were anesthetized by isoflurane inhalation (3% v/v) and sacrificed by an overdose of pentobarbital administered in the cephalic vein. Brain and spinal cord tissues were removed, embedded in O.C.T. Tissue Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA) and frozen in cold isopentane (-50°C) and serial sections were cut on a cryostat ($3 \times 100 \mu\text{m}$ followed by $5 \times 10 \mu\text{m}$) and stored at -80°C for further analysis.

Cats receiving ICis injections of scAAV9.gfp were anesthetized 30 days after injection (150 $\mu\text{g/kg}$ medetomidine, 10 mg/kg ketamine) and perfused transcardially with 10 ml PBS followed by 100 ml 4% paraformaldehyde. Brains and spinal cords were removed and cut into coronal 5-mm blocks, postfixed by incubation in 4% paraformaldehyde and cryoprotected by overnight incubation in 30%

sucrose. Samples were embedded in optimal cutting temperature compound and frozen on dry ice.

Spinal cord slices were cut on a cryostat in intervals of 100 μm followed by 5 $\times$ 10 μm .

Quantitative PCR Analysis

Genomic DNA was extracted from frozen tissues using the following buffer: 50 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulphate and 100 mM NaCl containing 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K (Eurobio, Les Ulis, France). Samples were digested overnight at 55°C and then subjected to phenol-chlorophorm extraction. Real-time PCR was conducted in duplicate with a LightCycler 2.0 instrument (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) using 50 ng of DNA in a 20 μl volume of the following solution: 10 μl Premix ExTaq (Takara Bio Inc, Shiga, Japan), 0.4 μl 10 μM Primer, 0.4 μl 10 μM FAM/TAMRA TaqMan probe, 5 μl template and 3.8 μl H₂O. The feline β -glucuronidase (βGLU) gene was employed as a reference and for each sample, Ct values were compared to those obtained with plasmid standard dilutions containing mVEGF and βGLU cDNA sequences. The ratio between transgene (VEGF sequence) and genomic DNA (βGLU sequence) copy number provided the amount of transgene copy per cell. Primers and probe for mVEGF were : Forward primer 5'-CTTTCTCTCCACAGGTGTCCA-3'. Reverse primer 5'-CAGTAAAGCCAGGGTCCA-3', probe 6FAM5'-CCTCCGAAACCATGAACTTTCTG-3'-TAMRA, and for feline βGLU : Forward primer 5'-ACGCTGATTGCTCACACCAA-3', Reverse primer 5'-CCCCAGGTCTGCTTCATAGTT-3', probe 6FAM5'-CCGGCCCGTGACCTTTGTGA-3'-TAMRA. Samples were heated at 95°C for 20s followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 60°C (βGLU) or 66°C (mVEGF) for 40 s. Control tissues extracted separately from vector-treated tissues were checked for VEGF amplification. The sensitivity of the quantitative PCR is 10⁻⁴ copies/ cell or 10 copies/ 50 ng of genomic DNA.

RT-PCR Analysis

The RNA was isolated from frozen brain and spinal cord tissues with Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and treated with DNase (Turbo DNA-free, Ambion, Austin, TX). One μ g of RNA from each sample was reverse transcribed by using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) and PCR proceeded using the cDNA as a template with AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). The amplification was done for 40 cycles (94° 30 sec, 62° 1 min) with specific primer pairs for VEGF (Forward primer 5'-GCCCTCCGAAACCATGA-3, Reverse primer 5'-AGCAGCCTGCACAGCG-3') or β -actin primers (Forward primer 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3, Reverse primer 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'). Appropriate no-RT and non-template controls were included in each PCR reaction to confirm the specificity of the reaction. The sensitivity of the RT-PCR is 10 copies of vegf cDNA/1 μ g RNA.

VEGF enzyme-linked immunosorbent assay analysis

Quantitative analysis of VEGF levels was performed using a mouse VEGF immunoassay kit (Quantikine, R&D Systems, Lille, France). 300 μ m brain slices and 5mm-long spinal cord blocks, frozen at -80 °C, were homogenized in a solution of TBS containing 1% Triton X-100 (Sigma) containing a cocktail of protease inhibitor (Complete Mini; Roche, Meylan, France). The lysates were then centrifuged for 5 minutes at 4 °C, supernatants were collected and enzyme-linked immunosorbent assay was performed following the manufacturer's protocol. Protein concentration was assessed using the Protein Assay Kit (Biorad, Hercules, CA). Data are expressed as pg of VEGF per mg of total proteins. sensitivity: The sensitivity of the ELISA test was estimated to 1 pg/mg of total proteins.

GFP expression in the spinal cord and in the brain

The brain and spinal cord sections were examined for GFP expression using a laser scanning confocal microscope (Nikon, C1, Champigny sur Marne, France) equipped by a blue argon ion laser at 488nm. For ChAT and NeuN immunofluorescence, the brain and spinal cord sections were blocked respectively by incubation with 1% rabbit or 5% goat serum (Dako) in 0.4% Triton X-100 in PBS and incubated overnight at room temperature with a goat polyclonal anti-ChAT antibody (1:100, AB144P; Chemicon International) or a monoclonal anti-NeuN antibody (1:8000, clone A60; Millipore); the sections were then incubated with a biotinylated rabbit anti-goat antibody (Dako) followed by incubation with Alexa fluor 555-conjugated streptavidin or an Alexa fluor 555 goat anti mouse antibody (Invitrogen) (Molecular Probes).

Sections were then mounted in Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA). The immunolabeled sections were scanned serially using the argon ion laser (488 nm) to observe GFP signals, and with a helium neon laser (543 nm) to observe Alexa fluor 555 signals. Each image was recorded in a separated channel (channel green for GFP and channel red for Alexa fluor 555) and overlayed to allow detection of colocalized fluorescent signals.

Neurological and electromyographic evaluation of the feline SMA-disease

To evaluate the severity and the course of the feline SMA disease, neurological exams were weekly performed in injected animals compared with three homozygous *lxl^{-/-}* affected kittens and three heterozygous *lxl^{+/-}* non-affected kittens as recently described (Wakeling *et al.*, 2011). Briefly, locomotion, limb position, muscular atrophy, postural reactions and reflexes were scored according to severity as follows: 0 normal; 1 moderately affected; 2 clearly affected; 3 severely affected. The scores obtained at different ages for each animal allowed us to follow the disease evolution in the affected kittens.

Additionally, EMG exams were achieved every two weeks in affected and normal carrier animals with a Neuropack 2 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) as previously described (Wakeling *et al.*, 2011).

The *biceps femoris*, *sartorius*, *tibialis anterior*, *gastrocnemius* and *plantaris* muscles were tested. Briefly, for each muscle, a global score accounting for the presence and the frequency of fibrillations (0, absence; 1 presence in some regions; 2, presence in multiple regions; 3, presence in all regions tested), abnormal insertion potentials (0, absence; 1, presence) and high frequency discharges (0, absence; 1, presence) was assigned.

Clinical exams were completed by motor axon count and motor axon morphometric analysis in the ventral root of the spinal cord at the C6 level in injected C13 *lixl*^{-/-} cat, as previously described (Wakeling *et al.*, 2011). The results were compared with motor neuron axon counts and morphometric analyses previously obtained in cohorts of affected and healthy cats of the same age.

VEGF Western Blot and Miles test

After transfection of HEK293 cells with the plasmid vector containing the mVEGF164 cDNA fused in the C-terminus with a cmyc epitope or the GFP cDNA as control, 50 µg of total proteins for the GFP extracts and 2.5 ng, 5 ng and 10 ng of VEGF protein as measured by ELISA for the VEGF supernatant were transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham, Les Ulis, France) and blocked with a solution of PBS supplemented with 5% non-fat dry milk, 1% NP-40 and 0.1% Tween 20. Membranes were then immunoblotted for two hours with rabbit polyclonal anti-cmyc antibody (Abcam ab9106) diluted at : 1:15,000 and next incubated with peroxidase-labeled anti-rabbit IgG polyclonal goat antibody (Dako PO448; 1:15,000) for 45 min. All membranes were visualized using ECL and exposure to ECL Hyperfilm.

In parallel to the detection of the VEGF protein by Western blot, we verified that the recombinant murine VEGF (Peprotech, Levallois Perret, France) and the murine VEGF protein produced by our AAV-vector had a functional effect *in vivo* in cats. For this purpose, we transduced HEK293 cells (multiplicity of infection: 10⁵) with the AAV9-VEGF vector, verified the expression of the murine VEGF protein in the culture supernatant by a VEGF-specific ELISA test and subsequently

performed Miles assay in a cat. Miles test consisted to inject intravenously 3% Evans blue dye (1 ml/ kg) and 10 minutes later in the dermis 0.1 ml of PBS, of recombinant murine VEGF at 10, 50, 150 ng, of histamine at 1 μ M or the culture supernatant obtained after transduction of HEK293 cells with scAAV9-VEGF, scAAV9-VEGF-cmyc and scAAV9-GFP vector as control.

Statistical analyses

Data were expressed as means $\pm$ SEM. Differences between the vector groups or between the treated and non-treated groups were analyzed using two-way ANOVA. *P* values <0.05 were considered significant.

Results

Intracerebral injection of ssAAV1.vegfr results in widespread detection of the vector genome in the spinal cord and in the peripheral nerves

Since AAV vector is capable of anterograde transport (Ciron *et al.*, 2009; Dodge *et al.*, 2008; Foust *et al.*, 2008) and single strand (ss) AAV1 was shown to mediate high transgene expression in the cat brain after intraparenchymal injection (Duque *et al.*, 2009; Vite *et al.*, 2003), intracerebral (ICra) delivery of ssAAV1 encoding the mouse vascular endothelial growth factor (VEGF) was tested in cats from the LIX1 strain. Using the Miles assay, *i.e.* Evans Blue leakage in the skin (Gozes *et al.*, 2006; Murohara *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2004), we demonstrated that the murine VEGF was effective in cats (supplementary Fig. S1). The coordinates of the motor cortex and the internal capsule were determined using stereotaxic atlas of the cat brain (Snider, 1961). Heterozygous ($lix1^{+/-}$) and homozygous ($lix1^{-/-}$) were used to assess both, the biodistribution of the vector ($lix1^{+/-}$ and $lix1^{-/-}$ cats) and the therapeutic effect ($lix1^{-/-}$ cats). To avoid the risk of an immune response against the transduced cells that could interfere with the biodistribution study (Ciron *et al.*, 2006), adult cats were immunosuppressed with cyclosporine A and mycophenolate mofetil. The ssAAV1.vegfr vector (1×10^{12} vg/kg) was bilaterally injected simultaneously into the internal capsule and the motor cortex of 7 weeks old cats (Table 1). RT-PCR analyses performed in the targeted cerebral regions of $lix1^{+/-}$ and $lix1^{-/-}$ cats at 100 and 200 days post-injection (pi) respectively, showed the presence of VEGF-specific RNA in the internal capsule and in the motor cortex structures (Fig. 1A). Accordingly, both vector DNA (mean of 8.3 ± 4 copies/cell in the motor cortex and 1.7 ± 0.6 copies/cell in the internal capsule, data not shown) and VEGF protein were detected respectively by quantitative PCR and by ELISA (Fig. 1B) at all injection sites in $lix1^{+/-}$ and $lix1^{-/-}$ cats with a distribution of the therapeutic protein extending up to 2-4 mm away from the injection sites.

We further tested the distribution of the vector genome in the spinal cord and in the peripheral nerves both by vegf-specific quantitative PCR and by vegf-specific PCR followed by southern blot whose sensitivity is higher than classic quantitative methods (sensitivity: 10 copies of vegf cDNA/1 µg of genomic DNA for the PCR-southern blot and 200 copies of vegf cDNA/ 1 µg of genomic DNA for the quantitative PCR). In all ICra injected animals, the viral genome was detected by PCR and southern blot (Fig. 2A) all along the spinal cord from the cervical to the lumbar part, in the ventral as well as in the dorsal sections and by quantitative PCR (mean of $0.02 \pm 7 \times 10^{-3}$ copies/cell for C1 and C2, $<10^{-4}$ copies/cell for the uninjected cats; Fig. 3A). Vector genomes were also detected in the peripheral nerves but only by PCR and southern blot (Fig. 2C). Consistent with these data, vegf-specific transcripts were found in the different regions of the spinal cord (Fig. 2B). However, despite the presence of the vector genome in the spinal cord, the VEGF protein was not detected *i.e.* values obtained were similar to the uninjected animals. Accordingly, no beneficial therapeutic effect of ssAAV1.vegf ICra injections was seen by neurological and EMG tests performed as previously described ((Wakeling *et al.*, 2011); data not shown) in the three *lix1*^{-/-} animals (C3, C4, C5) compared to uninjected *lix1*^{-/-} animals (C22, C23, C24, Table 1).

Intracisternal delivery of ssAAV1.vegf results in detection of the VEGF protein in the spinal cord

Since intrathecal delivery is less invasive and was previously reported to target MNs in mice and in pigs (Bevan *et al.*, 2011; Federici *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2011a; Snyder *et al.*, 2011), we tested ssAAV1.vegf vector into the cerebrospinal fluid (CSF) via intracisternal (ICis) delivery. Two *lix1*^{-/-} cats (C6, C7) were injected in the *cisterna magna* with ssAAV1.vegf (1×10^{12} vg/kg) and transgene expression was investigated 100 days later. Compared to ssAAV1 ICra injections (see above), ICis injections of ssAAV1.vegf led to a 5 to 6-fold increase in the number of viral copies per cell ($p < 0.001$, mean of 0.12 ± 0.01 copies/cell for C6, C7, Fig. 3A) and to the significant detection ($p < 0.05$) of the VEGF protein in the spinal cord (mean over the entire spinal cord of 2.69 ± 0.64

pg/mg for C6, C7, Fig. 3B). In contrast, the level of brain transduction especially in the motor cortex and internal capsule regions was lower after ICis delivery compared to direct intra-cortical injections of the vector (mean of 0.27 ± 0.09 copies/cell in the motor cortex and internal capsule for C6, C7 and 5 ± 2.3 copies/cell in these regions for C1, C2, C3, C4, C5, data not shown).

Intracisternal delivery of scAAV9 is superior for VEGF expression in the spinal cord

Because self complementary (sc) AAV serotype 9 vector was recently described as efficient in transducing the MNs of various animal species (Bevan *et al.*, 2011; Dominguez *et al.*, 2011; Duque *et al.*, 2009; Foust *et al.*, 2009; Foust *et al.*, 2010; Glascock *et al.*, 2012; Gray *et al.*, 2011b; Valori *et al.*, 2010), we injected 1×10^{12} vg/kg of scAAV9 intracisternally in 7 weeks old $\text{lixl}^{+/+}$ cats (C9, C10, C11). One hundred days later, we found a moderate increase in the number of vector copies per cell in scAAV9-injected cats compared to ssAAV1-injected animals (respectively C9, C10, and C11 cats vs C6 and C7; $p < 0.05$) (Fig. 3C) associated with an increase of VEGF expression in the spinal cord ($p < 0.01$) (mean of 8.33 ± 1.34 pg/mg of total proteins), which was 6 times higher than the level measured in uninjected cats and ≈ 3 times superior than the level measured in ssAAV1-injected cats (Fig. 3D). Distinct cell tropism, which could influence vector expression in the spinal cord, may partly explain these different results concerning both vector genomes and transgene expression levels after AAV1 and AAV9 ICis delivery. Importantly, cat C12 - a $\text{lixl}^{-/-}$ animal sacrificed 200 days post scAAV9 injection - showed sustained and comparable high-level VEGF expression (Fig. 4B) suggesting that ICis injection of scAAV9 is an efficient strategy to mediate long-term therapeutic gene expression in the feline spinal cord. Lastly, injecting 10 times more scAAV9 vector (1×10^{13} vg/kg) in one affected $\text{lixl}^{-/-}$ cat (C13) (Figs. 4A,B) resulted in ≈ 4 to 5 times more vector genome per cell (0.93 ± 0.21 copies/cell) and ≈ 5 times more VEGF expression (43.1 ± 18 pg/mg of total proteins) over the 1×10^{12} vg/kg dose of scAAV9 in the spinal cord after 200 days pi. Yet, despite this high level achieved (≈ 30 fold more than the uninjected cat level) and

long term expression of VEGF in the spinal cord, no phenotypic benefit was seen in the two affected cats (C12 and C13) (supplementary Fig. S3). These results were confirmed by motor neuron axon counts in the ventral root at the C6 level of the spinal cord of the injected C13 $lxl^{+/-}$ cat and axon morphometric analysis that showed no increase of the number of motor axons, especially of large caliber ($>10\mu m$) in VEGF-injected C13 cat compared with uninjected affected cats of the same age (supplementary Fig. S4).

Intracisternal vs intravenous delivery of scAAV9 results in ~fifty times more vector copies per cell in the spinal cord.

Since we previously reported MN transductions after IV administration of 1×10^{12} vg/kg of scAAV9.gfp in adult cats (Duque *et al.*, 2009), we decided to compare ICis and IV administration of the same dose of scAAV9.vgef. For this, three 7 weeks old $lxl^{+/-}$ cats (C14, C15, C16) received 1×10^{12} vg/kg of scAAV9.vgef into the jugular vein and results were compared with the ICis delivery group (C9, C10, C11). One hundred days later, the number of vector copies per cell was found ≈ 50 times higher after ICis delivery with a mean of 0.19 ± 0.03 copies/cell vs $3 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$ copies/cell after IV delivery of the same vector dose (Fig. 4A). Accordingly, the IV route resulted in a lack of detectable recombinant VEGF protein in the spinal cord (Fig. 4B).

Finally, we looked at whether one log higher dose of scAAV9.vgef vector injected IV at a neonatal permissive age (Foust *et al.* 2010) could transfer the vgef cDNA in the feline spinal cord. Neonatal IV injections of 1×10^{13} vg/kg of scAAV9.vgef were performed in two $lxl^{+/-}$ (C17, C18) and two $lxl^{-/-}$ (C19, C20) 2-day old kittens (Table 1). We found 0.07 ± 0.03 copies/cell, $n=2$ (100 days pi) and 0.02 ± 0.004 , $n=2$ (200 days pi) in the spinal cord of heterozygous and homozygous animals, respectively (Fig. 4C). Although more vector genomes per cell were found in the spinal cord of injected newborns compared with the adult group, no recombinant VEGF protein was detected in

the spinal cord after neonatal IV injection of 1×10^{13} vg/kg scAAV9.vegf (Fig. 4D). Additionally, no clinical improvement was observed in the two affected cats (C19 and C20) (supplementary Fig. S3).

Intracisternal delivery of scAAV9 results in transduction of motor neurons in the spinal cord as well as neurons in the cerebellum, the cortex and the thalamus.

To confirm that scAAV9 is able to target MNs after intracisternal delivery in cats and to determine the distribution of the transduced cells in the whole CNS, two adult $lxl^{+/-}$ cats were injected in the cisterna magna with 1×10^{12} vg/kg of a scAAV9 vector encoding the green fluorescent protein (GFP). GFP expressing cells were observed in the cervical and the lumbar portions of spinal cord at 30 days pi (Fig. 5). Double-staining combining GFP detection and an antibody raised against choline acetyltransferase (ChAT) revealed that MNs were efficiently transduced in the cervical and lumbar segments of the spinal cord (Fig. 5). GFP-positive neurons were also observed in brain structures such as the cerebellum, the thalamus, the sensory and motor cortex, especially in neurons of the layer 5 (supplementary Fig. S2). In the cerebellum, Purkinje cells expressed mainly GFP (supplementary Fig. 2A). In the brainstem, the GFP protein was localized in axonal tracts.

Off-target VEGF expression after intracisternal delivery of scAAV9 vector.

We finally wondered if ICis delivery could result in a restricted transduction pattern, *i.e.* limited to the CNS. VEGF concentration was measured in the nerves, the skeletal muscles (*triceps brachii* and *biceps femoris*) and the liver of the adult cats intracisternally injected with 1×10^{12} vg/kg (C9, C10, C11, C12) and 1×10^{13} vg/kg (C13) of scAAV9.vegf (Fig. 6). The IV injected cats receiving 1×10^{12} vg/kg of the vector represented the comparative group (C14, C15, C16). The ICis cats exhibited 33.8 ± 9.1 pg (C9, C10, C11, C12) and 75.14 ± 20.54 pg (C13) of murine VEGF per mg of total protein extracts from the peripheral nerves of the forelimb (ulnar and radial nerves) and the hindlimb (sciatic, femoral and tibial nerves) whereas ≈ 6 times less murine VEGF expression was

detected in the same tissues in the IV group when compared to C9, C10, C11, C12 cats (mean of 5 ± 2.5 pg/mg of total protein) (Fig. 6A).

When we looked for the presence of recombinant VEGF in the *triceps brachii*, *biceps femoris* muscles and the liver, only the C13 cat showed a measurable level of the murine transgene product in the latter (2.55 ± 0.05 pg/mg). Similar levels were found in livers and skeletal muscles from the IV cats group that had received 10 times less vector (4.1 ± 0.6 pg/mg and 3.5 ± 0.08 pg/mg, respectively) (Figs. 6B, C).

Another critical point in evaluating a delivery route is the exposure of the vector to the host immune system since gene therapy efficacy can be limited by immunotoxicity. As shown in Table 2 and despite an immunosuppressive regimen, the ICis route resulted in the detection of AAV9 capsid neutralizing antibodies in the sera as high as after IV administration. Yet, no antibodies against the murine VEGF could be detected by Western blot when incubated with serum from ICis and IV-injected cats (data not shown). Despite the presence of neutralizing antibodies in the serum of the ICis and IV-injected animals, none were detected in the CSF (Table 2).

Discussion

The main goal of this study was to test the therapeutic efficiency of a neuroprotective factor, the VEGF protein, in a LIX1-deficient cat - a large animal model of lower MN disease - using different modes of AAV delivery into the CNS. We found no clinical benefit in $lix1^{-/-}$ cats after ICra, ICis or IV injections of AAV-VEGF.

The lack of therapeutic benefit could not likely be attributed to the levels of VEGF expression in the spinal cord since it was found 10 to 30 times higher in ICis-injected cats than in $lix1^{-/-}$ uninjected animals at a concentration previously shown to exhibit both neuroprotective and vascular activities in the CNS (Wang *et al.*, 2005). The absence of clinical benefit could also not be related to inflammation-mediated instability of the transgene expression since no signs of inflammation were detected in the spinal cord of the cat $lix1^{-/-}$ C13 after hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining and after "ionized calcium-binding adapter molecule 1" (IBA1) immunostaining, a marker upregulated in activated macrophages/ microglia (Ito *et al.*, 1998)(data not shown). These results suggest that the neuroprotective activity of VEGF has no impact on motor axonal growth defect described in the LIX1 cat (Wakeling *et al.*, 2011). Interestingly, another well-known neuroprotective factor, *i.e.* insulin growth factor 1 (IGF1), was also recently described to be ineffective to treat neuro-muscular junction abnormalities and to improve motor function in type III SMA mice (Tsai *et al.* 2012) suggesting that growth factor overexpression in the spinal cord is not sufficient to treat motor axonal defects and muscle denervation.

On the other hand, our study clearly provides evidences that AAV ICis delivery is an efficient strategy to mediate high transduction of the whole spinal cord including MNs in a large animal model. Although ICra injections of AAV1 resulted in the presence of detectable vector DNA in the spinal cord, recombinant DNA was found predominantly in the cortex *i.e.* at the injection sites. Our results confirm that AAV1 is efficient in the cat brain (Vite *et al.*, 2003) and could target upper motor neurons (Hutson *et al.*, 2012) resulting in anterograde transport of AAV particles in axons of

the cortico-spinal tract as previously described (Ciron *et al.*, 2009; Foust *et al.*, 2008; Salegio *et al.*, 2013). However, the efficiency of such strategy is too low to achieve high transduction of the spinal cord probably because a part of the viral genome is trapped in axons without being translated. These results indicate that ICra AAV injection is likely not an effective delivery route to transfer a therapeutic AAV vector to the whole spinal cord.

A promising alternative to target the MNs is the IV administration of AAV vectors, especially with AAV9 serotype (Bevan *et al.* 2011; Dominguez *et al.* 2011; Duque *et al.* 2009; Foust *et al.* 2009; Foust *et al.* 2010; Gray *et al.* 2011b; Valori *et al.* 2010). If our study confirmed that transduction of the spinal cord occurs in neonatal and adult cats after scAAV9 systemic injection as previously described (Duque *et al.* 2009), yet, the level of transgene expression remained low both in the adult and neonate-injected animals. Indeed, transduction was detected essentially in peripheral tissues, *i.e.* liver. Therefore, if for instances severe phenotypes of MN diseases such as type I SMA may require such transduction profile (Hua *et al.*, 2011; Shababi *et al.*, 2010; Vitte *et al.*, 2004), IV delivery may be relevant.

In contrast, the intracisternal route of injection resulted in strong expression of the transgene in the spinal cord of our cat model, even at the lowest dose of 10^{12} vg/kg. Interestingly, although AAV1 was not previously shown to be particularly efficient to transduce motor neurons after intraspinal or intrathecal delivery in rodents (Iwamoto *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2011), VEGF expression was found in the feline spinal cord after AAV1.vegf ICis delivery in contrast to ICra injections. These results suggested that AAV1 vectors delivered in the CSF can directly transduce neurons of the spinal cord as previously described for the sensory neurons of the DRG with different AAV serotypes (Fu *et al.*, 2010; Iwamoto *et al.*, 2009; Storek *et al.*, 2008; Towne *et al.*, 2009; Vulchanova *et al.*, 2010). Known to have a certain propensity to cross complex biological barriers such as the brain blood barrier, AAV9 may also have an increase ability to traverse the pia mater and astrocyte layer that separates the spinal cord from the CSF.

Another potential advantage using this local regional delivery route is the limited off-target expression, *i.e.* in the liver and muscles. Lastly, this strategy resulted in high transgene expression in peripheral nerves suggesting an anterograde transport of the recombinant protein all along the axons, which in turn may have a therapeutic impact on neurodegenerative diseases characterized by defects of axonal growth process.

These results are consistent with two recent studies that compared intra-vascular and ICis delivery of scAAV9 in mice (Glascock *et al.*, 2012) and in primates (Samaranch *et al.*, 2013; Samaranch *et al.*, 2011). They indeed both showed that delivery of scAAV9 vectors in the CSF mediates higher transgene expression respectively in the spinal cord of a murine model of SMA and in the spinal cord, the cortex and the cerebellum of primates. We found also numerous GFP-positive neurons in the same localization in the brain, *i.e.* the cortex and the cerebellum as well as in the thalamus suggesting that this route of delivery could be relevant for the treatment of neurodegenerative disorders affecting simultaneously the spinal cord and the brain.

In conclusion, the present study identified AAV ICis delivery as an efficient method to mediate high transduction of the spinal cord, the brain and the nerves of a large animal model while reducing peripheral off-target transduction.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

We would like to thank Lydie Guigand and Mireille Ledevin of the UMR703 Laboratory for their assistance with autopsies and congelation of samples. We thank also Oumeya Adjali who carefully read this article and provided us critical comments.

This work was supported by the «Association Française contre les Myopathies » (AFM) and SMA-Europe.

Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

References

- Azzouz, M., Ralph, G. S., Storkebaum, E., Walmsley, L. E., *et al.* (2004). VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429, 413-7.
- Bevan, A. K., Duque, S., Foust, K. D., Morales, P. R., *et al.* (2011). Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther* 19, 1971-80.
- Borasio, G. D., Robberecht, W., Leigh, P. N., Emile, J., *et al.* (1998). A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* 51, 583-6.
- Brockington, A., Wharton, S. B., Fernando, M., Gelsthorpe, C. H., *et al.* (2006). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 26-36.
- Ciron, C., Cressant, A., Roux, F., Raoul, S., *et al.* (2009). AAV1-, AAV2- and AAV5-Mediated human alpha-Iduronidase Gene Transfer In The Brain of Nonhuman Primate: Vector Diffusion and Bio Distribution. *Hum Gene Ther*.
- Ciron, C., Desmaris, N., Colle, M. A., Raoul, S., *et al.* (2006). Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Ann Neurol* 60, 204-13.
- Devos, D., Moreau, C., Lassalle, P., Perez, T., *et al.* (2004). Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. *Neurology* 62, 2127-9.
- Dodge, J. C., Haidet, A. M., Yang, W., Passini, M. A., *et al.* (2008). Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Mol Ther* 16, 1056-64.
- Dominguez, E., Marais, T., Chatauret, N., Benkhelifa-Ziyyat, S., *et al.* (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum Mol Genet* 20, 681-93.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., *et al.* (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 17, 1187-96.
- Federici, T., Taub, J. S., Baum, G. R., Gray, S. J., *et al.* (2011). Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene Ther*.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., Lecouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-76.
- Foust, K. D., Flotte, T. R., Reier, P. J., Mandel, R. J. (2008). Recombinant adeno-associated virus-mediated global anterograde delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor to the spinal cord: comparison of rubrospinal and corticospinal tracts in the rat. *Hum Gene Ther* 19, 71-82.
- Foust, K. D., Nurre, E., Montgomery, C. L., Hernandez, A., *et al.* (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 27, 59-65.
- Foust, K. D., Wang, X., McGovern, V. L., Braun, L., *et al.* (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* 28, 271-4.
- Fu, H., Dirosario, J., Kang, L., Muenzer, J., *et al.* (2010). Restoration of central nervous system alpha-N-acetylglucosaminidase activity and therapeutic benefits in mucopolysaccharidosis IIIB mice by a single intracisternal recombinant adeno-associated viral type 2 vector delivery. *J Gene Med* 12, 624-33.
- Fyfe, J. C., Menotti-Raymond, M., David, V. A., Brichta, L., *et al.* (2006). An approximately 140-kb deletion associated with feline spinal muscular atrophy implies an essential LIX1 function for motor neuron survival. *Genome Res* 16, 1084-90.

- 1
- 2
- 3 Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., *et al.* (2003). A protein interaction map of
- 4 *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-36.
- 5 Glascock, J. J., Osman, E. Y., Wetz, M. J., Krogman, M. M., *et al.* (2012). Decreasing Disease
- 6 Severity in Symptomatic, *Smn*(-/-);*SMN2*(+/+), Spinal Muscular Atrophy Mice Following
- 7 scAAV9-SMN Delivery. *Hum Gene Ther*.
- 8 Gozes, Y., Moayeri, M., Wiggins, J. F., Leppa, S. H. (2006). Anthrax lethal toxin induces
- 9 ketotifen-sensitive intradermal vascular leakage in certain inbred mice. *Infect Immun* 74,
- 10 1266-72.
- 11 Gray, S. J., Foti, S. B., Schwartz, J. W., Bachaboina, L., *et al.* (2011a). Optimizing promoters for
- 12 recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central
- 13 nervous system using self-complementary vectors. *Hum Gene Ther* 22, 1143-53.
- 14 Gray, S. J., Matagne, V., Bachaboina, L., Yadav, S., *et al.* (2011b). Preclinical differences of
- 15 intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and
- 16 nonhuman primates. *Mol Ther* 19, 1058-69.
- 17 Greenberg, D. A., Jin, K. (2005). From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438, 954-9.
- 18 He, Q., Lowrie, C., Shelton, G. D., Castellani, R. J., *et al.* (2005). Inherited motor neuron disease in
- 19 domestic cats: a model of spinal muscular atrophy. *Pediatr Res* 57, 324-30.
- 20 Hollis, E. R., 2nd, Kadoya, K., Hirsch, M., Samulski, R. J., *et al.* (2008). Efficient retrograde
- 21 neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. *Mol Ther* 16, 296-301.
- 22 Hua, Y., Sahashi, K., Rigo, F., Hung, G., *et al.* (2011). Peripheral SMN restoration is essential for
- 23 long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478, 123-6.
- 24 Hutson, T. H., Verhaagen, J., Yanez-Munoz, R. J., Moon, L. D. (2012). Corticospinal tract
- 25 transduction: a comparison of seven adeno-associated viral vector serotypes and a non-
- 26 integrating lentiviral vector. *Gene Ther* 19, 49-60.
- 27 Ito, D., Suzuki, N. (2011). Conjoint pathologic cascades mediated by ALS/FTLD-U linked RNA-
- 28 binding proteins TDP-43 and FUS. *Neurology* 77, 1636-43.
- 29 Ito, Y., Yamamoto, M., Li, M., Doyu, M., *et al.* (1998). Differential temporal expression of mRNAs
- 30 for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-
- 31 6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured
- 32 peripheral nerves. *Brain Res* 793, 321-7.
- 33 Iwamoto, N., Watanabe, A., Yamamoto, M., Miyake, N., *et al.* (2009). Global diffuse distribution
- 34 in the brain and efficient gene delivery to the dorsal root ganglia by intrathecal injection of
- 35 adeno-associated viral vector serotype 1. *J Gene Med* 11, 498-505.
- 36 Jablonka, S., Rossoll, W., Schrank, B., Sendtner, M. (2000). The role of SMN in spinal muscular
- 37 atrophy. *J Neurol* 247 Suppl 1, 137-42.
- 38 Kariya, S., Park, G. H., Maeno-Hikichi, Y., Leykekhman, O., *et al.* (2008). Reduced SMN protein
- 39 impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular
- 40 atrophy. *Hum Mol Genet* 17, 2552-69.
- 41 Kaspar, B. K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J. D., *et al.* (2003). Retrograde viral delivery of
- 42 IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301, 839-42.
- 43 Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., *et al.* (2003). VEGF is a modifier
- 44 of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against
- 45 ischemic death. *Nat Genet* 34, 383-94.
- 46 Lauria, G., Campanella, A., Filippini, G., Martini, A., *et al.* (2009). Erythropoietin in amyotrophic
- 47 lateral sclerosis: a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and
- 48 tolerability. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 410-5.
- 49 Lunn, M. R., Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371, 2120-33.
- 50 Mcwhorter, M. L., Monani, U. R., Burghes, A. H., Beattie, C. E. (2003). Knockdown of the
- 51 survival motor neuron (*Smn*) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth
- 52 and pathfinding. *J Cell Biol* 162, 919-31.
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
- 2
- 3 Miller, R. G., Bryan, W. W., Dietz, M. A., Munsat, T. L., *et al.* (1996). Toxicity and tolerability of
- 4 recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis.
- 5 *Neurology* 47, 1329-31.
- 6 Murohara, T., Horowitz, J. R., Silver, M., Tsurumi, Y., *et al.* (1998). Vascular endothelial growth
- 7 factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and
- 8 prostacyclin. *Circulation* 97, 99-107.
- 9 Ochs, G., Penn, R. D., York, M., Giess, R., *et al.* (2000). A phase I/II trial of recombinant
- 10 methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to
- 11 patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron*
- 12 *Disord* 1, 201-6.
- 13 Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., *et al.* (2001). Deletion of the hypoxia-
- 14 response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron
- 15 degeneration. *Nat Genet* 28, 131-8.
- 16 Rabinowitz, J. E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., *et al.* (2002). Cross-packaging of a single adeno-
- 17 associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables
- 18 transduction with broad specificity. *J Virol* 76, 791-801.
- 19 Robinson, S. D., Reynolds, L. E., Wyder, L., Hicklin, D. J., *et al.* (2004). Beta3-integrin regulates
- 20 vascular endothelial growth factor-A-dependent permeability. *Arterioscler Thromb Vasc*
- 21 *Biol* 24, 2108-14.
- 22 Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A. K., *et al.* (2003). Smn, the spinal muscular
- 23 atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin
- 24 mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163, 801-12.
- 25 Salegio, E. A., Samaranch, L., Kells, A. P., Mittermeyer, G., *et al.* (2013). Axonal transport of
- 26 adeno-associated viral vectors is serotype-dependent. *Gene Ther* 20, 348-52.
- 27 Samaranch, L., Salegio, E. A., San Sebastian, W., Kells, A. P., *et al.* (2013). Strong Cortical and
- 28 Spinal Cord Transduction after Aav7 and Aav9 Delivery into the Csf of Non-Human
- 29 Primates. *Hum Gene Ther*.
- 30 Samaranch, L., Salegio, E. A., San Sebastian, W., Kells, A. P., *et al.* (2011). AAV9 Transduction In
- 31 The Central Nervous System Of Non-Human Primates. *Hum Gene Ther*.
- 32 Sathasivam, S. (2008). VEGF and ALS. *Neurosci Res* 62, 71-7.
- 33 Shababi, M., Habibi, J., Yang, H. T., Vale, S. M., *et al.* (2010). Cardiac defects contribute to the
- 34 pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum Mol Genet* 19, 4059-71.
- 35 Snider, S. R. (1961). A stereotaxic atlas of the cat brain. The university of chicago Press.
- 36 Snyder, B. R., Gray, S. J., Quach, E. T., Huang, J. W., *et al.* (2011). Comparison of adeno-
- 37 associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Hum Gene*
- 38 *Ther* 22, 1129-35.
- 39 Storek, B., Reinhardt, M., Wang, C., Janssen, W. G., *et al.* (2008). Sensory neuron targeting by self-
- 40 complementary AAV8 via lumbar puncture for chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105,
- 41 1055-60.
- 42 Storkebaum, E., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Moreno-Murciano, M. P., *et al.* (2005). Treatment
- 43 of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of
- 44 ALS. *Nat Neurosci* 8, 85-92.
- 45 Towne, C., Pertin, M., Beggah, A. T., Aebischer, P., *et al.* (2009). Recombinant adeno-associated
- 46 virus serotype 6 (rAAV2/6)-mediated gene transfer to nociceptive neurons through different
- 47 routes of delivery. *Mol Pain* 5, 52.
- 48 Towne, C., Schneider, B. L., Kieran, D., Redmond, D. E., Jr., *et al.* (2010). Efficient transduction of
- 49 non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV
- 50 serotype 6. *Gene Ther* 17, 141-6.
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
- 2
- 3 Valori, C. F., Ning, K., Wyles, M., Mead, R. J., *et al.* (2010). Systemic delivery of scAAV9
- 4 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2,
- 5 35ra42.
- 6 Van Blitterswijk, M., Landers, J. E. (2010). RNA processing pathways in amyotrophic lateral
- 7 sclerosis. *Neurogenetics* 11, 275-90.
- 8 Vite, C. H., Passini, M. A., Haskins, M. E., Wolfe, J. H. (2003). Adeno-associated virus vector-
- 9 mediated transduction in the cat brain. *Gene Ther* 10, 1874-81.
- 10 Vitte, J. M., Davoult, B., Roblot, N., Mayer, M., *et al.* (2004). Deletion of murine Smn exon 7
- 11 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload.
- 12 *Am J Pathol* 165, 1731-41.
- 13 Vulchanova, L., Schuster, D. J., Behur, L. R., Riedl, M. S., *et al.* (2010). Differential adeno-
- 14 associated virus mediated gene transfer to sensory neurons following intrathecal delivery by
- 15 direct lumbar puncture. *Mol Pain* 6, 31.
- 16 Wakeling, E. N., Joussemet, B., Costiou, P., Fanuel, D., *et al.* (2011). Failure of lower motor neuron
- 17 radial outgrowth precedes retrograde degeneration in a feline model of SMA. *J Comp*
- 18 *Neurol.*
- 19 Wang, Y., Kilic, E., Kilic, U., Weber, B., *et al.* (2005). VEGF overexpression induces post-
- 20 ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain* 128, 52-
- 21 63.
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

Figure legends

FIG. 1. Intracerebral injections of ssAAV1.vegf result in VEGF expression in the motor cortex and in the internal capsule. Results of VEGF transcript and protein detection in the cortex. Each injection site was cut into 100 μ m slices for PCR, RT-PCR and ELISA analyses, each analysis was performed every millimeter **(A)** Results of vegf-specific RT-PCR in the motor cortex and in the internal capsule of the cat C1 injected with 1×10^{12} vg/kg of ssAAV1.vegf in the brain. **(B)** Results of VEGF-specific ELISA test in the motor cortex and in the internal capsule of the cats C2 and C3 injected with 1×10^{12} vg/kg of ssAAV1.vegf in the brain and analyzed respectively at 100 and 200 days pi : results are expressed in pg of VEGF per mg of total proteins. VEGF level in the brain of a non-injected cat : 1.07 ± 0.43 pg/mg of total proteins. Caps, capsule ; ctx, cortex ; p, plasmid ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

FIG. 2. Intracerebral injections of ssAAV1.vegf result in a diffusion of vector DNA and RNA transcripts in the spinal cord and in the nerves. **(A)** Results of vegf-specific PCR and Southern Blot in the spinal cord of the cat C1 injected with 1×10^{12} vg/kg of ssAAV1.vegf in the brain. Analyses were performed on dorsal (1, 2, 3, 4), ventral (6, 7, 8, 9), cervical (1,6), brachial (2, 7), thoracic (3, 8) and lumbar (4, 5 and 9) spinal cord or using VEGF-plasmid (10).

(B) Results of vegf-specific RT-PCR in the spinal cord of the cat C1. Analyses were performed on dorsal (1, 2, 3, 4), ventral (6, 7, 8, 9), cervical (1,6), brachial (2, 7), thoracic (3, 8) and lumbar (4 and 5) spinal cord or using VEGF-plasmid (10). **(c)** Results of vegf-specific PCR and Southern Blot in the nerves of the cat C1. Analyses were performed on radial (11), ulnar (12), tibial (14), femoral (15), sciatic (16) nerves, brachial (13) and lumbar (17) plexus or using VEGF-plasmid (10).

FIG. 3. Intracisternal is superior to ssAAV1 intracerebral injection and intracisternal scAAV9 is superior to ssAAV1 for VEGF delivery to the spinal cord. **(A)** Results of vegf-specific quantitative

PCR in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of 2 ICra-injected (C1-C2) and 2 ICis-injected (C6-C7) cats analyzed at 100 days pi (B) Results of VEGF-specific ELISA test in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of the same animals (C) Results of vegf-specific quantitative PCR in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of 2 cats injected in the *cisterna magna* with 1×10^{12} vg/kg of ssAAV1.vegf (C6-C7) and 3 cats injected in the *cisterna magna* with 1×10^{12} vg/kg of scAAV9.vegf (C9-C11) and analyzed at 100 days pi (D) Results of VEGF-specific ELISA test in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of the same animals. Data were expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were analyzed using two-way ANOVA. *p* values <0.05 were considered significant. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

FIG. 4. Intracisternal is superior to intravenous scAAV9 injection for long-term VEGF delivery to the spinal cord. (A) Results of vegf-specific quantitative PCR in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of four 7 weeks old adult cats injected in the *cisterna magna* with 1×10^{12} vg/kg (C9-C12) or 1×10^{13} vg/kg (C13) of scAAV9.vegf and analyzed at 100 days (C9-C11) or 200 days (C12-C13) pi and 3 cats intravenously injected with 1×10^{12} vg/kg of scAAV9.vegf and analyzed at 100 days pi (C14-C16) (B) Results of VEGF-specific ELISA test in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of the same animals. (C) Results of vegf-specific quantitative PCR in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of 3 kittens injected at 2-day old with 1×10^{13} vg/kg of scAAV9.vegf and analyzed at 100 days (C17-C18) or 200 days (C19-C20) pi (D) Results of VEGF-specific ELISA test in 3 portions (cervical, thoracic, lumbar) of the spinal cord of the same animals. Data were expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were analyzed using two-way ANOVA. *p* values <0.05 were considered significant. *** $p < 0.001$

FIG. 5. Intracisternal delivery of scAAV9.gfp in 7 weeks old cats mediates transgene expression throughout the spinal cord and within MNs. (A) Representative transverse sections of lumbar spinal cord from LIX1 heterozygous cats observed by laser scanning confocal microscopy 30 days after the injection of 1×10^{12} vg/kg of scAAV9-GFP into the *cisterna magna* (arrows: GFP positive MNs, star: dorsal sensory tracts). Scale bar 500 μ m. (B-D) transverse sections of the cat spinal cord with ChAT immunolabeling. colocalisation of ChAT immunolabeled MNs with GFP native fluorescence in MNs was observed in ventral horn (arrow). DF:dorsal funiculus; CC:central canal; VH:ventral horn. Scale bar 100 μ m.

FIG. 6. Intracisternal injections of scAAV9.vegf result in a sustained VEGF expression in the nerves but not in the livers or in the muscles. (A) Results of VEGF-specific ELISA test in the nerves of 4 cats injected in the *cisterna magna* with 1×10^{12} vg/kg (C9-C12) or 1×10^{13} vg/kg (C13) of scAAV9.vegf and analyzed at 100 days (C9-C11) or 200 days (C12-C13) pi and 3 cats intravenously injected with 1×10^{12} vg/kg of scAAV9.vegf and analyzed at 100 days pi (C14-C16). The histograms represent the mean of values measured in different nerves of the forelimbs (ulnar, radial) and of the hindlimbs (femoral, sciatic, tibial) (B) VEGF-specific ELISA test in the muscles (*triceps brachii* and *biceps femoris*) of the same animals (C) VEGF-specific ELISA test in the livers of the same animals. Data were expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were analyzed using two-way ANOVA. *p* values <0.05 were considered significant. ** *p*<0.01, *** *p*<0.001

Supplementary FIG. S1. Miles assay and VEGF Western Blot. (A) Miles assay in a cat, consisting to inject intravenously Evans blue and in the dermis 0.1 ml of PBS, of murine VEGF (VEGFm) at 10, 50, 150 ng or of histamine (H) at 1 μ M. (B) Miles assay in cat with the culture supernatant obtained after transduction of HEK293 with scAAV9-VEGF, scAAV9-VEGF-cmyc and scAAV9-

GFP vector as control. (C) Anti-cmyc Western blot results of GFP transfected cells extract (negative control) and mVEGF164-cmyc transfected cells supernatants. Loads are 50 µg of total proteins for GFP extracts and 2.5 ng, 5 ng and 10 ng of VEGF protein as measured by ELISA for VEGF protein. The expected size for mVEGF164-cmyc monomer is 20 kDa for 164 amino acids. The other forms are 23 kDa for the glycosylated monomer and 40 kDa for the homodimer.

Supplementary FIG. S2. Intracisternal delivery of scAAV9.gfp in 7 weeks old cats mediates transgene expression in the brain neurons. (A) High level of GFP was detectable in the cerebellum both in the deep white matter and in the cerebellar folia, and in the brainstem; GFP was mainly expressed in the Purkinje cells (inset, A). (B-D) Coronal brain sections were counterstained with the nuclear stain TOPRO3. (B) GFP was detectable into the primary motor cortex specifically into large pyramidal neurons (cells of Betz, arrows), (C) thalamic neurons (arrows), and (D) sensory cortex neurons (arrows). (Inset, D) Colocalization of NeuN immunolabeled neurons with GFP native fluorescence. Bars: A = 2mm; inset A = 100 µm; B,C,D = 100 µm; inset D = 25 µm.

Supplementary FIG. S3. Therapeutic effect of intracisternal and neonatal intravenous scAAV9.vegf delivery. The SMA neurological symptoms (A, B) or the EMG abnormalities (C, D) were scored after neonatal IV (A, C) or ICis (B, D) scAAV9.vegf delivery in SMA-affected cats compared with control uninjected animals.

Supplementary FIG. S4. C6 motor neuron axons counts and morphometrics. A: Total number of myelinated axons in C6 ventral root in normal cats (black), affected *lix1*^{-/-} cats (shaded) and injected C13 *lix1*^{-/-} cat (unshaded). B: C6 ventral root axon morphometrics of normal cats (black), affected *lix1*^{-/-} cats (shaded) and injected C13 *lix1*^{-/-} cat (unshaded).

Table 1. Partitioning of cats receiving AAV.vgf vectors by intracerebral, intracisternal and intravenous delivery routes

Age at injection	Injection	AAV serotype and genome	Dose (vg/ kg)	Cat	Genotype	Immunosuppressive regimen	Post-injection time at euthanasia (days)
Young adult (50 days)	Intracerebral	ssAAV1	10 ¹²	C1, C2	+/-	CyA+MMF	100
				C3, C4, C5	-/-		200
	Intracisternal	ssAAV1	10 ¹²	C6, C7	+/-	CyA+MMF	100
				C8	-/-		200
		scAAV9	10 ¹²	C9, C10, C11	+/-	CyA+MMF	100
				C12	-/-		200
				C13	-/-		200
	Intravenous	scAAV9	10 ¹²	C14, C15, C16	+/-	CyA+MMF	100
Newborn (2 days)	Intravenous	scAAV9	10 ¹³	C17, C18	+/-	None	100
				C19, C20	-/-		200
	Uninjected			C21	+/-	None	At 5 months old
				C22, C23, C24	-/-		At 8 months old

Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; C, cat; CyA, cyclosporine A; MMF, mycophenolate mofetyl; ss, simple strand; sc, self complementary; vegf, vascular endothelial growth factor; vg, vector genome.

Table 2. Anti-AAV9 antibodies in cats injected with scAAV9.vgf by intracisternal or intravenous routes

Age at injection	Injection	AAV serotype and genome	Dose (vg/ kg)	Cat	Anti-AAV9 antibodies		
					In serum		In CSF
					Before inj.	After inj.	After inj.
Young adult (50 days)	Intracisternal	scAAV9	10^{12}	C9	<1/10	1/500	<1/10
				C10	<1/10	1/100	<1/10
				C11	<1/10	1/500	<1/10
				C12	<1/10	1/500	<1/10
				C13	<1/10	1/500	<1/10
	Intravenous	scAAV9	10^{12}	C14	<1/10	1/100	NA
				C15	<1/10	1/500	<1/10
				C16	<1/10	1/500	<1/10
Newborn (2 days)	Intravenous	scAAV9	10^{13}	C17	NA	1/5000	<1/10
				C18	NA	1/5000	<1/10

Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; C, cat; inj, injection; CSF, cerebro-spinal fluid; NA, not available; sc, self complementary; vegf, vascular endothelial growth factor; vg, vector genome

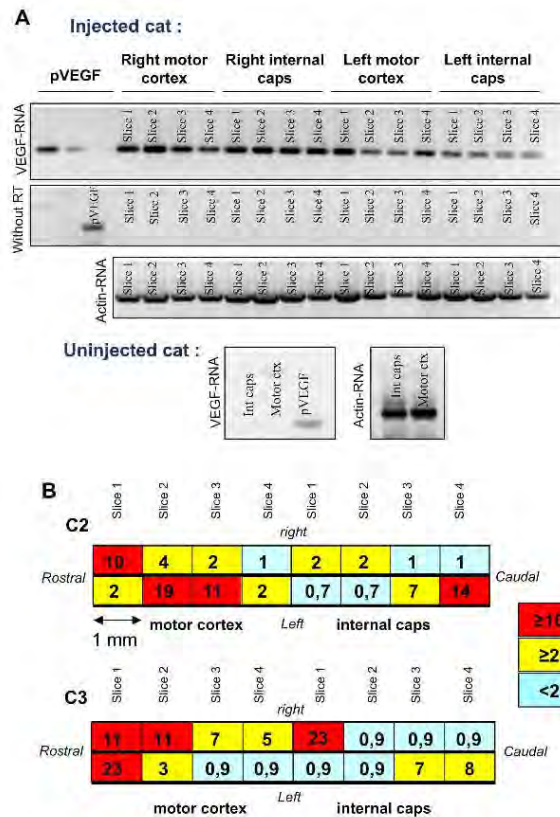
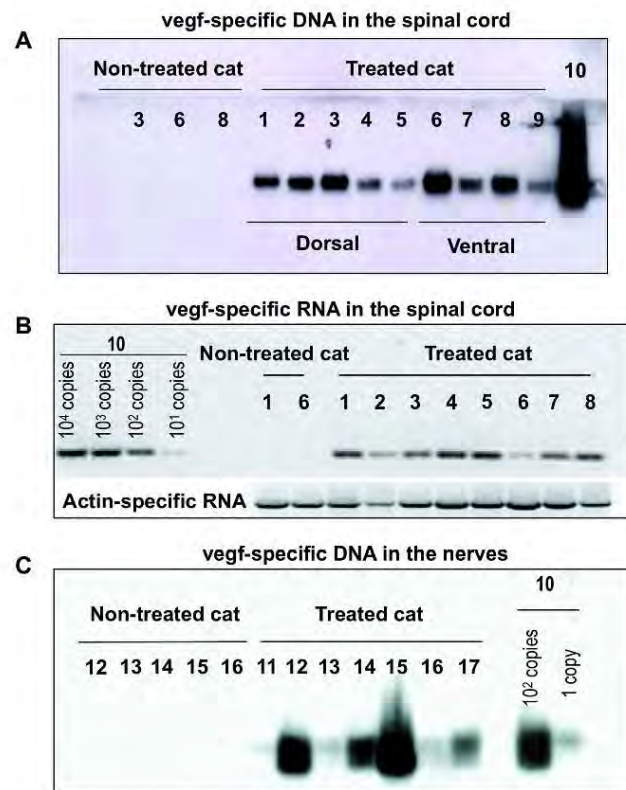
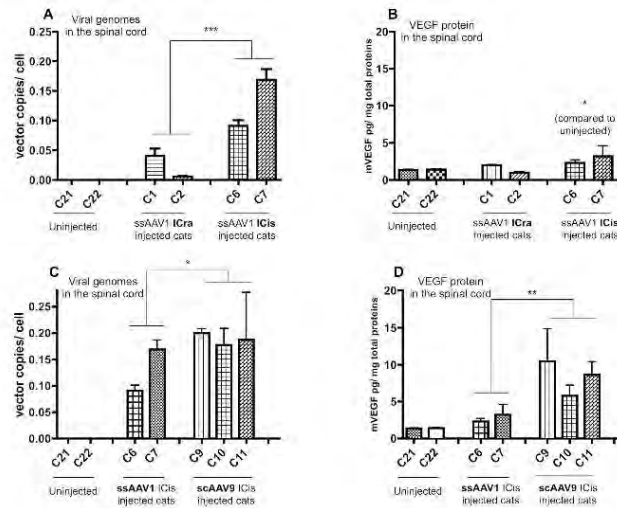


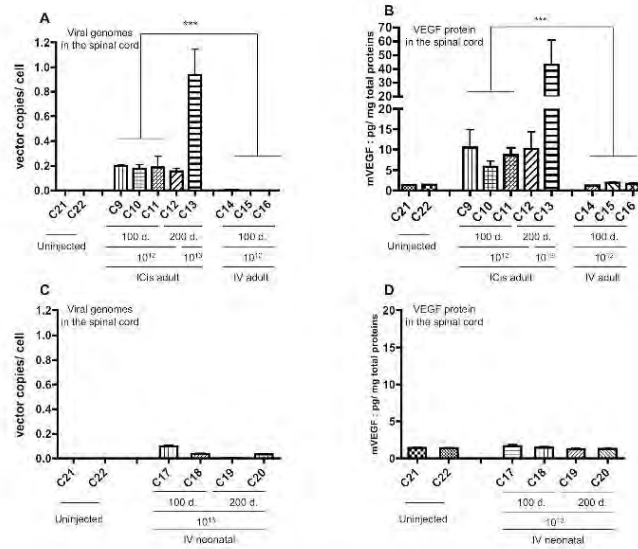
FIG. 1. Intracerebral injections of ssAAV1.vgf result in VEGF expression in the motor cortex and in the internal capsule. Results of VEGF transcript and protein detection in the cortex. Each injection site was cut into 100 μ m slices for PCR, RT-PCR and ELISA analyses, each analysis was performed every millimeter (A) Results of vegf-specific RT-PCR in the motor cortex and in the internal capsule of the cat C1 injected with 1×10^{12} vg/kg of ssAAV1.vgf in the brain. (B) Results of VEGF-specific ELISA test in the motor cortex and in the internal capsule of the cats C2 and C3 injected with 1×10^{12} vg/kg of ssAAV1.vgf in the brain and analyzed respectively at 100 and 200 days pi : results are expressed in pg of VEGF per mg of total proteins. VEGF level in the brain of a non-injected cat : 1.07 ± 0.43 pg/mg of total proteins. Caps, capsule ; ctx, cortex ; p, plasmid ; VEGF, vascular endothelial growth factor. 199x256mm (300 x 300 DPI)



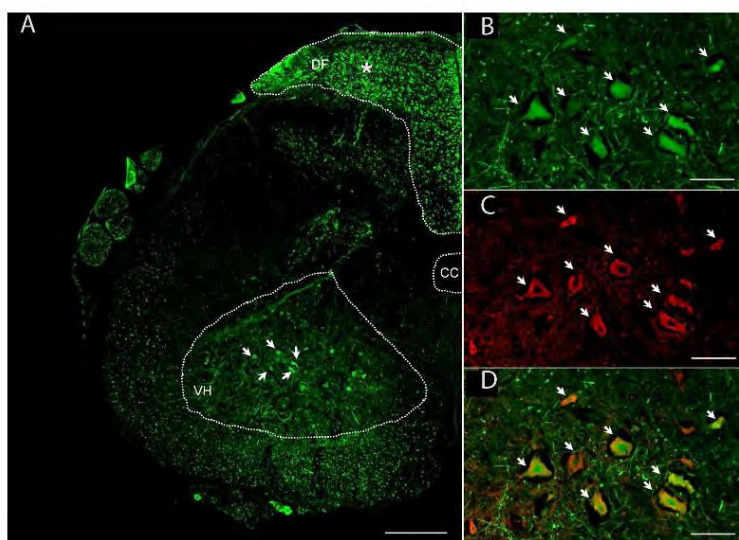
166x199mm (300 x 300 DPI)



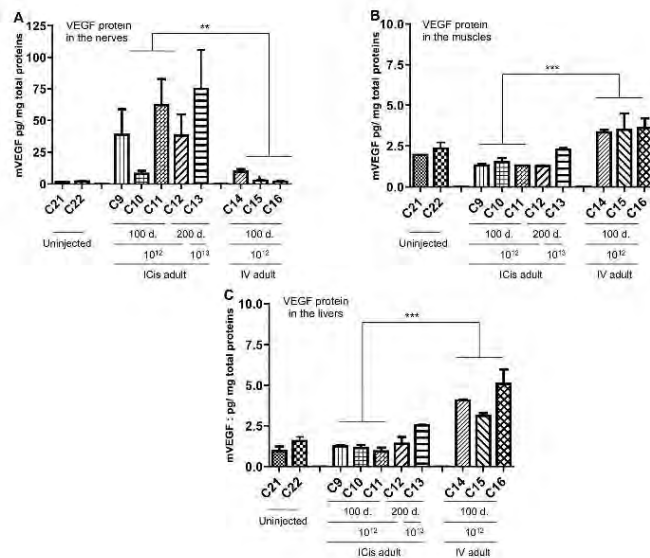
199x149mm (300 x 300 DPI)



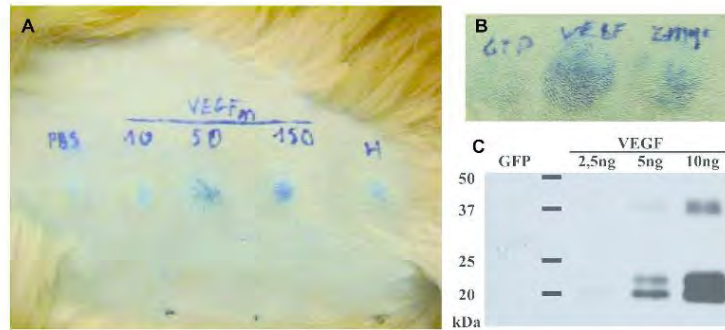
199x149mm (300 x 300 DPI)



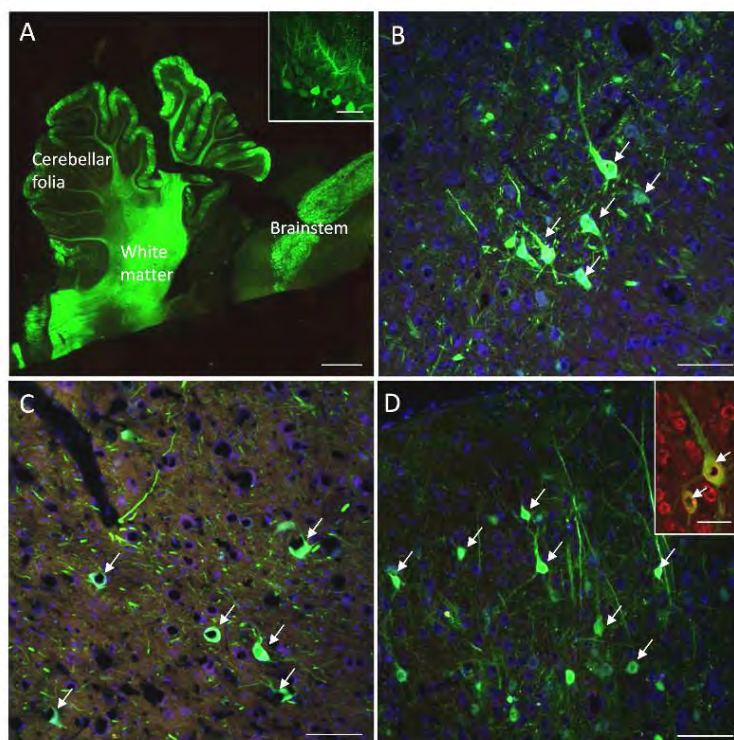
178x129mm (300 x 300 DPI)



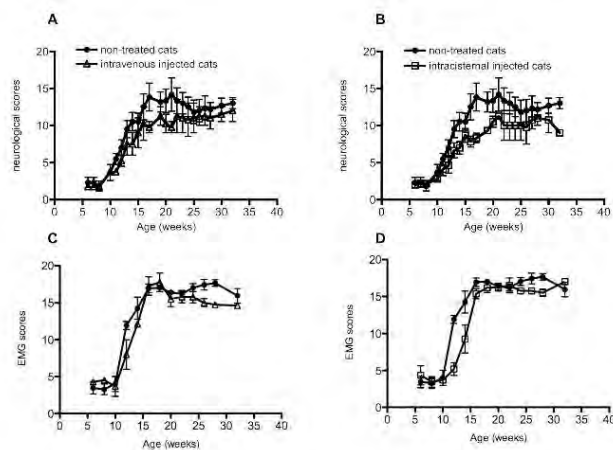
199x149mm (300 x 300 DPI)



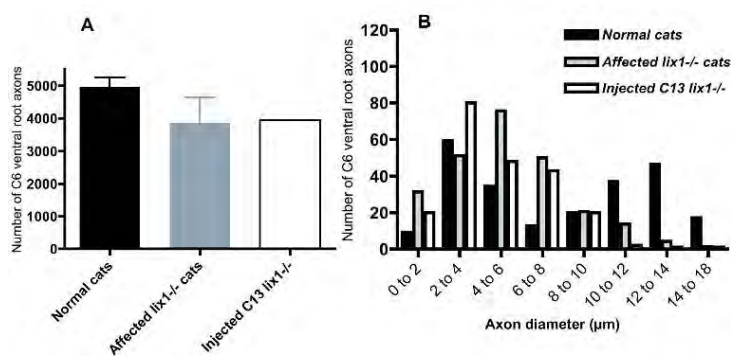
199x92mm (300 x 300 DPI)



164x164mm (300 x 300 DPI)



199x149mm (300 x 300 DPI)



199x105mm (300 x 300 DPI)

II.3 Transfert du gène LIX1 par injections intraveineuse et intracisternale d'AAV9 chez le chat LIX1 nouveau-né

II.3.1 Objectifs et stratégie expérimentale

La deuxième partie de cette étude a eu pour objectif de tester l'impact thérapeutique d'une réintroduction du gène LIX1 chez le chat LIX1^{-/-} nouveau-né à l'aide d'injections d'AAV9 recombinant pour le cDNA fLIX1.

Choix du gène LIX1

Les résultats de la première partie de l'étude ont indiqué l'absence d'effet thérapeutique du VEGF dans le modèle félin LIX1 après injections de vecteurs AAV, malgré (i) la fonctionnalité du mVEGF chez le chat (Bucher 2013, données supplémentaires), et (ii) une forte expression du transgène mVEGF dans la moelle des chats injectés, en particulier après injection ICis d'AAV9. Il était donc nécessaire de changer de transgène pour obtenir une amélioration phénotypique par thérapie génique.

Parallèlement à cette étude, l'équipe de John Fyfe qui a initialement découvert le modèle félin, a réussi, en 2006, à identifier chez le chat malade une délétion d'environ 140 kb affectant en particulier le gène LIX1, pour *limb expression 1* ([Fyfe 2006](#)). Suite à cette découverte, l'apport dans la moelle du cDNA fLIX1 a été entrepris en collaboration avec l'équipe de John Fyfe, par administration de vecteur AAV9 afin (i) d'évaluer l'impact thérapeutique de la réintroduction du gène fLIX1 et de confirmer ainsi l'implication de LIX1 dans la pathogénie de la maladie féline, et (ii) de comparer les deux voies d'injection IV et ICis de vecteur AAV9 chez le chat nouveau-né.

Choix des modes d'injection

Dans un premier temps, nous avons utilisé des injections IV néonatales de vecteur scAAV9 recombinant pour le cDNA fLIX1 dans la moelle de chats LIX1^{-/-}. En effet, les données dont nous disposions en entamant cette étude, en particulier celles concernant l'observation de la GFP sur coupes de moelle, montraient une transduction d'un certain nombre de MN tout le long de la moelle chez le chat et la souris après administration IV de

vecteur AAV9 ([Duque 2009](#)). Cette voie a par ailleurs été utilisée chez la souris SMN Δ 7 en période néonatale pour obtenir des améliorations phénotypiques sans précédent grâce au transfert du gène SMN à l'aide de vecteurs AAV9 ([Foust 2010](#), [Valori 2010](#), [Dominguez 2011](#)). La voie IV néonatale permet également de faire exprimer précocement le produit du transgène dans un grand nombre d'organes périphériques. Or, comme dans le cas des formes sévères de SMA pour lesquelles une expression de SMN peut être nécessaire dans le foie ([Vitte 2004](#), [Hua 2011](#)) ou le cœur ([Bevan 2010](#), [Shababi 2012](#)), il n'est pas exclu chez le chat qu'une absence d'expression de LIX1 en périphérie, en particulier dans les muscles, contribue à la dénervation musculaire. De ce fait, nous avons choisi dans un premier temps de tester des administrations IV néonatales de vecteurs scAAV9-LIX1. Dans un second temps, nous avons utilisé des injections ICis suite auxquelles nous avons montré chez le chat adulte la plus forte efficacité en termes de niveau d'expression dans la moelle.

Choix de l'âge d'injection

La première étude décrivant le gène LIX1 et son expression a suggéré une fonction précoce au niveau du développement embryonnaire des membres ([Swindell 2001](#)). Toutefois, les premiers symptômes détectables de la pathologie féline apparaissent vers l'âge de 8 semaines ([He 2005](#), [Wakeling 2012](#)). De plus, la progression des symptômes chez le chat LIX1 semble indiquer un défaut de maturation des axones plus qu'un problème de développement et de mise en place du circuit neuronal ([Wakeling 2012](#)), de façon très similaire aux hypothèses les plus récentes concernant la pathogénèse de la SMA ([Fallini 2012a](#)). Cependant, pour ne pas écarter un rôle précoce de LIX1 dans cette maturation axonale, nous avons décidé de réaliser les injections LIX1 en période néonatale, c'est-à-dire dans les quatre jours suivant la naissance des chatons.

Choix du promoteur

Pour faire exprimer la protéine LIX1 dans les MN félins, nous avons choisi un promoteur fort et ubiquitaire, le CMV, dont nous avons précédemment validé l'efficacité après injection IV d'AAV9-GFP chez le chat, aboutissant à 39% de MN transduits chez le nouveau-né ([Duque 2009](#)). Par ailleurs, une expression plus robuste de GFP a été décrite avec le CMV dans les MN de souris adultes, comparée à celle obtenue avec le CAG, un promoteur hybride

contenant les éléments précoces du CMV et le promoteur de la β -actine du poulet, pourtant connu pour son efficacité dans le SNC ([Snyder 2011](#)).

Choix des techniques de suivi phénotypique

Les chats LIX1^{-/-} injectés ont été suivis par des examens neurologiques et électromyographiques, comme décrits précédemment au cours de l'analyse du transfert du gène mVEGF dans la moelle. Pour compléter dans cette étude l'évaluation phénotypique des chats, nous avons décidé de réaliser des mesures de la composante musculaire du potentiel d'action (CMAP) pour quantifier l'état d'innervation des muscles, et une analyse histologique des axones moteurs dans les racines ventrales de la moelle lombaire ([Wakeling 2012](#)). Nous avons de plus mis au point une analyse accélérométrique grâce à l'appareil Locometrix® (Centaure Metrix), qui permet en théorie d'évaluer la démarche des chats et qui présente l'avantage de tenir compte de l'aspect dynamique et comportemental des animaux ([Auvinet 2006](#), [Barthélémy 2011](#), [Barthélémy 2012](#)).

Choix de la durée de suivi post-injection

Nous avons fixé la durée post-injection de suivi des animaux à 150 j (21 semaines) pour plusieurs raisons. À cet âge, les symptômes sont clairement présents et il est possible de déterminer cliniquement la sévérité de la maladie pour chaque individu. De plus, le nombre d'axones moteurs des racines ventrales de la moelle lombaire est significativement réduit chez les chats LIX1^{-/-} malades par rapport aux chats sains ([Wakeling 2012](#)).

En considérant l'ensemble de ces arguments, nous avons décidé de réaliser des injections IV et ICis néonatales de vecteurs scAAV9-CMV-fLIX1 chez des chats LIX1^{-/-}, et d'en évaluer l'impact thérapeutique.

II.3.2 Matériel et méthodes

Plasmides et vecteurs recombinants fLIX1

Le cDNA fLIX1 (référence NCBI pour la séquence complète de l'ARN messager LIX1 félin de 3785 bp : [DQ250154](#)) a été obtenu auprès de John Fyfe de l'université du Michigan (Laboratory of Comparative Medical Genetics, East Lansing, Michigan) ([Fyfe 2006](#)). Des plasmide-vecteurs basés sur le génome sc de l'AAV2 ont ainsi été clonés avec le cDNA fLIX1 sous le contrôle du promoteur CMV, et suivi d'un signal de polyadénylation (polyA) issu du SV40. Le génome recombinant contenant le CMV a ensuite été empaqueté dans des capsides AAV9 au centre de production de vecteurs du laboratoire (<http://www.vectors.univ-nantes.fr/>), selon une méthode décrite précédemment ([Rabinowitz 2002](#)). Les particules virales produites ont été titrées par dot-blot avec une sonde LIX1, indiquant une quantité de particules virales définies par leur génome (vg/ml) et par RCA permettant d'obtenir le nombre de particules infectieuses (pi/ml). Pour les injections ICis nécessitant des titres élevés et des volumes limités certains lots de vecteurs ont été concentrés grâce à des colonnes de centrifugation [Amicon Ultra-15 de 100 kD](#) (Merck Millipore).

Détection de la protéine fLIX1-cmyc in vitro

Pour l'ensemble des tests *in vitro*, les constructions LIX1 utilisées contiennent l'épitope cmyc (obtenu auprès de Génethon) accolé à la partie 3' du cDNA fLIX1 pour former une protéine de fusion LIX1-cmyc facilement détectable en utilisant un anticorps dirigé contre l'épitope cmyc.

Transfections

La fonctionnalité des plasmides-vecteurs LIX1 a été vérifiée par transfection de cellules HEK293 au phosphate de calcium. Les cellules sont récoltées 48 heures après et fractionnées par une centrifugation de 5 min à 1000 G : les culots cellulaires sont extraits avec du TBS-SDS. Les témoins positifs sont des surnageants de cellules transfectées avec un plasmide VEGF-cmyc de concentration connue en VEGF. Les différents échantillons sont dosés selon la méthode de Lowry à l'aide du kit [DC protein assay](#) (Bio-Rad). L'électrophorèse est réalisée avec 20 µg de protéines totales déposées sur un gel 14% acrylamide 37,5 bisacrylamide, ou sur un gel gradient 4-12% pré-coulé Bis-Tris [NuPAGE](#) (Invitrogen, Life

technologies). Le gel est ensuite transféré sur membrane de nitrocellulose [Hybond](#) (Amersham Biosciences, GE Healthcare) puis révélé au Rouge Ponceau (acide acétique 5%, Ponceau 0,1%). Après rinçage au PBS-Tween 0,1%, la membrane est saturée dans une solution PBS-Tween 0,1%, Lait 5%, igepal 1% à 4°C pendant une nuit sous agitation, puis incubée dans un premier temps avec un anticorps polyclonal de lapin anti Myc [ab9106](#) (Abcam) dilué au 1/15 000^{ème}, et dans un second temps avec un anticorps de chèvre anti-Ig de lapin couplé à une peroxydase [PO448](#) (Dako) dilué au 1/15 000^{ème}. La membrane est révélée avec les solutions du kit [ECL Pierce](#) (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Transductions

Pour vérifier la fonctionnalité des vecteurs scAAV9-LIX1, des cellules HEK293 ainsi que des NSC34, une lignée cellulaire hybride de souris constituée de la fusion de MN spinaux et de neuroblastome ([Tebubio](#)) et des cultures primaires de fibroblastes de chats obtenues à partir de prélèvements de derme de chats LIX1^{-/-} ou LIX1^{+/-} ont été infectées à des multiplicités d'infections (MOI) comprises entre 10⁴ et 10⁵ vg/cellule, en présence d'adénovirus sauvage (Ad5) à une MOI de 8 particules par cellule. Les temps post-infection auxquels les cellules ont été récoltées varient en fonction du type cellulaire, de 3 j pour les HEK293 et NSC34 à 8 j pour les fibroblastes. Les méthodes d'extraction et de dosage protéiques sont les mêmes que décrites précédemment, et le Western blot est réalisé sur gel gradient 4-12% pré-coulé. Les quantités de protéines totales déposées sont de 20 µg pour les 293 et les NCS34, et de 150 µg pour les fibroblastes. La révélation est identique à celle réalisée pour les tests de transfection.

Étude in vivo

Animaux

La colonie féline LIX1 obtenue auprès de John Fyfe (Laboratory of Comparative Medical Genetics, East Lansing, Michigan) est hébergée au centre de Boisbonne de l'École Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS, Nantes, France). À la naissance, les chatons sont diagnostiqués par génotypage comme décrit précédemment ([Fyfe 2006](#)). L'ensemble des expérimentations réalisées sur les chats a été préalablement approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale des Pays-de-la-Loire ([CEEAA-PdL](#)) et mis en œuvre en accord

avec les directives européennes pour l'entretien et l'utilisation des animaux de laboratoire ([International Workshop, 2003](#)).

Injections

Les injections LIX1 sont réalisées en période néonatale entre l'âge de 1 j et de 4 j. À cet âge, les chatons ont un poids moyen de 100 à 150 g et ne présentent aucun symptôme détectable de la pathologie. Leur système immunitaire non mature ne nécessite en théorie pas de traitement immunosuppresseur ([Day 2007](#)), et l'absence d'anticorps dirigé contre la capside de l'AAV9 a été vérifiée dans le sérum des mères avant l'injection. Les vecteurs scAAV9-LIX1 ont été administrés soit par voie IV au niveau de la veine jugulaire, soit en ICis sous anesthésie générale (isoflurane par inhalation, 3% v/v) (voir **tab5** pour synthèse des injections).

	Statut	Voie	Vecteur	V (ml)	Dose (vg/kg)
Chat 1	-/-	ni	-	-	-
Chat 2	+/-				
Chat 3	+/+				
Chat 4	-/-	IV	scAAV9-CMV-KOZ-LIX1cmyc	2,5	2.10 ¹³
Chat 5	-/-			3	3.10 ¹³
Chat 6	-/-		scAAV9-CMV-KOZ-LIX1	4	3.10 ¹³
Chat 7	+/-	ICis	scAAV9-CMV-KOZ-LIX1cmyc	0,25	2.10 ¹²
Chat 8	+/+			0,1	1.10 ¹²
Chat 9	+/-		scAAV9-CMV-KOZ-LIX1	0,32	2.10 ¹³
Chat 10	+/-			0,35	2.10 ¹³
Chat 11	-/-	ICis	scAAV9-CMV-KOZ-LIX1	0,35	6.10 ¹³
Chat 12	-/-	ICis	scAAV9-CMV-KOZ-LIX1	0,35	6.10 ¹³

Tab.5) Tableau récapitulatif des chats injectés dans l'étude LIX1. ni : non-injecté, C : concentration, V : volume, IV : injection intraveineuse, ICis : injection intracisternale.

Prélèvements

Les animaux ont ensuite été suivis pour d'éventuels effets secondaires consécutifs à l'injection et pour la progression de la pathologie féline, dont les premiers symptômes chez les chats malades non traités apparaissent vers l'âge de 8 semaines. À l'âge de 21 semaines, auquel les symptômes sont clairement présents, les animaux injectés LIX1 ont été euthanasiés par une injection IV de pentobarbital. La moelle, les nerfs et les muscles principaux des membres ainsi que le foie et le cœur ont été prélevés et congelés en azote liquide puis stockés à -80°C.

qPCR

L'ADN génomique a été extrait des tissus prélevés par broyage mécanique à l'aide du [Tissue Lyser II](#) (Qiagen), puis par lyse chimique comme décrit précédemment (Bucher 2013). La séquence de la cassette d'expression des vecteurs LIX1 est reconnue et amplifiée grâce à des amorces et une sonde spécifiques du signal polyA issu du SV40 (voir [tab6](#) pour les séquences des oligonucléotides correspondants). Le gène félin codant pour la β -glucuronidase (β GLU) a été utilisé comme référence pour chaque échantillon. Les qPCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems, Life Technologies) dans un volume de 20 μ l contenant 50 ng d'ADN, 10 μ l de pré-mix ExTaq (Takara Bio Inc.) et les amorces et sondes nécessaires (voir [tab6](#) pour les conditions de qPCR). Pour obtenir une quantité relative, les CT obtenus des échantillons ont été comparés à ceux obtenus pour une gamme standard de quantités de copies connues de plasmide qui permet de valider la réaction en termes d'efficacité (100% +/- 10%) et de reproductibilité (R^2 supérieur à 0,99). La quantité de copies de vecteur LIX1 par génome diploïde hôte (vg/hdg) est calculée par le rapport de quantités : $2 \times \frac{q_{SV40}}{q_{\beta GLU}}$. Des échantillons de tissus de chats non-injectés ont été inclus pour vérifier la spécificité de la réaction. La sensibilité de la qPCR est de 1.10^{-3} vg/hdg, ce qui correspond à la plus petite quantité de SV40 détectable rapportée à la quantité moyenne de β GLU obtenue pour les échantillons.

RT-qPCR

Les ARN totaux ont été extraits des tissus prélevés et rétro-transcrits comme décrit précédemment (Bucher 2013). Les amorces et sondes utilisées sont spécifiques du cDNA

LIX1 félin, plus précisément au niveau de jonctions exoniques pour ne pas amplifier l'ADN LIX1 génomique, et du cDNA RPL32, un endogène dont l'expression a été montrée la moins sujette à variation au sein d'une large gamme de tissus différents chez le chien ([Peters 2007](#)) et dont l'amplification a été adaptée chez le chat ([tab6](#)). Les qPCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems, Life Technologies) dans un volume de 20 µl contenant 5 µl de cDNA dilué au 1/10, 10 µl de pré-mix ExTaq (Takara Bio Inc.) et les amorces et sondes nécessaires (voir [tab6](#) pour les conditions de qPCR). La quantité relative, unité arbitraire d'expression, est calculée de la façon suivante : $2^{-(CT_{LIX1} - CT_{RPL32})}$. Des ARN non rétro-transcrits ainsi que des cDNA de tissus de chats non-injectés ont été inclus pour vérifier la spécificité de la réaction. La sensibilité de la RT-qPCR est située à $RQ = 2,7.10^{-5}$ vg/hdg, ce qui correspond au CT du plus petit point de gamme LIX1 détectable rapporté au CT moyen RPL32 obtenu pour les cDNA des échantillons.

Amorces/sondes	Séquence 5' vers 3'	C (μM)	Cycles
SV40 For	gaacctgaacataaaatgaatgca	0,3	
SV40 Rev	tgtgaaatttgatgctattgctt	0,3	40 x (95°C, 1 s + 55°C, 20 s)
SV40 Probe	FAM-tgcagcttataatggttaca-TAMRA	0,1	
βGIU For	acgctgattgctcacaccaa	0,3	
βGIU Rev	ccccaggctgcttcatagtgtg	0,3	45 x (95°C, 1 s + 58°C, 20 s)
βGIU Probe	FAM-cccggcccgtgaccttgtga-TAMRA	0,1	
LIX1 RTq1 For	ccaactactgcactggaatg	0,2	
LIX1 RTq1 Rev	gggctaaactcaggatttct	0,2	40 x (95°C, 1 s + 60°C, 20 s)
LIX1 RTq2 Probe	FAM-cgacaggaagtcactctctactattc-TAMRA	0,2	
fRPL32 For	tggttacgggagcaacaagaaa	0,3	
fRPL32 Rev	gcacatcagcagcacctca	0,3	40 x (95°C, 1 s + 62°C, 20 s)
fRPL32 Probe	FAM-tgctgcccagtggttccgg-TAMRA	0,2	

Tab.6) Liste des amorces et sondes utilisées dans l'étude LIX1 en PCR quantitative. Les sondes sont marquées avec un groupement FAM (6 carboxy-fluorescéine) en 5' et un groupement TAMRA (6 carboxy-N,N,N',N'-tétraméthylrhodamine) en 3'. Chaque qPCR présente une étape de dénaturation de 20 s à 95°C avant les cycles d'amplification.

Évaluation de la pathologie féline

La sévérité de la pathologie féline a été suivie pour les chatons injectés LIX1 ainsi que pour des contrôles sains et malades du même âge par des examens neurologiques et électromyographiques, ainsi qu'une mesure de la composante musculaire du potentiel d'action (CMAP) permettant de quantifier l'état d'innervation des muscles, comme décrits précédemment ([Wakeling 2012](#), Bucher 2013). Après l'euthanasie des animaux, un comptage du nombre d'axones moteurs de la racine ventrale de la moelle a été réalisé en région

lombaire (L5) selon la méthode décrite précédemment ([Wakeling 2012](#)). Une autre technique a également été mise au point pour compléter ces évaluations : le Locometrix[®].

L'utilisation de l'appareil [Locometrix[®]](#) (Centaure Metrix) a été mise au point en collaboration avec Jean-Yves Hogrel (Institut de Myologie, UMR974) et Eric Barrey (U902/UMR1313) sur les chats de la colonie SMA pour évaluer la sévérité de la pathologie féline, en complément des examens neurologiques et électromyographiques, et plus particulièrement pour identifier et quantifier des défauts de locomotion. Le principe de l'appareil Locometrix[®] repose sur trois accéléromètres orientés et disposés perpendiculairement entre eux afin de mesurer les accélérations selon les axes crânio-caudal, antéro-postérieur et médio-latéral avec une sensibilité de ± 2 G ([Auvinet 2006](#)), sensibilité qui a ensuite été augmentée à ± 6 G lors d'une mise-à-jour. La mise en place de l'appareil est effectuée à l'aide d'un gilet ou d'une ceinture semi-élastiques sur le sternum du chat, au plus près possible du centre de gravité de l'animal, et les accélérations sont automatiquement enregistrées par le boîtier durant la marche des chats. Le sens (sens positif et négatif pour chaque axe) et l'alignement corrects de l'appareil sont indispensables pour obtenir des mesures significatives à partir de coordonnées non faussées. Les chats suivis par tests Locometrix[®] pour la mise au point sont les adultes reproducteurs (un an et plus) et les chatons disponibles (à partir de 8 semaines), sains ou malades, destinés à la reproduction ou entrant dans des protocoles d'injection. À une semaine d'intervalle, chaque animal évolue avec l'appareil pendant 10 min, ce qui crée un enregistrement de la même durée. Les données sont transmises directement du microprocesseur du capteur à un ordinateur *via* le logiciel Equimetrix à l'origine adapté pour le cheval, et ici paramétré pour le chien. L'appareil génère un fichier pour chaque session d'enregistrement composé de trois graphes représentant l'accélération en fonction du temps selon les trois axes décrits. L'analyse est réalisée sur deux fenêtres de 5 s présentant des variations régulières selon chaque axe. Les données analysées sont exportées dans un fichier Excel, et constituent deux lignes de variables par animal et par test. Les variables les plus significatives pour les chats SMA sont la puissance totale (ou plusieurs puissances détaillées selon les axes), la régularité qui est calculée à partir des amplitudes des accélérations, le pourcentage d'instabilité médio-latérale qui retrace les mouvements du dos et la symétrie de la démarche, et enfin la fréquence des foulées.

II.3.3 Résultats obtenus

Vérification de la fonctionnalité des vecteurs LIX1 et expression in vitro

Pour obtenir une expression optimale du cDNA fLIX1, nous avons cloné différentes cassettes d'expression qui ont été testées *in vitro*. La transfection des plasmides pscCMV-LIX1-cmyc en cellules HEK293 a abouti à l'expression spécifique de trois formes distinctes de la protéine LIX1 correspondant à des tailles de 39 kDa, 33 kDa et 30 kDa (**fig11a**). Suivant la séquence de référence du cDNA fLIX1 ([DQ250154](#)), la taille attendue de la protéine LIX1-cmyc est de 33,3 kDa. Nous avons donc obtenu une forme de plus grande taille et une forme de plus petite taille. Or, un plasmide pCMV-GFP-LIX1 exprimant une protéine de fusion GFP-LIX1, c'est-à-dire avec l'extrémité C-terminale de la protéine LIX1 libre, n'a donné par transfection de cellules HEK293 qu'une forme correspondant à la taille attendue de 59 kDa (**fig11b**). D'autre part, comme l'épitope cmyc que nous utilisons en C-terminal est nécessaire à la détection de la protéine par Western Blot, la forme de 30 kDa pourrait probablement être écourtée du côté N-terminal et ainsi provenir d'un départ tardif de traduction. Enfin, une hypothèse probable pour expliquer l'existence de la forme de 39 kDa serait une modification post-traductionnelle de la protéine.

Pour renforcer l'expression d'une protéine LIX1 complète à partir de notre plasmide-vecteur, nous avons dans un premier temps utilisé la séquence 5'UTR du gène fLIX1 fournie par John Fyfe que nous avons introduite juste en amont du cDNA fLIX1. Cette séquence, naturellement présente en amont du gène félin, pourrait favoriser l'expression de la forme non tronquée de la protéine par une stabilisation de son ARN messager. Toutefois, cette construction n'a révélé aucune expression de la protéine LIX1-cmyc après transfection de cellules HEK293, probablement du fait de la structure tridimensionnelle complexe de la séquence 5'UTR qui pourrait interagir négativement avec la fonction du promoteur, inhibant ainsi l'expression du gène LIX1. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé des constructions ne contenant que les 20 dernières paires de bases de la séquence 5'UTR correspondant à la séquence Kozak endogène du fLIX1 que nous avons placé juste en amont du cDNA. Nous avons parallèlement construit un autre plasmide contenant une séquence Kozak synthétique consensus. D'autre part, afin de valider l'hypothèse d'un départ tardif de traduction, une stratégie de mutagenèse visant à modifier le codon ATG supposé responsable du départ tardif de traduction (bande à 30 kDa), a été réalisée. Les résultats de la transfection de cellules HEK293 avec ces plasmides ont révélé (i) la disparition de la bande de 30 kDa

pour le plasmide dont l'ATG a été supprimé, et (ii) l'augmentation de l'expression de la forme de 33 kDa au détriment des bandes à 30 et 39 kDa, après l'introduction des deux séquences Kozak (**fig11c**). Ces résultats ont confirmé notre hypothèse de départ tardif de traduction mais ont été inattendus en ce qui concerne la forme de 39 kDa. L'origine de cette forme est très probablement liée à la présence d'une séquence non codante d'environ 700 bp contenant un intron chimérique qui avait été introduit afin d'augmenter l'efficacité d'expression du cDNA, notamment en stabilisant l'ARNm ([Hermening 2004](#)). En effet, cette séquence a été éliminée lors du clonage des constructions Kozak et celle mutée pour l'ATG qui aboutissent à une absence de la forme de 39 kDa. Une hypothèse possible est un départ précoce de traduction, amorcé au sein de cette séquence (**fig11d**).

La présence majoritaire de la forme à la taille attendue de 33 kDa a justifié l'utilisation de la séquence Kozak endogène du fLIX1 dans les lots de vecteur scAAV9-LIX1.

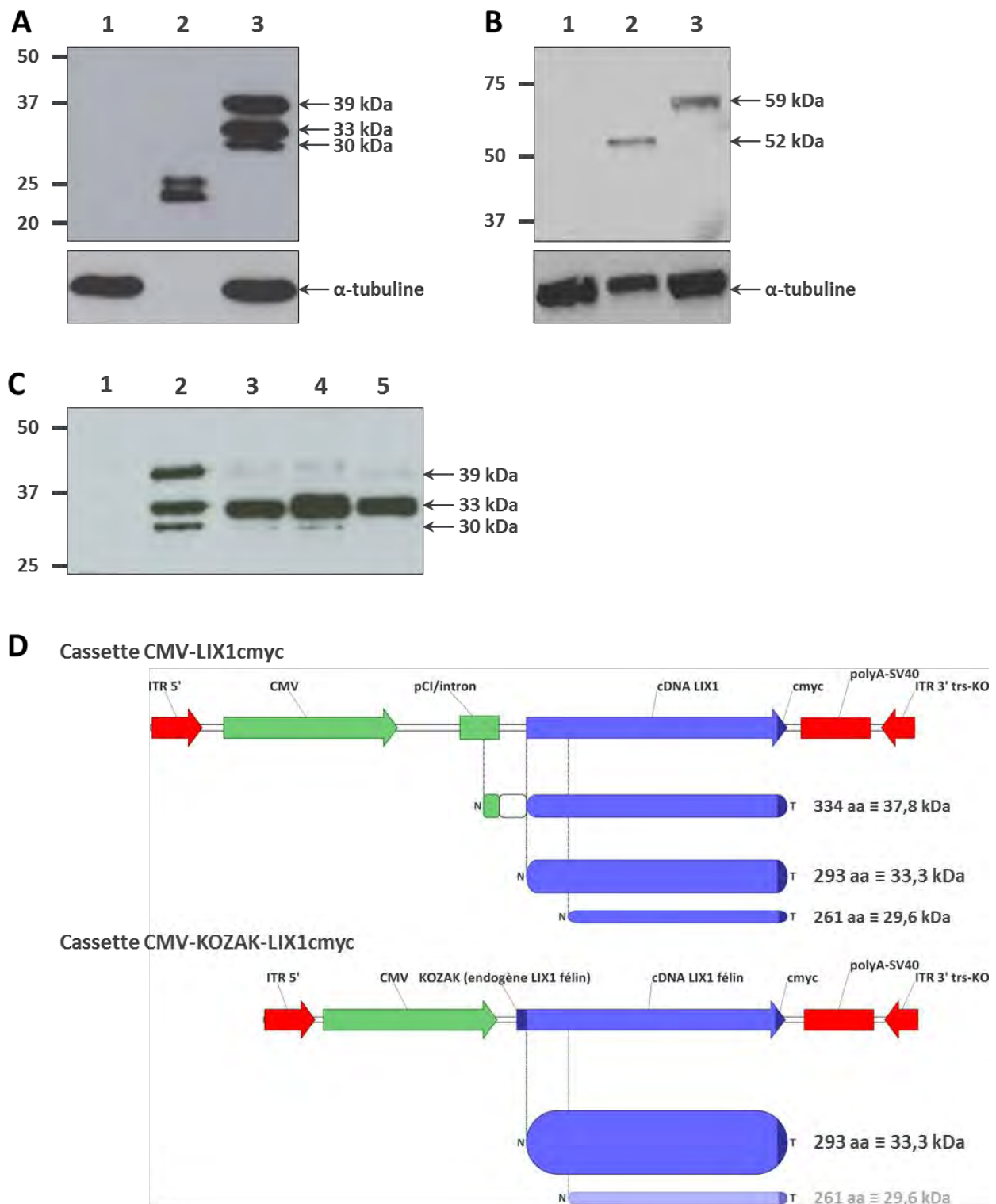


Fig.11) Vérification de la fonctionnalité des plasmides-vecteurs LIX1 par transfection de cellules HEK293. (A) Western blot anti-cmyc réalisé sur des extraits de cellules transfectées avec un plasmide pCMV-GFP (1), pPGK-VEGF-cmyc (2) ou pCMV-LIX1-cmyc (3). (B) Western blot anti-GFP réalisé sur des extraits de cellules non transfectées (1) ou transfectées avec un plasmide pCMV-GFP-CAT (2) ou pCMV-GFP-LIX1 (3). (C) Western blot anti-cmyc réalisé sur des extraits de cellules transfectées

(Fig.11), suite) avec un plasmide pCMV-GFP (1), pCMV-LIX1-cmyc (2), pCMV-KOZAK_{endogène}-LIX1-cmyc (3), pCMV-KOZAK_{synthétique}-LIX1-cmyc (4), ou pCMV-LIX1_(ATG muté)-cmyc (5). (D) Schéma représentant les hypothèses de départs tardif et précoce de traduction. aa : acides aminés.

La fonctionnalité de ces vecteurs scAAV9-CMV-LIX1-cmyc a ensuite été testée *in vitro*. Pour être le plus près possible de la cible *in vivo*, les MN félins, plusieurs types cellulaires ont été utilisés en parallèle : les HEK293 dans lesquelles a été produit le vecteur, les NSC34 qui sont des MN de souris et des fibroblastes primaires de chat. Après transduction du vecteur à une MOI de 10^4 vg/cellule en présence d'Ad5 (MOI de 8), les cellules HEK293 et NSC34 ont exprimé spécifiquement et majoritairement la forme attendue de la protéine LIX1-cmyc (fig12a). Concernant les fibroblastes, à une MOI de $2,5.10^4$ vg/cellule et avec un dépôt sur gel de 150 µg de protéines totales (contre 20 µg précédemment), un signal LIX1-cmyc très faible mais spécifique est apparu à la plus forte exposition (fig12b).

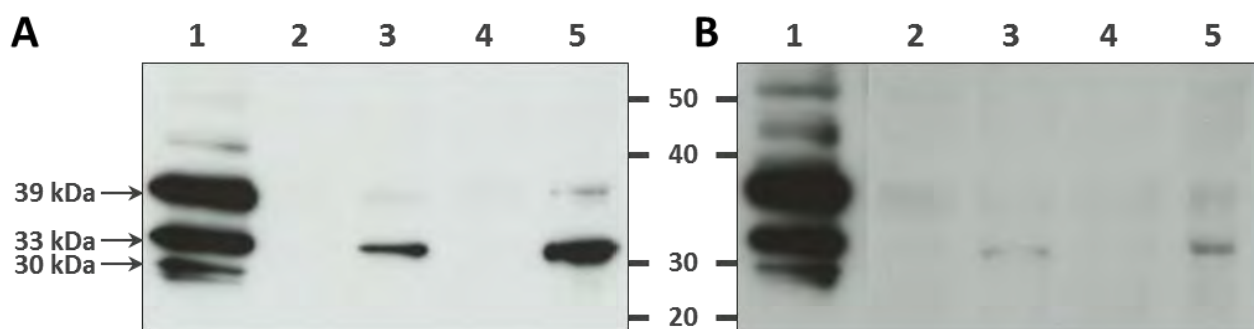


Fig.12) Vérification de la fonctionnalité du vecteur scAAV9-CMV-KOZAK-LIX1-cmyc *in vitro*. (A) Western blot anti cmyc réalisé sur des extraits de cellules HEK293 (1-3) ou de cellules NSC34 (4-5) transfectées avec un plasmide pCMV-LIX1-cmyc (1), ou transduites avec un vecteur scAAV9-CMV-GFP (2, 4) ou scAAV9-CMV-KOZAK-LIX1-cmyc (3, 5). (B) Western blot anti cmyc réalisé sur des extraits de cellules HEK293 transfectées avec un plasmide pCMV-LIX1-cmyc (1), ou sur des extraits de fibroblastes issus de chat LIX1^{-/-} (2-3) et de chats LIX1^{+/-} (4-5) transduits avec un vecteur scAAV9-CMV-GFP (2, 4) ou scAAV9-CMV-KOZAK-LIX1-cmyc (3, 5).

Injections IV du vecteur AAV9-LIX1 chez 3 chatons malades nouveau-nés

Après vérification de sa fonctionnalité, le vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1-cmyc a été injecté en IV chez deux chatons LIX1^{-/-} âgés de 2 jours à une dose de 10¹³ vg/kg (**tab5**). L'analyse de la biodistribution du vecteur LIX1 par qPCR 21 semaines après l'injection a montré une forte dispersion du vecteur viral principalement dans les organes périphériques (organes internes, muscles et nerfs des membres), en particulier dans le foie avec plus de 50 vg/hdg (**fig13**). Par rapport à un contrôle non-injecté, le transgène LIX1 a également été retrouvé dans la moelle, mais à un niveau beaucoup plus faible (en moyenne 0,155 +/- 0,1 vg/hdg) que dans les organes périphériques (en moyenne 0,73 vg/hdg dans les muscles et 0,64 vg/hdg dans le cœur).

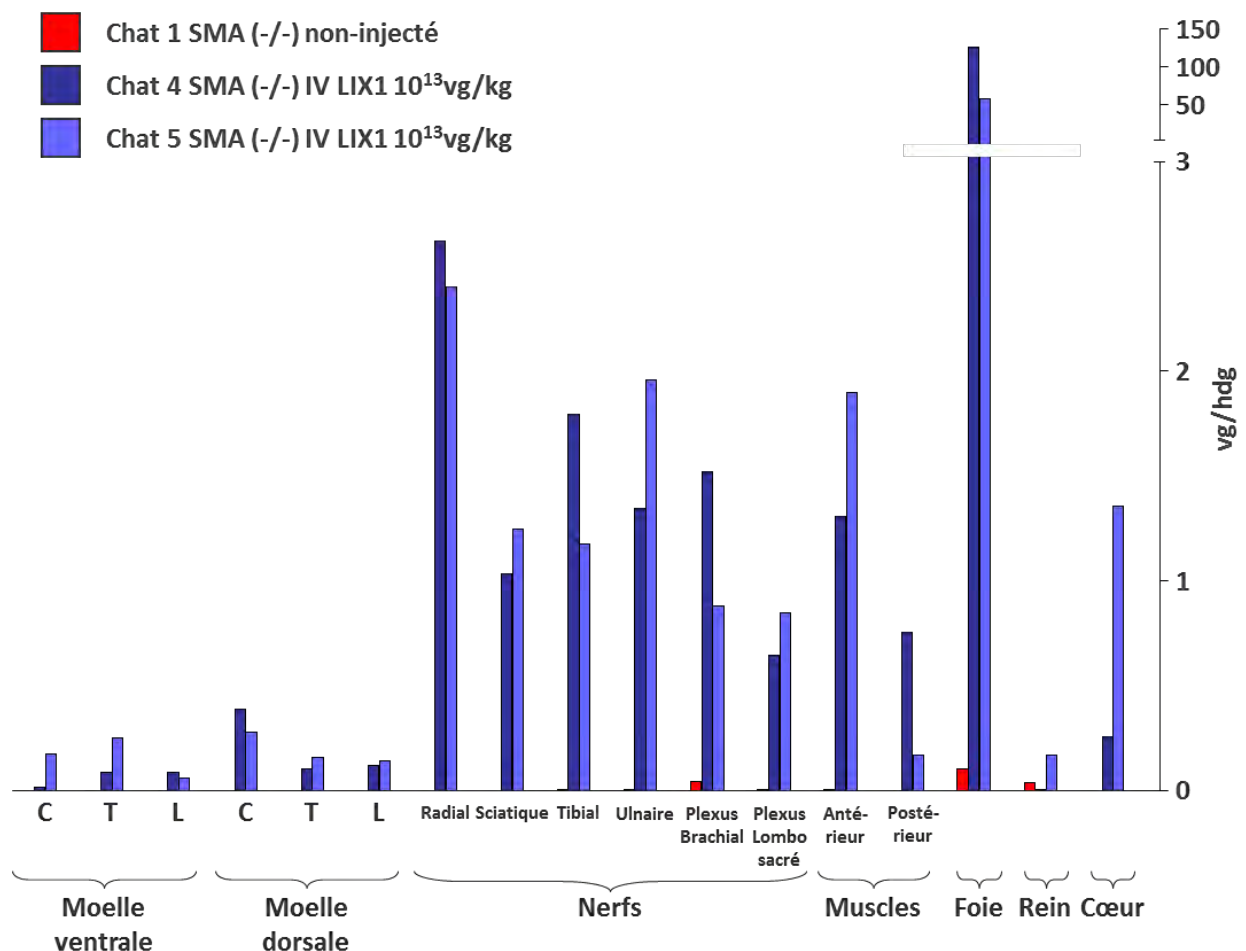


Fig.13) Biodistribution du vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1-cmyc après injection IV néonatale chez deux chatons LIX1^{-/-}. vg/hdg : nombre de copies de vecteur par génome diploïde hôte mesuré par qPCR (seuil de détection : 0.001 vg/hdg), C : cervical, T : thoracique, L : lombaire.

Un troisième chaton LIX1^{-/-} nouveau-né a été injecté avec un autre lot de vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1 dans lequel l'épitope cmc est absent, toujours à une dose de 10¹³ vg/kg (**tab5**). L'analyse de la distribution de ce vecteur à 21 semaines post-injection a montré une dispersion similaire à celle observée chez les deux premiers chatons injectés, avec une transduction majoritaire des organes périphériques comme le foie et à une présence à un faible niveau du vecteur dans la moelle (0,017 vg/hdg contre 5,12 dans le foie) (données non présentées).

Concernant l'expression du gène fLIX1, la technique de RT-qPCR utilisée ne permet pas de distinguer l'ARNm fLIX1 produit par le vecteur de celui produit par l'ADN génomique. Il était ainsi nécessaire d'utiliser en contrôles des chats non-injectés LIX1^{-/-}, LIX1^{+/-} et LIX1^{+/+}, respectivement les chats C1, C2 et C3 (**tab5**). L'analyse d'échantillons de moelle ventrale et dorsale a confirmé l'absence d'expression pour le chat LIX1^{-/-} et une quantité relative proportionnelle entre C2 et C3 (**fig14**). La RT-qPCR a également montré l'absence totale d'expression de fLIX1 endogène dans le foie, ce qui est cohérent avec les résultats de l'équipe de John Fyfe ([Fyfe 2006](#)). Pour les animaux injectés LIX1 en IV, l'analyse a révélé une quantité relative d'expression LIX1 dans la moelle située, en moyenne, entre les chats contrôles C2 et C3 (**fig14**). Elle a également indiqué l'apparition pour ces chats d'une expression LIX1 dans le foie.

Résultats

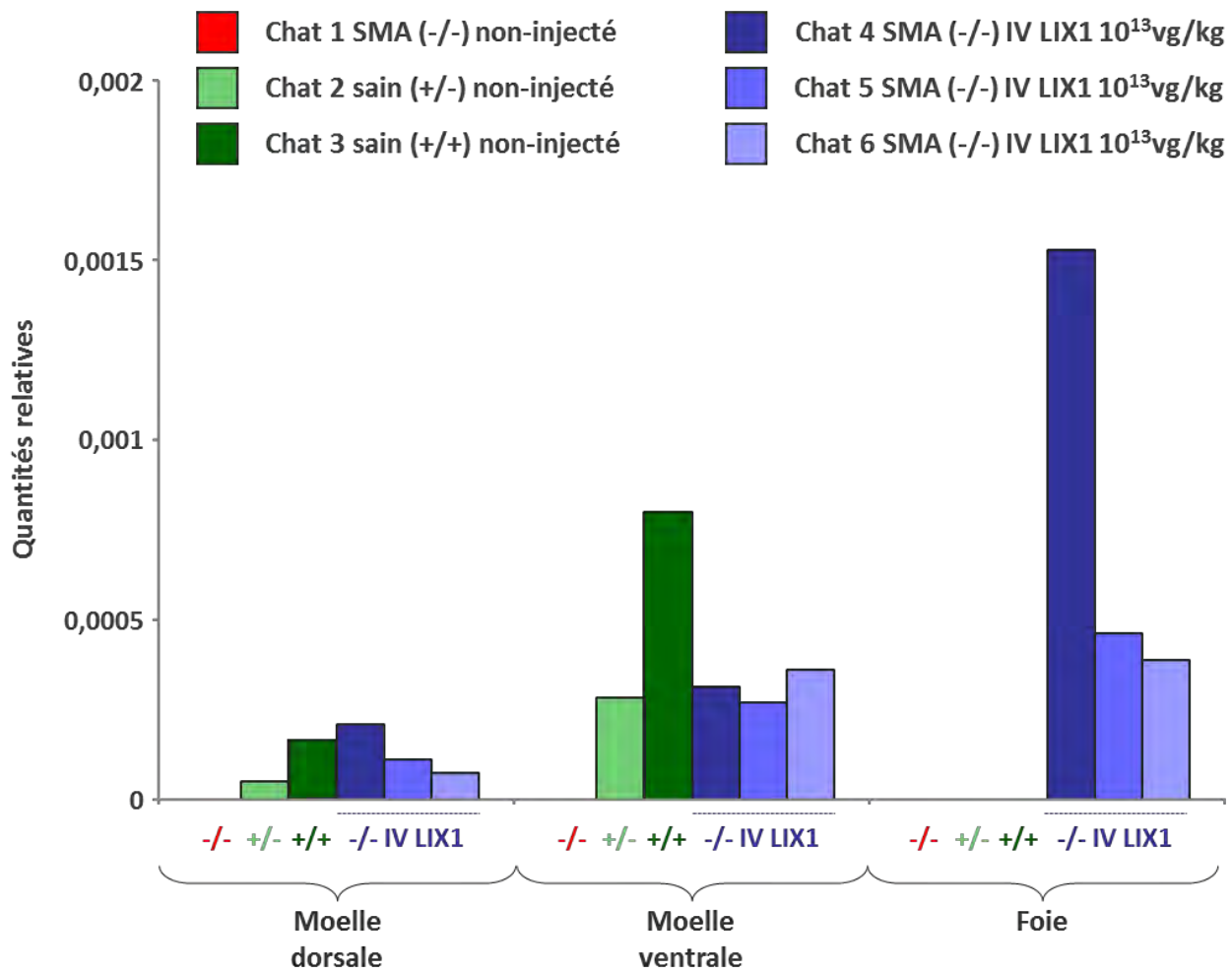


Fig.14) Quantités relatives d'ARNm fLIX1 retrouvé dans la moelle et le foie de chats contrôles et des chats LIX1^{-/-} malades injectés LIX1 en IV néonatale.

Évaluation thérapeutique pour les chats malades injectés LIX1 en IV néonatale

Le suivi physiopathologique des deux premiers chats LIX1^{-/-} injectés par les examens neurologiques et électromyographiques n'a pas mis en évidence d'effet thérapeutique de ces injections IV (**fig15a et b**). En effet, par rapport aux chatons sains dont le score n'a pas évolué au cours du temps, le score des chatons injectés a au contraire suivi la progression de celui des chatons LIX1^{-/-} non-injectés pour atteindre le même niveau à l'âge de 21 semaines. De la même façon, la mesure de la composante musculaire du potentiel d'action (CMAP) a montré que l'amplitude musculaire des chatons injectés était comparable à celle des animaux LIX1^{-/-} non traités, avec une différence marquée dès l'âge de 12 à 13 semaines avec une moyenne de 22 μ V pour les malades contre 36 μ V pour les sains (**fig15c**). Le troisième chaton LIX1^{-/-} avait été injecté avec un vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1 sans épitope cmyc pour exclure l'hypothèse d'une mauvaise fonctionnalité de la protéine LIX1 due à la fusion de l'épitope cmyc en C-terminal de la protéine, susceptible de tordre la probable structure *coiled-coil* au niveau des 100 derniers acides aminés ([Swindell 2001](#)). Or, les examens neurologiques et électromyographiques ainsi que le CMAP ont clairement indiqué que ce chat 6 a présenté une forme sévère et non corrigée de la pathologie (**fig15**), ce qui semble suggérer que l'absence de correction phénotypique constatée chez les deux premiers chatons injectés n'est pas liée à l'épitope cmyc fusionné à la protéine LIX1.

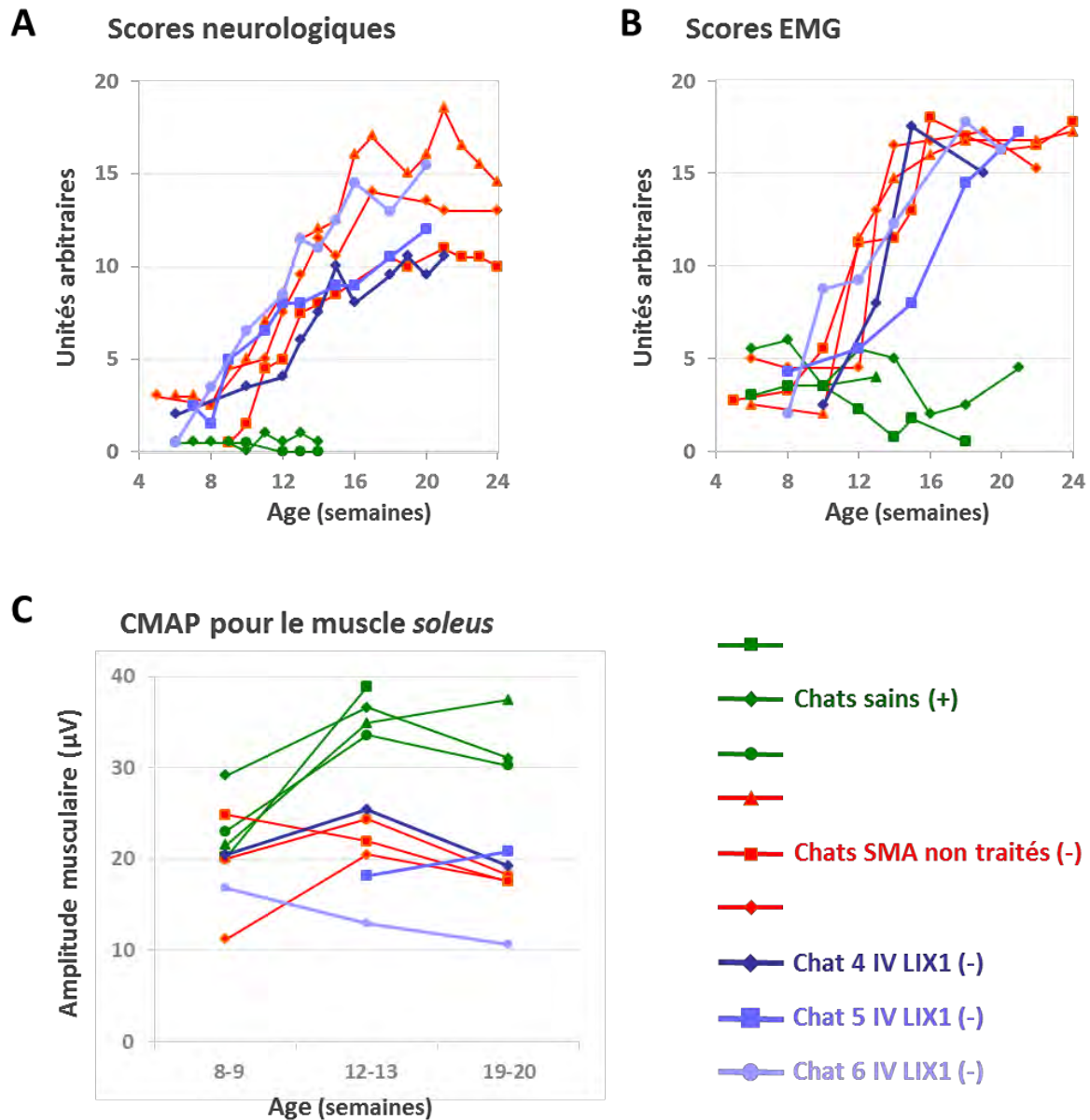


Fig.15) Évaluation thérapeutique des chats $LIX1^{-/-}$ malades injectés $LIX1$ par voie IV néonatale. (A) Scores en unités arbitraires établis en fonction de l'âge des animaux par examen neurologique et (B) électromyographique (EMG). (C) Mesure en μV de la composante musculaire du potentiel d'action (CMAP) dans le muscle soleus en fonction de l'âge des animaux.

Concernant le Locometrix, la méthode d'analyse a dans un premier temps été validée par trois séries de tests réalisés à une semaine d'intervalle sur six chats adultes sains et trois chats adultes malades. Ces enregistrements nous ont permis de sélectionner trois paramètres discriminant la maladie ; les moyennes de chaque paramètre obtenu dans le groupe sain et le groupe malade ont été comparées par un test de Mann Withney, et seuls les paramètres statistiquement différents entre les deux groupes ont été retenus, $p < 0,0005$ (fig16).

(i) La régularité traduit l'homogénéité de la démarche au niveau de l'amplitude des accélérations et de leur périodicité. Du fait de la claudication des chats SMA malades, la régularité est plus importante chez les chats sains.

(ii) La puissance totale développée est calculée à partir de l'accélération dans les trois axes. Elle est plus importante chez les sains.

(iii) La puissance médio-latérale rapportée à la puissance cranio-caudale (paramètre noté PML/PCC) traduisant l'aspect balancé de la démarche (axe médio-latéral) en fonction de la vitesse (ou puissance développée dans le sens de la marche : axe cranio-caudal). Ce paramètre est plus fort pour les chats SMA malades et indépendant de l'allure de l'animal.

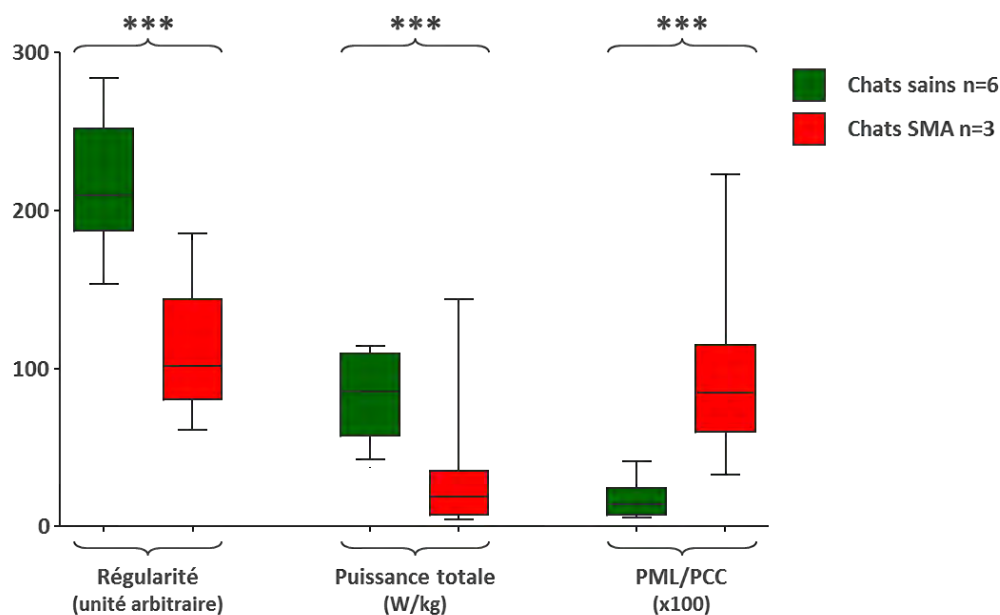


Fig.16) Validation des analyses accélérométriques à l'aide du Locometrix chez des chats adultes sains et malades. Chaque histogramme représente 36 mesures pour les 6 chats sains et 18 mesures pour les 3 chats malades. Les différences entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un test de Mann Withney ($p < 0,0005$). PML/PCC : puissance médio-latérale rapportée à la puissance cranio-caudale.

Ces enregistrements nous ont également permis de définir une procédure standardisée d'enregistrement des données, incluant :

- une analyse réalisée sur 10 min maximum, pour ne pas inclure de biais de fatigue, notamment pour les chats malades ;
- l'exclusion des galops, cette allure est en effet peu comparable chez le chat à la marche ou au trot, qui sont d'ailleurs plus utilisés par les chats dans nos conditions de test ;
- le paramétrage de l'appareil avec une sensibilité de 6 G (contre 2 G auparavant), suite à l'observation de phénomènes de saturation du signal, notamment pour les chats sains (signal tronqué) ;
- une fenêtre d'analyse de marche raccourcie de 10 à 5 secondes en mode course, permettant d'obtenir plus facilement des échantillons de marche régulière, notamment chez les chatons.

L'application de cette procédure définie chez les chats adultes à des chatons âgés de 8 à 24 semaines a montré une évolution différente de ces paramètres, entre les sains et les SMA malades, à partir de l'âge de 15 semaines (**fig17**). Ces résultats semblent indiquer que, (i) cette technique accélérométrique ne permettra pas de nous renseigner sur l'âge d'apparition des premiers symptômes détectés cliniquement à partir de l'âge de 12 semaines, (ii) mais pourrait permettre de quantifier la sévérité de la SMA féline à un âge plus tardif.

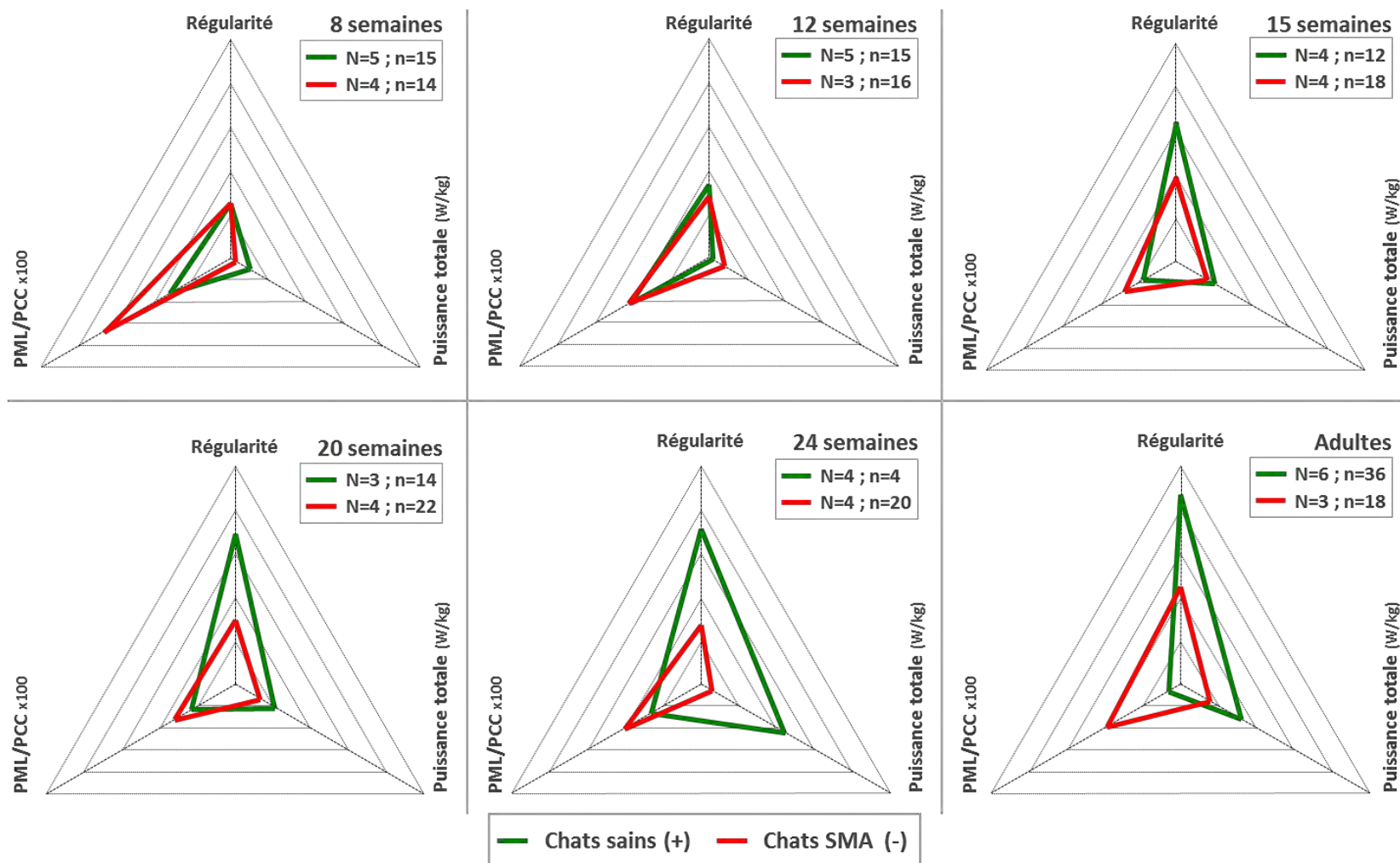


Fig.17) Représentation en radars de l'évolution des trois paramètres accélérométriques mesurés chez des chats sains et des chats SMA à six âges différents. Pour chaque temps, sont représentées les moyennes pour le groupe sain (vert) et pour le groupe malade (rouge) des données correspondant à l'âge indiqué +/- 1 semaine. Sont considérés adultes les chats de plus de 36 semaines. N : nombre de chats testés, n : nombre total de mesures réalisées par temps, PML/PCC : puissance médio-latérale rapportée à la puissance cranio-caudale.

Afin d'affiner l'évaluation thérapeutique des chats LIX1 par cette technique accélérométrique, nous avons mis au point une analyse de régression logistique avec l'aide d'Eric Barrey (U902/ UMR1313) qui a initialement décrit l'utilisation de l'appareil Locometrix chez l'homme ([Auvinet 2006](#)). Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel [NCSS 2003](#) sur 7 chatons sains et 4 chatons malades âgés de 8 à 24 semaines, ainsi que sur les chats adultes précédemment testés (6 sains et 3 malades). Elle a permis en se basant sur une dizaine de paramètres, dont ceux précédemment décrits, la création d'un modèle de régression permettant d'expliquer un tiers des variations prédites sur l'ensemble des données avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité (**fig18a, b**). Ce modèle a ensuite été appliqué aux chatons malades injectés LIX1 par voie IV, en associant à chaque mesure accélérométrique une probabilité d'appartenance au groupe de chats SMA malades, ce qui a montré que les chatons injectés n'ont pas présenté d'amélioration phénotypique à partir de l'âge de 15 semaines (**fig18c-e**).

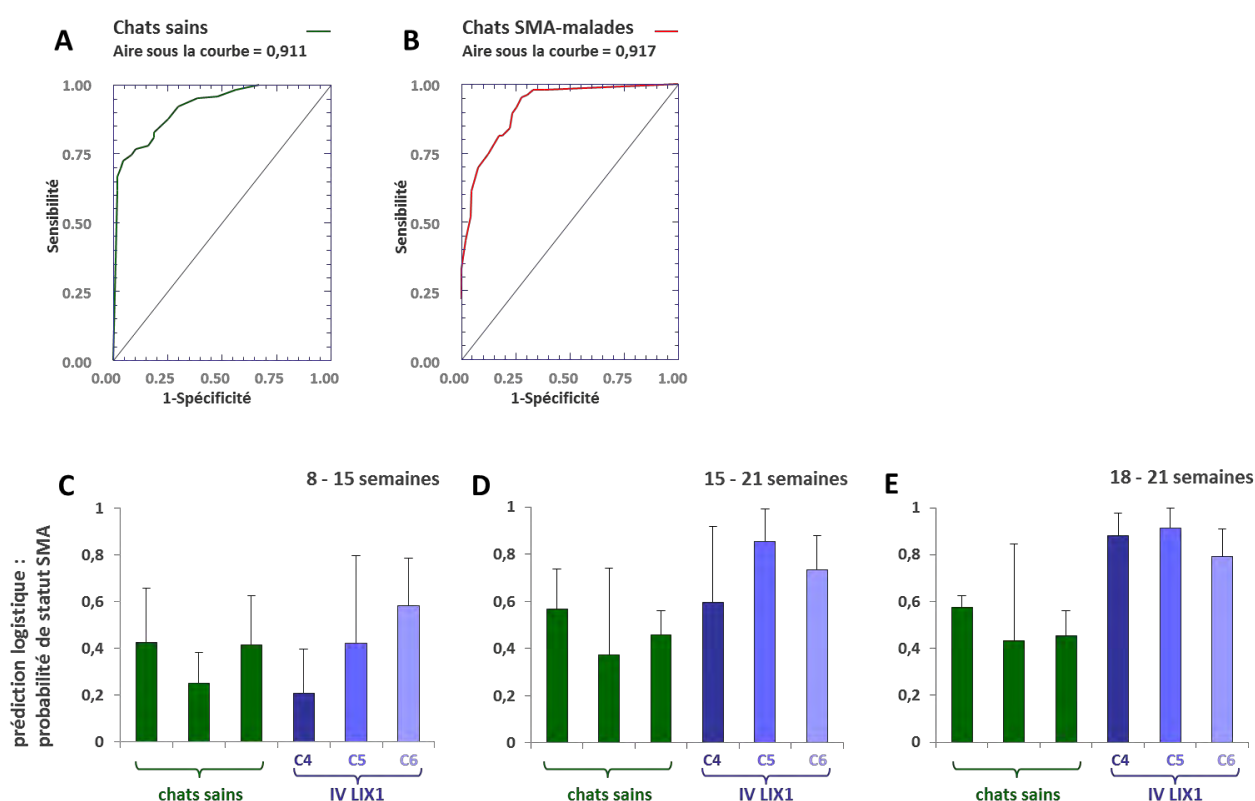


Fig.18) Analyse de régression logistique appliquée aux mesures accélérométriques. (A) Courbe ROC (receiver operating characteristic) indiquant la sensibilité et la spécificité du modèle pour les chats sains et (B) les chats malades. (C-E) Moyennes +/- écart-type des prédictions logistiques obtenues pour les chats LIX1^{-/-} injectés en IV néonatale par rapport à des contrôles sains (C) entre l'âge de 8 et 15 semaines, (D) entre 15 et 21 semaines et (E) entre 18 et 21 semaines.

Enfin, l'absence d'amélioration clinique suite aux injections IV a été confirmée par nos collaborateurs John Fyfe et Erin Wakeling, par morphométrie des racines ventrales de la moelle lombaire accompagnée d'un comptage du nombre d'axones moteurs suivant le protocole précédemment décrit ([Wakeling 2012](#)). En effet, les sections de racines ventrales de moelle marquées au bleu de toluidine ont clairement montré une quantité plus faible d'axones de gros calibre pour les chats injectés LIX1 en IV C4, C5 et C6, comme pour un chat LIX1^{-/-} non traité, par rapport à un chat sain LIX1^{+/+} (**fig19a**). Ces sections de racines ventrales ont également permis de compter le nombre d'axones moteurs, et plus précisément de calculer leur répartition en fonction de leur taille, ce qui peut être représenté par des histogrammes empilés (**fig19b**). Cette analyse a indiqué que, comme des chats malades non traités du même âge, les chats LIX1^{-/-} injectés en IV ont une proportion d'axones de petit calibre plus importante que pour les chats sains, et ne parviennent pas ou peu à développer des axones de calibre supérieur à 12 µm.

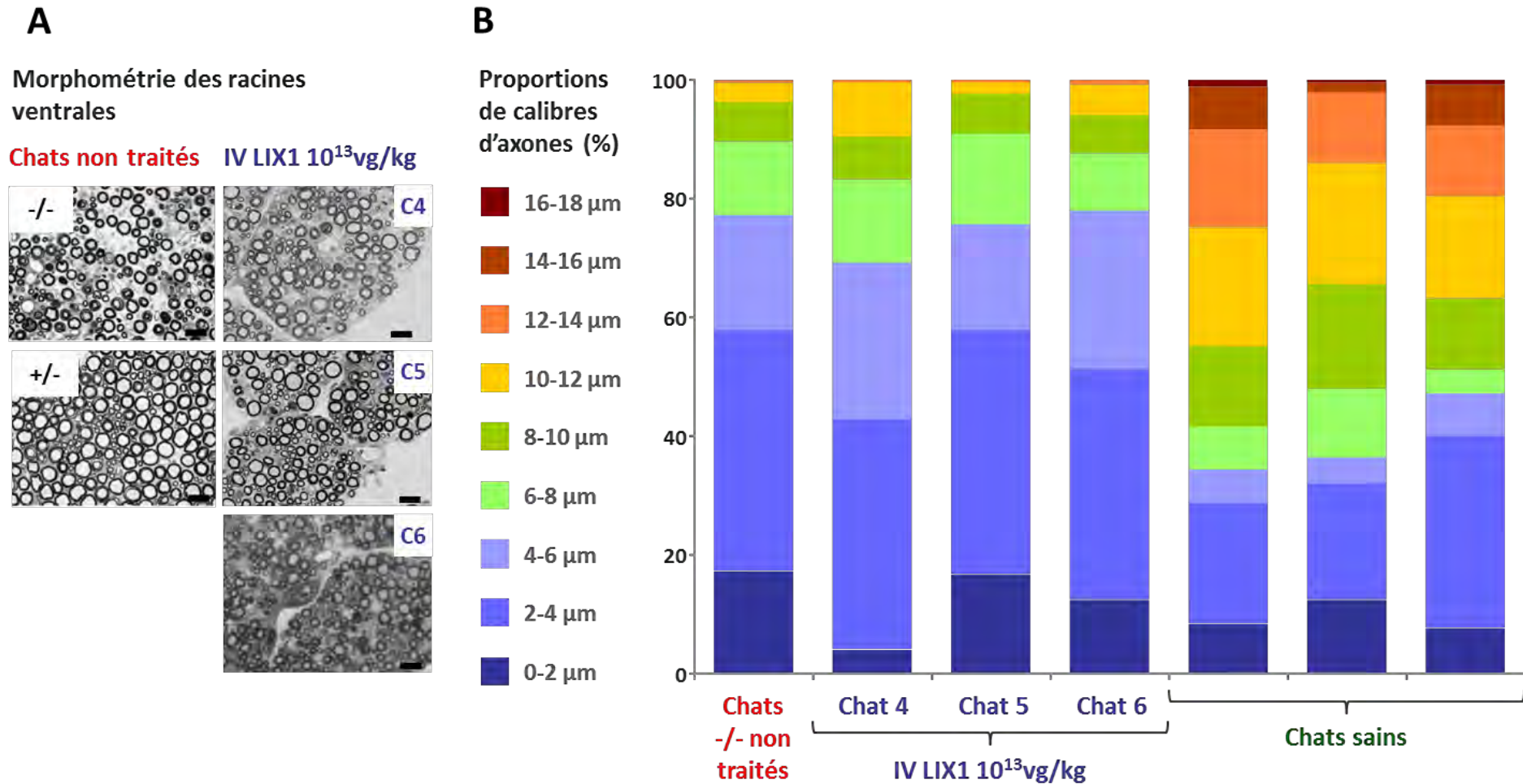


Fig.19) Analyse morphométrique des racines ventrales de la moelle lombaire des chats malades injectés LIX1 en IV néonatale. (A) Marquage sur coupes de racines ventrales réalisées en région L5 au bleu de toluidine permettant de visualiser le diamètre des axones moteurs. Barres d'échelle : 20 μ m. (B) Quantification du nombre d'axones moteurs en fonction de leur calibre, représentée en proportions sous forme d'histogrammes empilés.

Injections ICis du vecteur AAV9-LIX1 chez 4 chats sains nouveau-nés

Suite à cette absence d'effet thérapeutique des injections IV néonatales de scAAV9-CMV-Kozak-LIX1, et d'après les conclusions de la première partie de cette étude, nous avons voulu tester l'efficacité d'injections intracisternales (ICis) pour l'expression du gène *FLIX1* dans la moelle de chatons SMA. Devant le nombre restreint de chatons *LIX1*^{-/-}, les injections ICis ont été préalablement réalisées chez un nouveau-né *LIX1*^{+/-}, C7, et un *LIX1*^{+/+}, C8 (**tab5**). Compte-tenu du volume injectable dans la grande citerne qui dépend, pour éviter toute surpression, du volume de LCS qu'il est possible de prélever chez un chaton de 150 g, environ 300 µl, la dose maximale injectable du même lot de vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1-cmyc utilisé par voie IV chez les premiers chatons est de 2.10^{12} vg/kg. Pour ces chats C7 et C8, l'analyse de distribution du vecteur par qPCR 21 semaines après l'injection a indiqué une quantité de vecteur dans la moelle comparable à ce qui avait été trouvé après injection IV ($0,19 \pm 0,077$ vg/hdg contre $0,155 \pm 0,1$ vg/hdg) (**fig20**). En dehors de la moelle, la dispersion dans les organes périphériques a été révélée nettement plus faible qu'après les injections IV ($0,15$ et $2,46$ vg/hdg dans le foie). Ceci indique, qu'à une dose dix fois plus faible, l'injection IC semble aussi efficace que l'IV pour transduire la moelle, tout en limitant cette transduction au SNC. Par la suite, un nouveau lot de vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1 (sans cmyc) a été produit puis concentré pour obtenir un titre supérieur à 7.10^{12} vg/ml, ce qui a permis des injections ICis chez des chatons nouveau-nés *LIX1*^{+/-} avec une dose de 10^{13} vg/kg, C9 et C10 (**tab5**). Vingt-et-une semaines post-injection, l'analyse par qPCR de ces chats a indiqué une variabilité individuelle importante dans la moelle, tout en maintenant un niveau faible dans les organes périphériques (**fig20**). Le chat C9 a présenté une quantité de vecteur dans la moelle environ 4 fois supérieure aux chats ICis avec une dose de 10^{12} vg/kg ($0,79 \pm 0,311$ vg/hdg), tandis que C10 a montré un maximum de transduction de $0,053$ vg/hdg, ce qui suggère une variabilité d'efficacité de transduction, probablement liée au geste de l'injection.

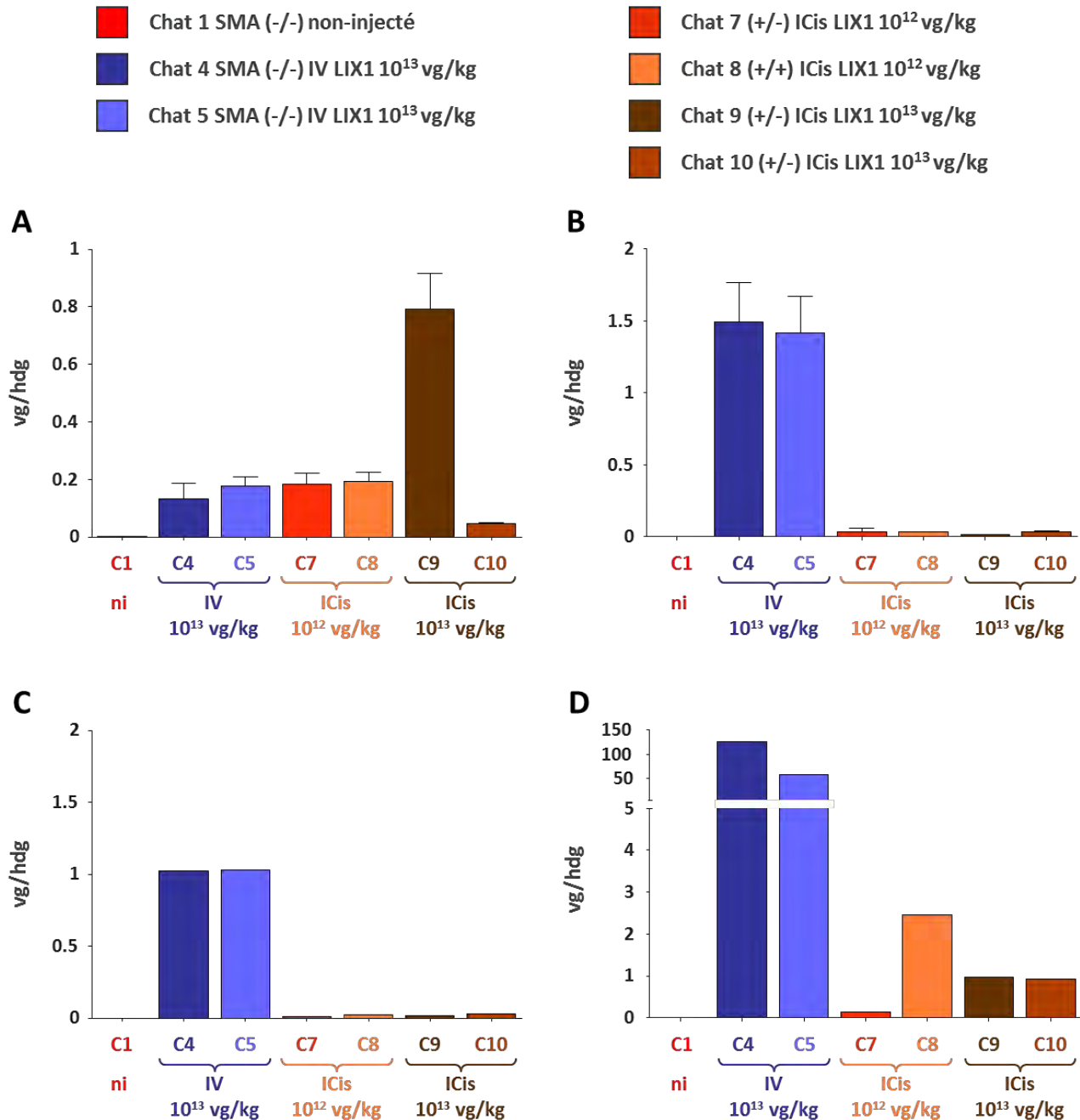


Fig.20) Biodistribution du vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1 après injections IV ou ICis néonatales. Quantité moyenne +/- SEM de copies de vecteur (A) dans la moelle, avec trois régions de la moelle analysées en ventral et en dorsal (n=6 échantillons), et (B) dans les nerfs avec six nerfs analysés. (C) Quantité moyenne de vecteur dans les muscles triceps brachial et quadriceps fémoral. (D) Quantité moyenne de vecteur dans le foie. vg/hdg : nombre de copies de vecteur par génome diploïde hôte mesuré par qPCR (seuil de détection : 0.001 vg/hdg), ni : non-injecté, IV : injection intraveineuse, ICis : injection intracisternale.

Au niveau de l'expression du gène fLIX1, les analyses de RT-qPCR ont révélé que les chats ICis, mis-à-part le chat C10 dont les résultats sont très faibles, présentent une quantité relative plus forte que pour les chats IV dans la moelle dorsale (RQ moyenne de $5,3 \cdot 10^{-4}$, contre $1,3 \cdot 10^{-4}$ en IV) et nettement plus forte dans la moelle ventrale (RQ moyenne de $5,9 \cdot 10^{-3}$, contre $3,1 \cdot 10^{-4}$ en IV) (**fig21**). En cohérence avec les résultats de transductions, l'expression LIX1 quantifiée dans le foie est plus faible pour les chats ICis que pour les chats IV.

Injection ICis du vecteur AAV9-LIX1 chez des chatons malades nouveau-nés et évaluation thérapeutique

Suite à ces résultats encourageants indiquant un transfert de gène fLIX1 efficace et ciblé à la moelle après injections ICis d'AAV9, deux chatons LIX1^{-/-} nouveau-nés ont été injectés avec 10^{13} vg/kg de vecteur scAAV9-CMV-Kozak-LIX1. Le suivi phénotypique de ces animaux est en cours, et il est à l'heure actuelle trop tôt pour déterminer si les injections ont un effet thérapeutique.

Messages principaux de l'étude LIX1

- L'expression du cDNA fLIX1 semble optimale avec sa séquence Kozak
- Les vecteurs scAAV9-LIX1 permettent la production de la protéine LIX1 *in vitro*
- Les injections IV mènent à une forte dispersion des vecteurs scAAV9-LIX1 en périphérie
- Les injections IV semblent restaurer une expression de LIX1 dans la moelle
- Les injections IV ne permettent pas d'amélioration phénotypique
- Les tests Locometrix permettent d'obtenir un score associé à la démarche des chats LIX1
- Les injections ICis diminuent la dispersion des vecteurs scAAV9-LIX1 en périphérie
- Les injections ICis semblent augmenter l'expression de LIX1 dans la moelle
- L'évaluation thérapeutique est en cours pour les chatons LIX1^{-/-} injectés en ICis

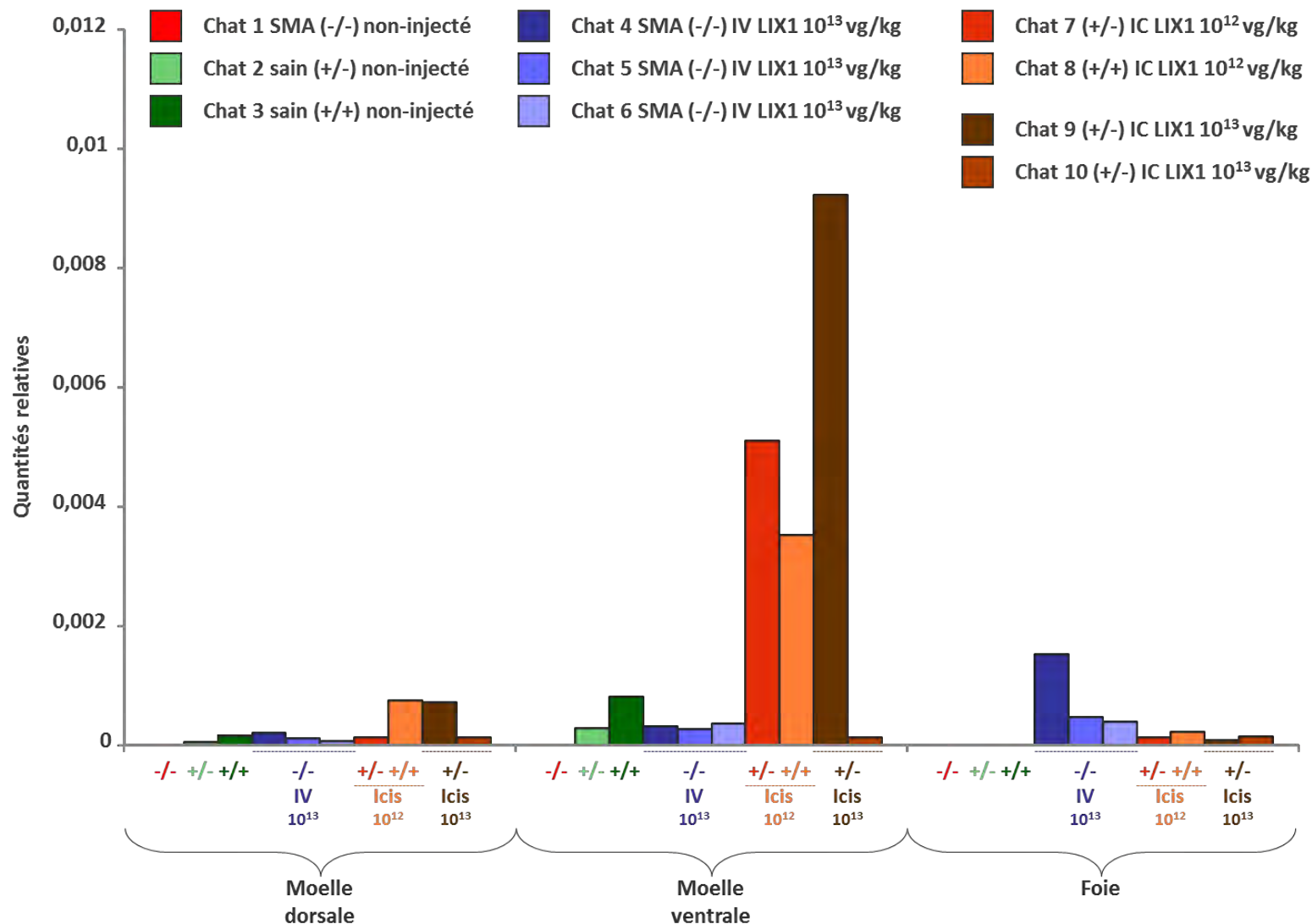


Fig.21) Quantités relatives d'ARNm *fLIX1* retrouvé dans la moelle et le foie de chats contrôles, des chats *LIX1*^{-/-} malades injectés *LIX1* en IV néonatale et de chats sains injectés *LIX1* en ICis néonatale.

II.4 Cartographie de l'expression de la GFP dans le SNC de chats adultes et nouveau-nés après injection intracisternale d'AAV9

Article format *Short Note* en préparation le 16/05/2013.

Intracisternal delivery of AAV9 results in oligodendrocyte and motor neuron transduction in the whole central nervous system of adult cats.

Thomas Bucher*¹, Laurence Dubreil *², Marie-Anne Colle ², Maud Maquigneau¹, Johan Deniaud², Philippe Moullier^{1,3}, Béatrice Joussemet^{1#}.

* The two authors contributed equally to this work

¹ INSERM UMR U1089, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France.

² INRA UMR U703, Nantes-Atlantic College of Veterinary Medicine

Food Science and Engineering (Oniris), CS 44706, F-44307 Nantes Cedex 03, France.

³ Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA.

(#) Correspondence should be addressed to

Dr B Joussemet, PhD

Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM UMR1089

Institut de Recherche Thérapeutique 1

Université de Nantes

8 quai Moncousu

44007 Nantes Cedex 01, France.

Fax: (33) 2 28 08 04 16

Tel: (33) 2 40 08 04 15

e-mail: beatrice.joussemet@univ-nantes.fr

Short Title : AAV9 transduces motor neurons and oligodendrocytes

Number of words in abstract : 75

Number of words in the text : 1400

Abstract

The present study analysed the tropism of AAV9 in the central nervous system of cats after intracisternal delivery. In newborns and adults, the vector targets motor neurons all along the spinal cord. Surprisingly, AAV9 displays a particular tropism for oligodendrocytes in adults, but not in neonates, indicating that (i) the age of injection influences the neurotropism of AAV9 and (ii) AAV9 intracisternal delivery could be relevant for the treatment of both motor neuron and demyelinating disorders.

Keywords: AAV; intracisternal injections; central nervous system

Adeno-Associated viral (AAV) gene therapy holds great promise for the treatment of neurodegenerative disorders (1). However, intracerebral administration restricts gene expression in the neurons of the targeted brain structures and does not allow widespread gene delivery to the central nervous system (CNS), especially in glial cells (2-4), yet implicated in several neurological diseases or CNS injuries (5-8).

Delivery of AAV9 in the cerebrospinal fluid (CSF) was shown recently to transduce neurons throughout the CNS including brain, spinal cord or dorsal root ganglia (DRG) (9-13). Interestingly, the tropism of AAV9 seems to be affected by the age at the time of injection. Indeed, AAV9 preferentially targets glial cells and less efficiently neurons when administered intravenously (IV) in adult mice and primates (14, 15) in contrast to newborns (14, 16) or young animals (17).

The purpose of this study was to determine the tropism of AAV9 in the CNS according to the age of CSF delivery in cats. For this purpose, three 2-days old kittens (C1, C2, C3) and three 7-weeks old adult cats (C4, C5, C6) were injected with 10^{12} vg/kg of double cesium chloride (CsCl)-purified (18) self complementary (sc) AAV9-CMV-GFP in the *cisterna magna* with a volume of 1 ml/kg and sacrificed at 1 month post-injection by intracardiac perfusion of 4% paraformaldehyde under general anesthesia. Brain and spinal cord were cryopreserved in 30% sucrose, frozen on dry ice and cryostat-sectioned (10 μ m). The whole spinal cord was examined for GFP expression using a laser scanning confocal microscope (Nikon, C1, Champigny/Marne, France) equipped by a blue argon ion laser at 488m. A GFP signal was observed in the dorsal and ventral horns of the spinal cord in both neonates and adults (Fig. 1). In the dorsal horn, the GFP signal was found in the *gracile* and *cuneate fasciculus* indicating transduction of the DRG sensory neurons (data not shown). In the ventral horn, the choline acetyltransferase (ChAT) immunostaining performed as previously described (19) confirmed that a large number of motor neurons (MNs) express the GFP (Fig. 1 A, B, C in

adults; F, H, G in newborns) homogeneously all along the ventral horn from the cervical to the lumbar part (Fig. 1 J, L). Moreover, the GFP signal was also detected, in the axons of the sciatic nerve in both neonates and adults (Fig. 1 I, K). The GFP-positive MNs were scored in cervical and lumbar enlargements that innervate upper and lower limbs, respectively. The number of Nissl-stained (Neurotrace Molecular Probes, Life Technologies, Saint Aubin, France) and GFP-positive MNs was estimated relative to the total number of MNs using the NIS-Elements AR Image analyzer (Nikon imaging software, France) on 10 μ m thick sections (2 sections containing 2 ventral horns for each cervical and lumbar enlargement). MN quantification revealed that $86.1 \pm 6.8\%$ and $82.7 \pm 7.4\%$ of the lower MN expressed GFP in the cervical enlargement of the injected neonates and adults, respectively (table 1, expressed as mean $\pm$ SEM, no statistical difference: $p=0.38$ Mann Whitney test). The number of transduced MNs was slightly increased in the lumbar enlargement with $99.9 \pm 0.1\%$ (neonates) and $97.9 \pm 1.2\%$ (adults) GFP-positive MNs. No statistical difference ($p=0.5$ Mann Whitney test) was found between neonatal and adult injections in contrast to data previously obtained after IV injections (14-17), suggesting that the tropism of AAV9 for motor neurons was not affected by the animal age after intracisternal (ICis) injection. This difference could be related to the route of administration since the ICis injection confines the vector in the CNS, concentrating the AAV particles in the nervous tissue. Besides, the proportion of transduced motor neurons was higher in this study than those previously detected after IV injection in newborn cats (transduced motor neurons : $\approx 40\%$) and in adult cats (transduced motor neurons : $\approx 15\%$, (19)). Moreover, gfp-specific real-time quantitative PCR performed as previously described (20) in the spinal cord and in peripheral organs of the adult cats injected in the *cisterna magna* (C4, C5 and C6) and in 3 other adult cats (C7, C8, C9) injected with 10^{12} vg/kg of scAAV9-CMV-GFP in the jugular vein showed higher number of viral genomes in the spinal cord after ICis delivery (0.38 ± 0.04 vg/dg for ICis vs

0.02 $\pm$ 3 10^{-3} vg/dg for IV, 10^{-3} $\pm$ 7 10^{-4} vg/ dg for uninjected cat ; $p < 0.005$ Mann Whitney test) and a lower leakage of the vector to the periphery compared to the systemic administration of the vector (2.3 $\pm$ 0.8 vg/dg in liver for ICis vs 28.1 $\pm$ 16.2 vg/ dg for IV, 0.1 vg/ dg for uninjected cat ; supplementary Fig. 1). These results confirm that the delivery of AAV9 in the CSF via ICis targets a larger proportion of motor neurons than IV with a limited off target biodistribution of the vector in systemic organs, for instance liver, consistent with recent studies performed in other large animal models (11, 13, 21).

To determine the nature of the transduced cells throughout the CNS, coronal brain slices of the injected cats were also examined for GFP expression. As we previously showed, the AAV9 vector is able to transduce neurons in the cerebellum, thalamus, striatum, motor and sensory cortex of both newborn and adult injected cats (20). In addition to GFP-positive neurons, transduced astrocytes were also observed in the cortex (Fig.2) indicating that ICis injection of AAV9 resulted in both neuronal and astrocytic transduction in the gray matter of the brain, consistent with recent reports in adult primates (10, 11). More surprisingly, a large number of cells expressed GFP in the white matter of the brain and of the spinal cord in adult cats only. The glial nature of these GFP-positive cells was confirmed using antibodies directed against GFAP (Dako, Les Ulis, France, dilution: 1/4000) or Olig-2 (Millipore, MA, USA, dilution: 1/100) followed by a biotinylated rabbit anti-goat antibody (Dako, dilution: 1/300) and Alexa fluor 555-conjugated streptavidin or an Alexa fluor 555 goat anti-mouse antibody (Life Technologies, dilution: 1/300). GFAP-positive fibrous astrocytes (Fig.2) and a significant number of oligodendrocytes expressed GFP throughout both the *corona radiata* and the white matter of the spinal cord only in adult cats (Fig.2).

This difference of AAV9 tropism between neonates and adults could be related to AAV9 receptors. Indeed, AAV9 uses galactose as a receptor to transduce many different cell types *in vitro* (22) and tissue glycosylation profiles was shown to affect AAV9 tropism (23). Tissue

glycosylation level could therefore explain the different transduction profiles observed in the CNS of newborn and adult cats after AAV9 ICis delivery. The purity of AAV vector preparations could also influence the tropism of AAV in the CNS. Indeed, the first-generation of cesium chloride (CsCl)-purified AAV vectors has been described to contain large amount of impurities (18) and to display an astroglial transduction pattern in contrast to the expected neuronal expression (24). In this study, we used an optimized CsCl protocol (18) resulting in higher AAV vector purity (not shown) that could explain the high transduction efficiency observed both in neurons and oligodendrocytes.

On the other hand, our study clearly provides evidences that ICis delivery of AAV9 is an efficient strategy to mediate high transduction of oligodendrocytes in the whole feline CNS in contrast to AAV intracerebral injections that usually target a small number of oligodendrocytes locally (25, 26).

To investigate the immunotoxicity induced by AAV9 ICis delivery, we quantified the AAV9 capsid neutralizing antibodies in the serum and in the CSF of injected cats at the time of sacrifice according to a previously described procedure (27). The antibody titer was reported as the highest serum dilution that inhibited single stranded (ss) AAV2/9.CMV.LacZ transduction of HeLaT cells by 100%. The ICis route systematically resulted in AAV9 antibodies in the sera with a titer varying between 1/10 and 1/2000, independently of the age of the animal (Table 2). In contrast, AAV9 antibodies were detected in the CSF of only one adult cat, at low level (1/20, Table 2). These results suggest that it is possible to re-inject AAV9 in the CSF of animals that received an initial ICis injection of the vector. This important observation is reinforced by a recent study describing spinal cord transduction after intrathecal delivery of AAV9 vector in non-human primates despite the presence of AAV9 neutralizing antibodies at a low level in the CSF prior vector injection (28).

Altogether, the results of this study highlight the potential of ICis AAV9 delivery to transfer therapeutic gene both to motor neurons and oligodendrocytes in the whole CNS providing a potential application for the treatment of motor neuron and demyelinating diseases.

References

1. **Hester, M. E., K. D. Foust, R. W. Kaspar, and B. K. Kaspar.** 2009. AAV as a gene transfer vector for the treatment of neurological disorders: novel treatment thoughts for ALS. *Current gene therapy* **9**:428-433.
2. **Cearley, C. N., and J. H. Wolfe.** 2006. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **13**:528-537.
3. **Sondhi, D., N. R. Hackett, D. A. Peterson, J. Stratton, M. Baad, K. M. Travis, J. M. Wilson, and R. G. Crystal.** 2007. Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15**:481-491.
4. **Taymans, J. M., L. H. Vandenberghe, C. V. Haute, I. Thiry, C. M. Deroose, L. Mortelmans, J. M. Wilson, Z. Debyser, and V. Baekelandt.** 2007. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Human gene therapy* **18**:195-206.
5. **Philips, T., and W. Robberecht.** 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet neurology* **10**:253-263.
6. **Prineas, J. W., and J. D. Parratt.** 2012. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Annals of neurology* **72**:18-31.
7. **Mekhail, M., G. Almazan, and M. Tabrizian.** 2012. Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. *Progress in neurobiology* **96**:322-339.
8. **Biffi, A., P. Aubourg, and N. Cartier.** 2011. Gene therapy for leukodystrophies. *Human molecular genetics* **20**:R42-53.
9. **Gray, S. J., S. B. Foti, J. W. Schwartz, L. Bachaboina, B. Taylor-Blake, J. Coleman, M. D. Ehlers, M. J. Zylka, T. J. McCown, and R. J. Samulski.** 2011.

- Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Human gene therapy* **22**:1143-1153.
10. **Samaranch, L., E. A. Salegio, W. San Sebastian, A. P. Kells, K. Foust, J. Bringas, C. Lamarre, J. Forsayeth, B. K. Kaspar, and K. Bankiewicz.** 2011. AAV9 Transduction In The Central Nervous System Of Non-Human Primates. *Human gene therapy*.
 11. **Samaranch, L., E. A. Salegio, W. San Sebastian, A. P. Kells, J. Bringas, J. Forsayeth, and K. Bankiewicz.** 2013. Strong Cortical and Spinal Cord Transduction after Aav7 and Aav9 Delivery into the Csf of Non-Human Primates. *Human gene therapy*.
 12. **Snyder, B. R., S. J. Gray, E. T. Quach, J. W. Huang, C. H. Leung, R. J. Samulski, N. M. Boulis, and T. Federici.** 2011. Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Human gene therapy* **22**:1129-1135.
 13. **Federici, T., J. S. Taub, G. R. Baum, S. J. Gray, J. C. Grieger, K. A. Matthews, C. R. Handy, M. A. Passini, R. J. Samulski, and N. M. Boulis.** 2011. Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene therapy*.
 14. **Foust, K. D., E. Nurre, C. L. Montgomery, A. Hernandez, C. M. Chan, and B. K. Kaspar.** 2009. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* **27**:59-65.
 15. **Gray, S. J., V. Matagne, L. Bachaboina, S. Yadav, S. R. Ojeda, and R. J. Samulski.** 2011. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **19**:1058-1069.
 16. **Foust, K. D., X. Wang, V. L. McGovern, L. Braun, A. K. Bevan, A. M. Haidet, T. T. Le, P. R. Morales, M. M. Rich, A. H. Burghes, and B. K. Kaspar.** 2010. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* **28**:271-274.

17. **Bevan, A. K., S. Duque, K. D. Foust, P. R. Morales, L. Braun, L. Schmelzer, C. M. Chan, M. McCrate, L. G. Chicoine, B. D. Coley, P. N. Porensky, S. J. Kolb, J. R. Mendell, A. H. Burghes, and B. K. Kaspar.** 2011. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **19**:1971-1980.
18. **Ayuso, E., F. Mingozzi, J. Montane, X. Leon, X. M. Anguela, V. Haurigot, S. A. Edmonson, L. Africa, S. Zhou, K. A. High, F. Bosch, and J. F. Wright.** 2010. High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene therapy* **17**:503-510.
19. **Duque, S., B. Jousset, C. Riviere, T. Marais, L. Dubreil, A. M. Douar, J. Fyfe, P. Moullier, M. A. Colle, and M. Barkats.** 2009. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **17**:1187-1196.
20. **Bucher, T., M. A. Colle, E. Wakeling, L. Dubreil, J. Fyfe, D. Briot-Nivard, M. Maquigneau, S. Raoul, Y. Cherel, S. Astord, S. Duqué, T. Marais, T. Voit, P. Moullier, M. Barkats, and B. Jousset.** 2013. scAAV9 intracisternal delivery results in efficient gene transfer to the central nervous system of a feline model of motor neuron disease. *Human gene therapy* **in press**.
21. **Gray, S. J., S. Nagabhushan Kalburgi, T. J. McCown, and R. Jude Samulski.** 2013. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene therapy* **20**:465.
22. **Bell, C. L., B. L. Gurda, K. Van Vliet, M. Agbandje-McKenna, and J. M. Wilson.** 2012. Identification of the galactose binding domain of the adeno-associated virus serotype 9 capsid. *Journal of virology* **86**:7326-7333.
23. **Shen, S., K. D. Bryant, J. Sun, S. M. Brown, A. Troupes, N. Pulicherla, and A. Asokan.** 2012. Glycan binding avidity determines the systemic fate of adeno-associated virus type 9. *Journal of virology* **86**:10408-10417.
24. **Klein, R. L., R. D. Dayton, J. B. Tatom, K. M. Henderson, and P. P. Henning.** 2008. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype,

- promoter and purification method. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **16**:89-96.
25. **Chen, H., D. M. McCarty, A. T. Bruce, and K. Suzuki.** 1999. Oligodendrocyte-specific gene expression in mouse brain: use of a myelin-forming cell type-specific promoter in an adeno-associated virus. *Journal of neuroscience research* **55**:504-513.
 26. **Piguet, F., D. Sondhi, M. Piraud, F. Fouquet, N. R. Hackett, O. Ahouansou, M. T. Vanier, I. Bieche, P. Aubourg, R. G. Crystal, N. Cartier, and C. Sevin.** 2012. Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice. *Human gene therapy* **23**:903-914.
 27. **Calcedo, R., L. H. Vandenberghe, G. Gao, J. Lin, and J. M. Wilson.** 2009. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of infectious diseases* **199**:381-390.
 28. **Gray, S. J., S. Nagabhushan Kalburgi, T. J. McCown, and R. Jude Samulski.** 2013. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene therapy* **20**:450-459.

Acknowledgments

We would like to thank Lydie Guigand and Mireille Ledevin of the UMR703 Laboratory for their assistance with autopsies and congelation of samples. This work was supported by the «Association Française contre les Myopathies » (AFM), SMA-Europe and the Fondation d'Entreprises pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire.

Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

TABLE 1. Proportion of spinal transduced MNs in cats injected with scAAV9-CMV-GFP by intracisternal route

Age at injection	Cat	Proportion of GFP-positive motor neurons	
		Cervical enlargement	Lumbar enlargement
2 days (newborn)	C1	51.4+/-3.3	100
	C2	100	100
	C3	98.7+/-1.3	99.7+/-0.3
50 days (adult)	C4	100	100
	C5	48.2+/-3.2	95.6+/-2.3
	C6	100	100

Results are expressed as means +/- SEM. Abbreviations: C, cat; MN, motor neuron.

TABLE 2. Anti-AAV9 antibodies in cats injected with scAAV9-CMV-GFP by intracisternal route

Age at injection	Cat	Anti-AAV9 antibodies		
		In serum		In CSF
		Before inj.	After inj.	After inj.
2 days (newborn)	C1	NA	1/100	<1/10
	C2	NA	1/1000	<1/10
	C3	NA	1/2000	<1/10
50 days (adult)	C4	<1/10	1/10	<1/10
	C5	<1/10	1/100	1/20
	C6	<1/10	1/500	<1/10

Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; C, cat; inj, injection; CSF, cerebrospinal fluid;

NA, not available; sc, self complementary; vg, vector genome

Figures

FIG. 1. AAV9 displays an important tropism for motor neurons after CSF delivery in cats that is not affected by the age of injection.

Transverse sections of the cervical spinal cord from respectively adult cat C5 (**A**) or neonate cat C1 (**E**) observed by laser scanning confocal microscopy 30 days after the injection of 10^{12} vg/kg of scAAV9-CMV-GFP into the *cisterna magna* (arrows: GFP positive MNs). Scale bar 500 μ m. Transverse sections of the cervical spinal cord from the adult cat C5 (**B-D**) or the neonate cat C1 (**F-H**) with ChAT immunolabeling. Colocalisation of ChAT immunolabeled MNs with GFP native fluorescence in MNs was observed in ventral horn (arrow). Scale bar 100 μ m. Transverse sections of the sciatic nerve from the adult cat C5 (**I**) or the neonate cat C1 (**K**) observed by laser scanning confocal microscopy. Scale bar 100 μ m. longitudinal section (1 mm) of the thoracic spinal cord from the adult cat C5 (**J**) or the neonatal cat C1 (**L**) observed by laser scanning confocal microscopy showed homogenous expression of GFP in motor neurons all along the spinal cord. Scale bar 100 μ m. Transverse sections of the lumbar spinal cord from the adult cat C5 (**M**) or the neonate cat C1 (**N**) with Nissl-staining observed by laser scanning confocal microscopy. Scale bar 500 μ m. VH, ventral horn.

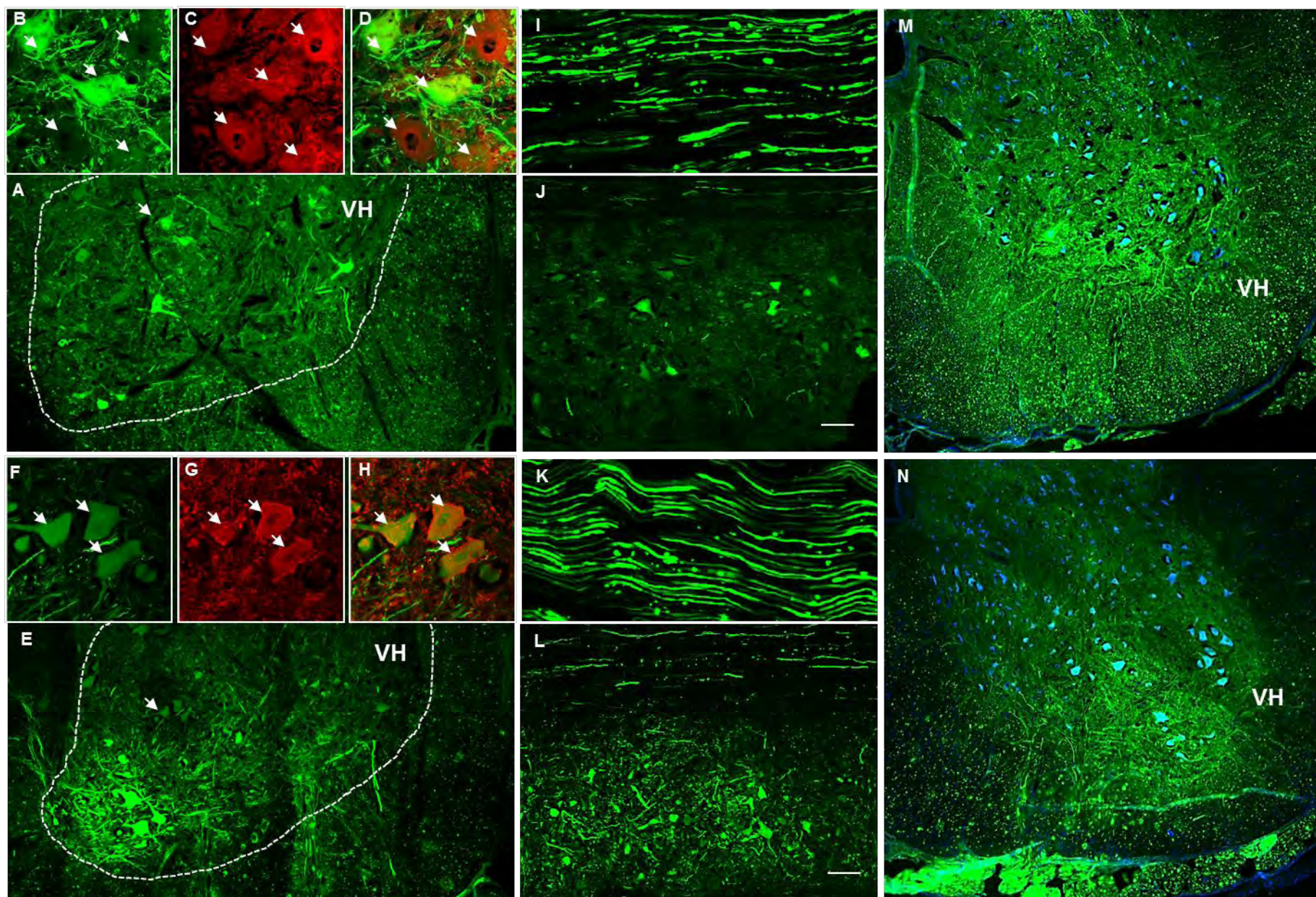
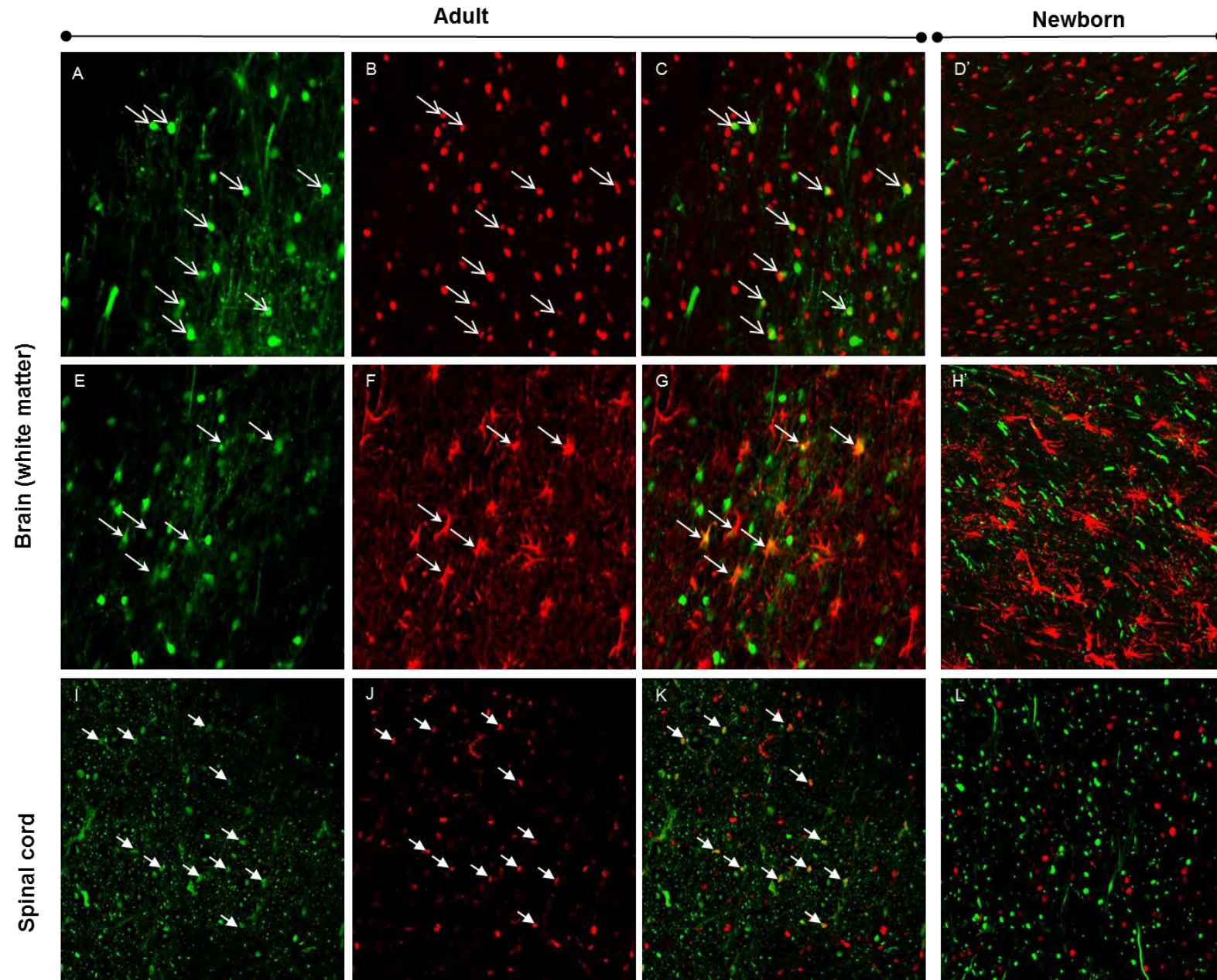


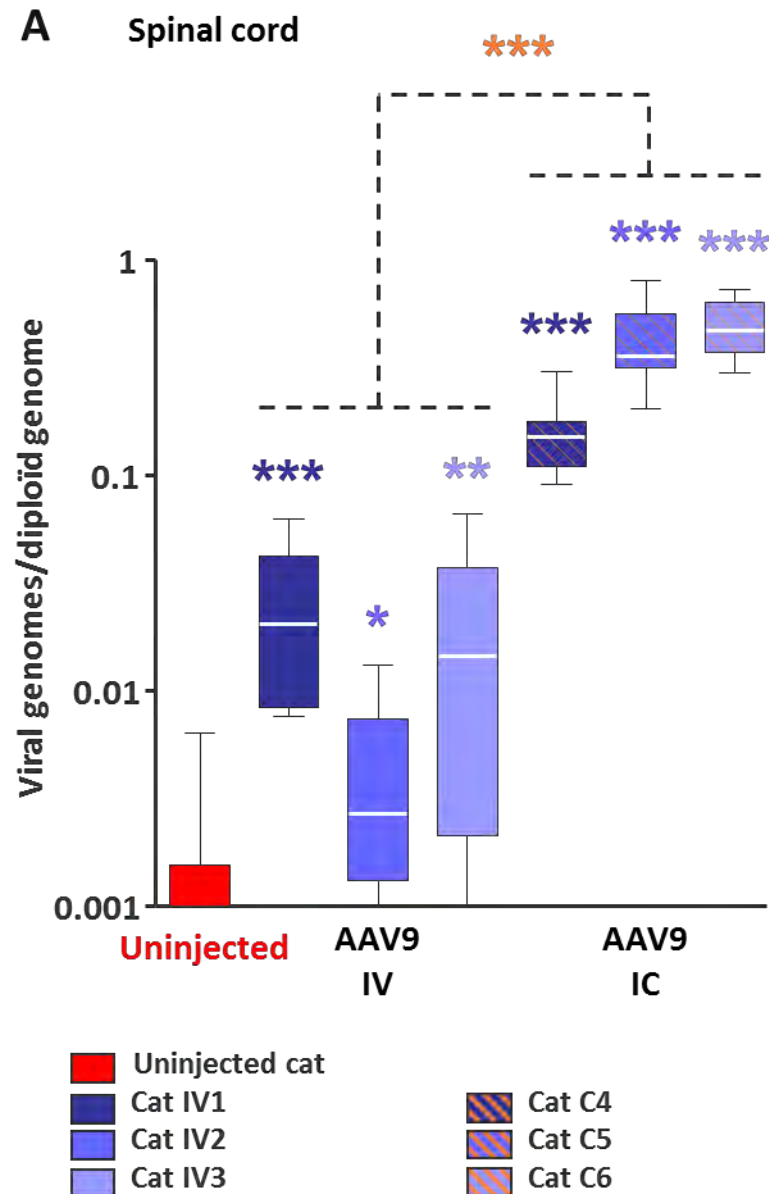
FIG. 2. Intracisternal delivery of scAAV9-CMV-GFP mediates transgene expression in oligodendrocytes throughout the brain and the spinal cord white matter in adult-injected cats.

Transverse sections of the brain (**A-H**) or the spinal cord (**I-L**) white matter with GFP native fluorescence (**A, E, I**), Olig2 staining (**B, F, J**) or merged images of Olig2 staining and direct GFP fluorescent (**C, G, K, D, H, L**), 30 days after the injection of 10^{12} vg/kg of scAAV9-CMV-GFP into the *cisterna magna* of the adult cat C5 (**A-C, E-G, I-K**) or the neonatal cat C1 (**D, H, L**) (arrows: GFP positive oligodendrocytes).



Supplementary FIG. 1. scAAV9-CMV-GFP intracisternal delivery mediates higher number of viral genomes in the central nervous system and lower dispersion in periphery compared to systemic scAAV9-CMV-GFP delivery.

Results of gfp-specific real-time quantitative PCR in the spinal cord (A) or in peripheral organs (B) of 3 adult cats (Cat IV1, IV2, IV3) injected in the jugular vein with 10^{12} vg/kg of scAAV9-CMV-GFP and 3 adult cats (cats C4, C5 and C6) injected in the *cisterna magna* with 10^{12} vg/kg of scAAV9-CMV-GFP. Data were expressed in number of viral genomes (vg) per diploid genome. Differences between groups were analyzed using t-test. *p* values <0.05 were considered significant. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.



B Peripheral organs

Cat IV1	Cat IV2	Cat IV3	IV AAV9
67.815	15.960	0.622	Liver
18.565	0.710	0.029	Heart
0.154	0.032	0.007	Kidney
0.041	0.013	0.029	Gonad
0.068	0.064	0.006	Forelimb muscle
0.301	0.027	0.005	Hindlimb muscle
Cat C4	Cat C5	Cat C6	IC AAV9
0.927	5.361	0.483	Liver
0.008	0.079	0.411	Heart
0.006	0.047	0.039	Kidney
0.001	0.020	0.006	Gonad
0.001	0.004	0.005	Forelimb muscle
0.001	0.005	0.006	Hindlimb muscle

Uninjected cat

0.047 +/- 0.034

<0,1
<1
<10
>10
vg/dg

Detection threshold: 0,001 copies/cell

III Discussion et perspectives

« Une civilisation sans la Science, ce serait aussi absurde qu'un poisson sans bicyclette. »
Pierre Desproges

Discussion et perspectives

Transférer un transgène thérapeutique au sein des MN répartis dans l'ensemble de la moelle a longtemps représenté une difficulté majeure et un obstacle à l'élaboration d'essais de thérapie génique dans le cadre des maladies du MN. Une deuxième difficulté, commune à un grand nombre de maladies génétiques ou de maladies neurodégénératives, correspond au choix d'un transgène thérapeutique dont l'expression dans la population cellulaire ciblée permettrait de ralentir voire d'arrêter le processus pathologique. Si dans le cadre de la SMA, une augmentation de l'expression de SMN dans les MN peut suffire à réduire la dégénérescence des MN ([Foust 2010](#), [Valori 2010](#), [Dominguez 2011](#), [Glascock 2012a](#)), le choix d'un transgène capable de ralentir la dégénérescence motoneuronale se révèle plus difficile pour d'autres maladies du MN, comme l'ALS pour laquelle 90% des formes sont sporadiques avec une pathogénie encore mal comprise. Dans ce cas, le choix se porte plutôt sur des facteurs de croissance neuroprotecteurs dont l'expression dans la moelle pourrait enrayer le processus physiopathologique menant à la mort des MN.

L'objectif principal de cette étude a été de mettre au point un essai de thérapie génique, dans le modèle félin LIX1, capable de ralentir ou d'arrêter le processus physiopathologique menant à la destruction des MN, dans le but d'une application clinique potentielle à l'homme. Pour cela, il nous fallait donc tenter de répondre aux deux problématiques citées précédemment, c'est-à-dire trouver (i) une stratégie de transfert de gènes touchant les MN tout le long de la moelle du chat, et (ii) un transgène dont l'expression dans la moelle serait capable d'arrêter le processus neurodégénératif menant à la perte des MN félins.

En tentant de répondre à ces questions, nous avons identifié une stratégie de transfert de gènes particulièrement efficace pour cibler les MN tout le long de la moelle : l'administration intracisternale de vecteur scAAV9.

Nous avons par ailleurs montré que l'efficacité de transduction des MN par cette voie ICis n'était pas affectée par l'âge d'injection et nous avons découvert que chez le chat adulte, cette stratégie permettait également de cibler de nombreux oligodendrocytes dans l'ensemble du SNC, dans la substance blanche du cerveau et de la moelle, ce qui pourrait se révéler particulièrement intéressant pour le traitement des maladies démyélinisantes du SNC, comme les leucodystrophies ou la sclérose en plaques.

Malgré l'identification d'une stratégie de transfert de gènes efficace pour cibler les MN tout le long de la moelle chez le chat nouveau-né comme chez le chat adulte, nous n'avons pas mis en évidence d'amélioration clinique, électrophysiologique ou histologique, quel que

Discussion et perspectives

soit le transgène thérapeutique utilisé, c'est-à-dire le facteur neuroprotecteur VEGF ou le cDNA LIX1 dont la délétion serait potentiellement responsable de la pathologie neurodégénérative féline. Ces résultats montrent que :

- pour le VEGF, la surexpression d'un facteur neuroprotecteur dans la moelle à des concentrations connues pour avoir des effets neuroprotecteurs (>10 pg/mg de protéines totales, [Nicoletti 2008](#)) ne suffit pas pour traiter des pathologies caractérisées initialement par une dénervation et une perte des axones moteurs antérieurs à la dégénérescence des MN comme cela a récemment été montré avec un autre facteur neuroprotecteur, l'IGF1, dans un modèle murin modéré de SMA ([Tsai 2012](#)) ;
- pour le cDNA LIX1, son apport par thérapie génique dans la moelle ne suffit pas à corriger la maladie neurodégénérative féline, suggérant l'implication d'autres facteurs dans la pathogénie de la maladie, ou un rôle plus précoce de la protéine LIX1 au cours du développement.

Efficacité des voies d'injection

Au cours de notre étude, trois modes d'injection d'un vecteur AAV, *i.e.* IC, ICis et IV, ont été testés chez le chat dans le but d'apporter et d'exprimer un transgène potentiellement thérapeutique dans le SNC. Les détails de ces injections sont résumés dans le **tableau 7**. Nos résultats ont indiqué qu'une stratégie d'injection de vecteur scAAV9 par voie ICis semble particulièrement efficace pour cibler le tissu nerveux et pourrait de ce fait être transposable en clinique pour les maladies du MN.

Transgène	Age à l'injection (jours)	Voie	Vecteur	Dose (vg/kg)	n
mVEGF	50	IC	ssAAV1-PGK	10^{12}	5
	50	ICis	ssAAV1-PGK	10^{12}	3
			scAAV9-PGK	10^{12}	4
				10^{13}	1
	50	IV		10^{12}	3
	2		scAAV9-PGK	10^{13}	4
fLIX1	2			10^{14}	1
	2	IV	scAAV9-CMV	10^{13}	3
		ICis	scAAV9-CMV	10^{12}	2
				10^{13}	2
GFP	50	ICis	scAAV9-CMV	10^{12}	3
	2				3

Tab. 7) Récapitulatif des injections réalisées chez le chat au cours de cette étude. pi : post-injection, IC : intracérébral, ICis : intracisternal, IV : intraveineux.

Résultats avec la voie IC

Les injections IC de vecteur ssAAV1-PGK-mVEGF dans le cortex moteur et la capsule interne à une dose de 10^{12} vg/kg chez le chat adulte ont mené à la présence du génome viral à un niveau important (moyenne de 8,3 vg/hdg) au niveau des sites d'injection, et à la diffusion du vecteur, tout le long de la moelle ainsi que dans les nerfs périphériques, avec une moyenne de 0,02 vg/hdg dans la moelle. Néanmoins, la protéine mVEGF n'a pas pu être détectée dans la moelle des chats injectés. Ces résultats confirment l'efficacité de transduction de l'AAV1 dans le cerveau de chat ([Vite 2003](#)), en particulier dans les MN corticaux et les faisceaux d'axones de la matière blanche, conduisant à un transport antérograde des particules d'AAV vers la moelle comme cela a été montré chez le rat et le macaque ([Ciron 2009](#), [Blits 2010](#), [Hutson 2012](#)). Toutefois, ce transport antérograde ne semble pas suffisant pour transduire efficacement la moelle, ce qui est cohérent avec des observations réalisées après des injections d'AAV5-GDNF au niveau du cortex moteur chez le rat, indiquant de faibles niveaux de protéine GDNF (<5 pg/mg) dans la moelle ([Foust 2008](#)). Il est probable que la faible expression des facteurs VEGF et GDNF dans la moelle après injection de vecteur AAV dans le cortex moteur soit due au fait que les particules d'AAV sont piégées dans les axones

du tractus cortico-spinal et/ou qu'elles ne parviennent pas à traverser la synapse connectant les MN corticaux aux MN spinaux. Un moyen de vérifier cette hypothèse serait d'utiliser une technique d'hybridation *in situ* avec une sonde fluorescente complémentaire du génome viral, qui pourrait ainsi confirmer que les copies de vecteur que nous avons détecté dans la moelle sont bien situées au niveau des cordons ventraux de la matière blanche. Il pourrait également être intéressant de tester des injections IC de vecteur scAAV9 qui semble avoir une capacité pour franchir les barrières cellulaires, et un tropisme important pour les motoneurons de la moelle. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus avec l'AAV1, qui est décrit comme étant un des sérotypes les mieux transportés le long des axones ([Hollis 2008](#), [Hutson 2012](#)), suggèrent que des injections d'AAV par voie IC ne constituent pas une stratégie particulièrement efficace pour apporter une protéine thérapeutique à l'ensemble de la moelle.

Résultats avec la voie IV

Les injections IV de vecteur scAAV9 présentent une alternative moins invasive que la voie IC pour cibler la moelle. En effet, dans une précédente étude, notre équipe avait indiqué qu'un vecteur scAAV9-CMV-GFP était capable de transduire, 15 jours après administration dans la circulation sanguine, environ 15% des MN de la moelle d'un chat adulte et 40% de MN chez un chat nouveau-né ([Duque 2009](#)). Toutefois, nous avons montré dans la présente étude que des injections de vecteur scAAV9-PGK-mVEGF, à une dose de 10^{12} vg/kg chez des chats adultes ou à une dose de 10^{13} vg/kg chez des chats nouveau-nés, aboutissent 100 jours post-injection à une faible présence du vecteur dans la moelle, avec en moyenne 0,003 et 0,07 vg/hdg, respectivement. De plus, le niveau de protéine mVEGF mesuré dans la moelle de ces chats n'a pas été retrouvé significativement augmenté par rapport aux chats non-injectés. Une forte transduction a en revanche été observée en périphérie du SNC, notamment dans le foie et les muscles. Le même profil a été obtenu 150 jours après injection de 10^{13} vg/kg de vecteur scAAV9-CMV-fLIX1 chez des chats nouveau-nés, avec une quantité de vecteur moyenne de 0,155 vg/hdg dans la moelle, 0,73 vg/hdg dans les muscles, 0,64 vg/hdg dans le cœur et plus de 50 vg/hdg dans le foie. L'ensemble de nos résultats indique que, si le vecteur scAAV9 est capable d'atteindre la moelle à travers la BHM, il reste majoritairement piégé dans les tissus périphériques, en particulier les organes fortement vascularisés qui jouent alors un rôle de filtre. Ceci peut poser problème en termes de biosécurité, comme en témoigne la mort d'un chaton 10 jours après injection IV néonatale d'une forte dose (10^{14} vg/kg) de scAAV9-PGK-

mVEGF (donnée non montrée). Ce chaton a en effet présenté de multiples épanchements abdominaux, des plages de nécrose hépatique et une hypertrophie de l'oreillette droite du cœur, suggérant que la surexpression de VEGF suite à l'administration systémique de fortes doses de vecteur a perturbé la perméabilité vasculaire dans plusieurs organes périphériques. En dehors de l'apport de facteur de croissance potentiellement toxique en périphérie, la stratégie d'injections IV de vecteur scAAV9 pourrait s'avérer néanmoins pertinente pour des maladies du MN présentant simultanément une dégénérescence des MN et des lésions périphériques comme les formes sévères de SMA ([Vitte 2004](#), [Bevan 2010](#), [Hua 2011](#), [Shababi 2012](#)), comme l'indiquent les améliorations phénotypiques décrites après injections IV de vecteur scAAV9-SMN chez la souris SMN Δ 7 ([Foust 2010](#), [Valori 2010](#), [Dominguez 2011](#), [Glascock 2012a](#)).

Efficacité de la voie ICis

Au contraire des injections IV, les injections ICis permettent une concentration plus importante du vecteur au niveau du SNC tout en réduisant nettement la transduction en périphérie. En effet, avec un vecteur scAAV9-PGK-mVEGF injecté à une dose de 10^{12} vg/kg chez le chat adulte, nous avons retrouvé par voie ICis environ dix fois plus de protéine mVEGF dans la moelle que par voie IV, et deux à trois fois moins dans les muscles et le foie. Avec un vecteur scAAV9-CMV-LIX1 administré à une dose de 10^{13} vg/kg chez le chat nouveau-né, nous avons détecté après injection ICis environ quatre fois plus de vecteur dans la moelle qu'après injection IV et environ cinquante fois moins dans les muscles et le foie. Enfin, nous avons montré qu'un vecteur scAAV9-CMV-GFP injecté en ICis à une dose de 10^{12} vg/kg est capable de transduire entre 48 et 100% des MN dans la moelle cervicale et entre 96 et 100% des MN en région lombaire. Nos résultats chez le chat confirment ainsi la faible transduction périphérique après injections ICis de vecteur scAAV9 observée chez le porcelet nouveau-né ([Bevan 2011](#)) et chez le jeune porc adulte ([Federici 2011](#)).

Effet du sérotype

À l'heure actuelle, peu de sérotypes d'AAV ont été testés par voie ICis dans le but de transduire la moelle. Une étude a récemment montré que des injections ICis de vecteur scAAV7 à une dose de 10^{13} vg chez le macaque adulte aboutissent à une transduction de la

Discussion et perspectives

moelle similaire à celle obtenue avec un scAAV9 ([Samaranch 2013](#)). L'AAV7 avait auparavant été testé en IV chez la souris, ce qui avait abouti à une expression *in vivo* de la luciférase aussi rapide et étendue que pour l'AAV9 dans différents organes périphériques ([Zincarelli 2008](#)). Toutefois, cette dernière étude n'a pas permis d'identifier le tropisme de l'AAV7 pour la moelle, et sa capacité à franchir les barrières vasculaires n'est pas connue. Un vecteur scAAV2.5, hybride d'AAV2 possédant quelques acides aminés de la capside de l'AAV1, a également montré, après injection ICis à une dose de 2.10^{12} vg chez le macaque adulte, une forte efficacité pour la transduction des MN de la moelle, comparable à celle de l'AAV9 ([Gray 2013](#)). Ces résultats indiquent que d'autres sérotypes d'AAV sont capables, une fois injectés dans le LCS, de diffuser dans le tissu nerveux et de cibler les MN. Cela vient probablement du fait qu'une partie de la BHM est franchie lorsque les vecteurs sont administrés dans le LCS, puisque seules la pie-mère et une couche d'astrocytes séparent la matière grise de la moelle de l'espace subarachnoïdien. Ainsi, contrairement à la voie IV pour laquelle la capacité du vecteur AAV à franchir les barrières vasculaires est essentielle, il est possible que la diffusion des particules AAV depuis le LCS vers le SNC soit davantage dépendante du flux et de la pression de LCS, c'est-à-dire d'un mécanisme passif, que d'une reconnaissance active permettant de franchir certaines couches de cellules.

L'AAV10 pourrait également être intéressant à tester par voie ICis pour atteindre les MN. En effet, il a été montré que l'AAV10 a un profil de transduction dans le cerveau similaire à celui de l'AAV9 après injection IC chez la souris ([Cearley 2005](#)) et chez le rat ([Klein 2008](#)). Par voie IV néonatale, l'AAV10 a permis chez la souris une expression de luciférase plus intense que pour l'AAV9 dans l'ensemble du corps ([Hu 2010](#)). L'AAV10 est également particulièrement pertinent pour les applications cliniques, puisqu'étant à l'origine isolé chez le macaque rhésus, il bénéficie en théorie d'une faible immunité préexistante chez l'homme ([Mori 2004](#)). L'AAV10 est par ailleurs utilisé dans un essai clinique en cours concernant le traitement de la lipofuscinose ([Sondhi 2007](#), [Piguet 2012](#), [Sondhi 2012](#)).

Enfin, pour appliquer la stratégie ICis à des maladies purement neuronales, il pourrait être intéressant d'un point de vue biosécurité d'utiliser des modifications de la capside afin d'obtenir des vecteurs capables de concentrer davantage la transduction au SNC, comme l'AAV9.45 qui possède un tropisme hépatique plus faible que l'AAV9 ([Pulicherla 2011](#)).

Effet de l'âge

Contrairement à ce qui a été décrit avec des injections IV de vecteur scAAV9-CMV-GFP ([Foust 2009](#)) ou de scAAV9-CAG_{court}-GFP ([Bevan 2011](#)), nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'âge sur l'efficacité de transduction des MN de la moelle après injections ICis. En effet, à une dose de 10^{12} vg/kg, les injections de scAAV9-CMV-GFP dans le LCS ont abouti à une forte proportion de MN transduits dans l'ensemble de la moelle chez le chat nouveau-né comme chez le chat adulte. Cette différence de résultats entre les voies IV et ICis est probablement due au fait que les mécanismes de pénétration des particules d'AAV dans le SNC ne sont pas les mêmes depuis la circulation sanguine ou depuis le LCS. Ainsi, comme il a été discuté plus haut, le flux et la pression du LCS jouent vraisemblablement un rôle prépondérant dans la diffusion vers le parenchyme médullaire des particules injectées en ICis, qui traverseraient les couches astrocytaires externes et les cellules épendymaires du canal central en grande partie de façon passive et indépendamment de la maturité du SNC. Au contraire, la BHM constituerait un obstacle plus important à la pénétration du vecteur, nécessitant un franchissement actif avec internalisation des particules d'AAV dans les cellules endothéliales. En conséquence, la transduction du SNC après injections IV est plus importante dans les régions où la BHM est moins présente, comme les DRG dont les capillaires présentent, au contraire du reste du SNC, un endothélium fenêtré et donc une plus forte perméabilité ([Jimenez-Andrade 2008](#)). Les particules virales peuvent également atteindre la moelle de façon détournée, par transport rétrograde depuis le muscle squelettique qui est fortement transduit par voie IV. Chez le nouveau-né en revanche, la BHM est incomplète dans le sens où, si les cellules endothéliales présentent bien des jonctions serrées ([Lowenstein 2009](#), [Saunders 2009](#)), la couronne de pieds astrocytaires autour des capillaires est limitée puisque l'astrogénèse ne débute qu'en période postnatale ([Ek 2006](#), [Saunders 2009](#), [fig22](#)). Ainsi, le nombre de barrières cellulaires entre la circulation sanguine et le tissu nerveux est plus faible chez le nouveau-né, et l'AAV peut diffuser plus facilement dans le SNC, ce qui pourrait expliquer les proportions de MN transduits plus importantes chez les nouveau-nés injectés par voie IV.

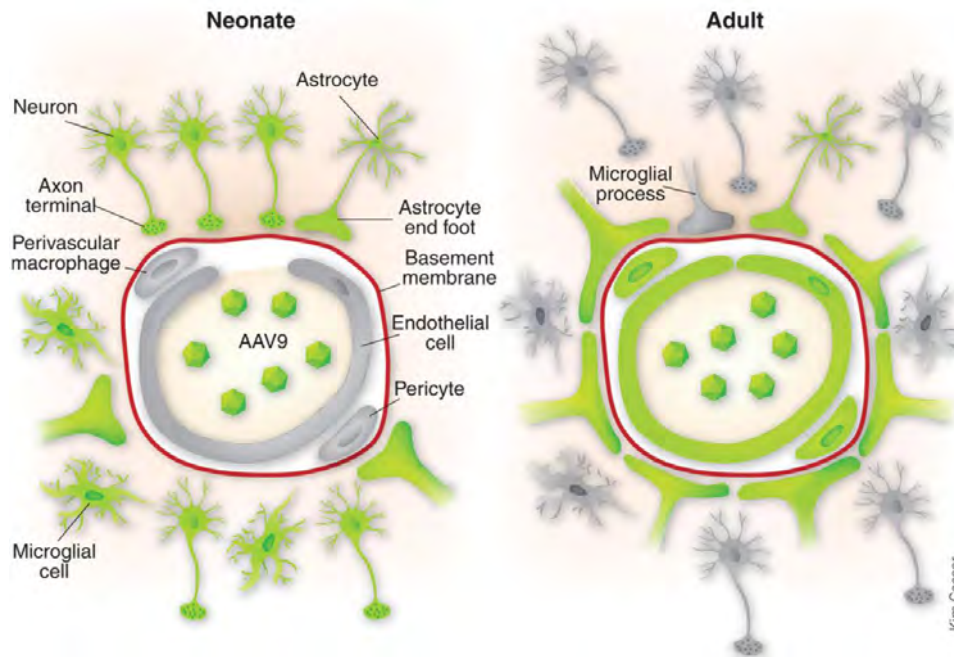


Fig.22) Modifications de la structure de la barrière hémato-méningée au cours du développement influençant la capacité de l'AAV9 à transduire différents types cellulaires dans le tissu nerveux. Tiré de ([Lowenstein 2009](#)).

Néanmoins, si la voie ICis semble être aussi efficace chez le chaton nouveau-né que chez le chat adulte pour la transduction des MN, nous avons relevé des différences concernant la transduction d'autres types cellulaires. En effet, nous avons retrouvé des astrocytes GFP-positifs dans la matière grise des chatons nouveau-nés et des chats adultes, mais nous avons observé dans la matière blanche des astrocytes et des oligodendrocytes transduits, uniquement chez les chats adultes. Cette différence pourrait être liée au fait que toutes les cellules du tissu nerveux ne se différencient pas au même moment, au cours du développement du SNC. Ainsi, à la naissance, tous les neurones sont différenciés tandis que les astrocytes ne sont pas tous fonctionnels ([Lowenstein 2009](#)) et les oligodendrocytes se mettent en place plus tardivement ([Kriegstein 2009](#), [fig23](#)).

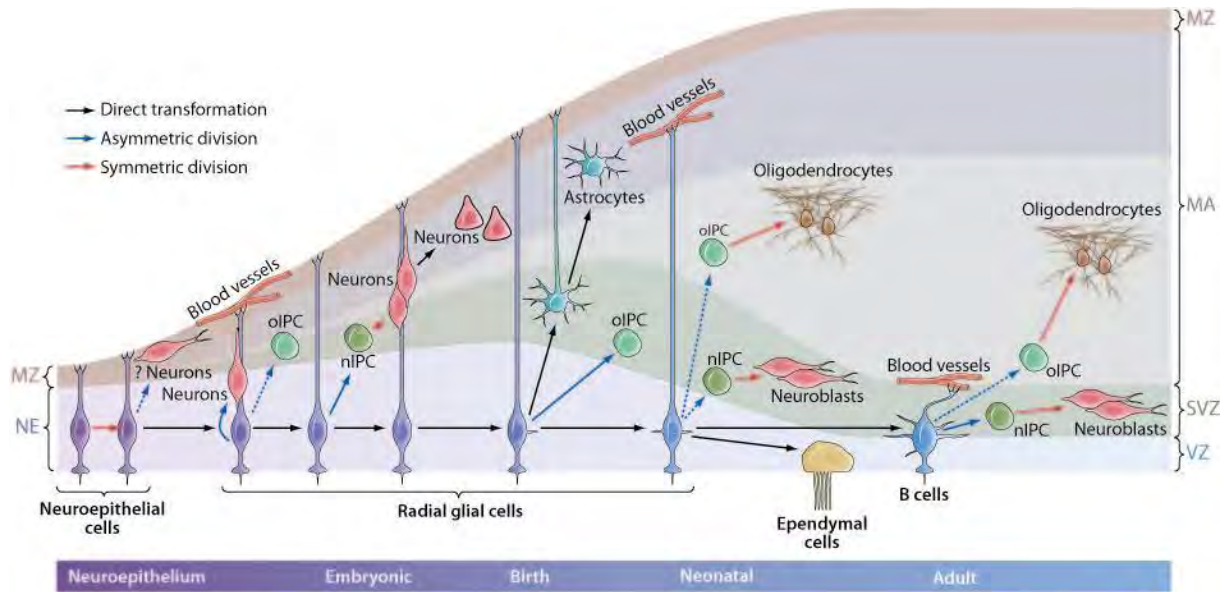


Fig.23) Différenciation des cellules souches neurales pour former le tissu nerveux mature. MA : manteau ; MZ : zone marginale ; NE : neuroépithélium ; nIPC : cellule progénitrice neurogénique ; oIPC : cellule progénitrice oligodendrocytique ; RG : glia radiale ; SVZ : zone subventriculaire ; VZ : zone ventriculaire. Tiré de ([Kriegstein 2009](#)).

Il est également probable qu'au cours de ces différenciations, les différentes cellules du SNC n'expriment pas de la même façon le galactose, qui sert de récepteur à l'AAV9 ([Bell 2012](#)), les protéoglycanes exposés à la surface des cellules pouvant être dans différents états de glycosylation, ce qui a été décrit comme ayant un fort impact sur l'efficacité de transduction de l'AAV9 ([Shen 2012](#)).

Par ailleurs, nos résultats indiquant une forte proportion d'oligodendrocytes transduits dans l'ensemble du SNC après injections ICis de vecteur scAAV9-CMV-GFP chez le chat adulte, sont en contraste avec ceux obtenus par voie IC qui ont montré une transduction restreinte à un faible nombre d'oligodendrocytes répartis autour du site d'injection ([Chen 1999](#), [Piguet 2012](#)). Des injections ICis de vecteur scAAV9 pourraient ainsi être applicables aux maladies démyélinisantes affectant les oligodendrocytes, comme la sclérose en plaques ou les leucodystrophies pour les formes les moins précoces.

Enfin, l'âge des animaux à l'injection peut également avoir un effet sur l'apparition d'une réponse immune dirigée contre le transgène ou contre la capside de l'AAV. En effet, le développement du système immunitaire est incomplet chez le chat nouveau-né ([Felsburg](#)

Discussion et perspectives

[2002](#), [Day 2007](#)). Or, il a déjà été montré que des injections IV néonatales de vecteur rétroviral recombinant pour le facteur IX ([Xu 2007](#)) ou des injections IM ou IV néonatales d'AAV9 recombinant pour la phosphatase alcaline ([Yue 2008](#)) permettent d'induire une expression à long terme des transgènes respectivement chez des chats et des chiens nouveau-nés, sans apparition de réponse immune cytotoxique spécifique du transgène. Au contraire, les mêmes injections chez des animaux adultes induisent l'apparition d'une réponse immune destructrice vis à vis des cellules transduites, ce qui suggère l'apparition d'une tolérance au produit du transgène lorsque les administrations de vecteurs sont réalisées en période néonatale. De plus, il a été montré qu'un transfert de gène néonatal pouvait permettre une réadministration d'un vecteur AAV dans un modèle canin de maladie métabolique ([Weinstein 2010](#)).

Ces données bibliographiques, associées au fait qu'il demeure difficile de mettre en place un traitement immunosuppresseur efficace et non létal chez des chatons nouveau-nés, nous ont conduit à ne pas immunosupprimer les chatons injectés en période néonatale. Chez ces chatons nouveau-nés, nous n'avons détecté ni réaction inflammatoire dans le tissu nerveux, ni apparition d'anticorps dirigés contre le VEGF ou la GFP suggérant l'absence de réponse immune destructrice vis-à-vis des cellules transduites, au moins au temps post-injection de l'étude, de manière concordante avec les données citées ci-dessus.

Chez les chats adultes, afin d'éviter toute réponse immune dirigée contre les cellules transduites qui pourrait interférer avec les résultats des tests cliniques et les analyses de la biodistribution du vecteur, nous avons systématiquement appliqué un régime immunosuppresseur, combinant la cyclosporine A et le mycophénolate mofétil. En effet, sans cette immunosuppression, un risque d'apparition d'anticorps dirigés contre le transgène persiste, comme nous l'avons observé pour un chat adulte injecté avec un vecteur scAAV9-PGK-mVEGF par voie IM sans mise en place d'une immunosuppression, ainsi que pour un chat injecté avec un vecteur scAAV9-CMV-GFP par voie IV, pour lequel le traitement immunosuppresseur a été interrompu. L'apparition d'anticorps anti-GFP a été associée dans ce dernier cas à une destruction des cellules transduites deux mois après l'injection du vecteur scAAV9-GFP (données non montrées).

Chez le chat adulte immunosupprimé, nous n'avons pas non plus détecté de réaction inflammatoire dans le tissu nerveux, ni d'anticorps dirigés contre le VEGF ou la GFP,

montrant que le traitement immunosuppresseur mis en place a été efficace pour prévenir toute réponse immune dirigée contre les cellules transduites.

Par contre, les injections ICis de scAAV9-PGK-mVEGF et de scAAV9-CMV-GFP ont toutes abouti à l'apparition d'anticorps anti-AAV9 dans le sérum, quel que soit l'âge d'injection. Les titres mesurés varient de 1/10 à 1/2000 indépendamment de l'âge ou de la dose injectée, mais également de l'efficacité de transduction, ce qui semble indiquer que ces niveaux d'anticorps neutralisants n'ont pas eu d'impact sur le transfert de gène dans la moelle. Par ailleurs, seul un chat injecté par voie ICis avec 10^{12} vg/kg de vecteur scAAV9-CMV-GFP a présenté un faible titre d'anticorps neutralisant dans le LCS, suggérant qu'il est en théorie possible de réinjecter le même vecteur par voie ICis. Ces résultats sont en accord avec les observations d'une étude récente indiquant que des injections ICis chez le macaque d'AAV9 ou d'AAV2.5 à une dose de $2 \cdot 10^{12}$ vg aboutissent à l'apparition dans leur sérum d'anticorps dirigés contre la capsid du vecteur injecté ([Gray 2013](#)). Cette étude a aussi montré que la présence à un faible niveau d'anticorps anti-AAV2.5 avant l'injection de ce vecteur (1:32 et 1:128) ne diminue pas l'efficacité du transfert de gène dans le SNC.

Effet du promoteur

Dans notre étude, la comparaison des voies IV et ICis a été réalisée avec les mêmes vecteurs : un scAAV9-PGK-mVEGF à une dose de 10^{12} vg/kg à 100 jours post-injection chez le chat adulte, et un scAAV9-CMV-fLIX1 à une dose de 10^{13} vg/kg à 150 jours post-injection chez le chat nouveau-né. Ainsi, nos résultats indiquant une meilleure efficacité de la voie ICis pour transduire la moelle et les MN ne sont pas biaisés par un effet du promoteur. Toutefois, notre étude n'a pas eu pour objectif de tester l'efficacité des promoteurs, et il n'est pas possible de comparer les résultats obtenus avec les constructions PGK-mVEGF et CMV-fLIX1. Aucune étude n'a par ailleurs réalisé de comparaison rigoureuse *in vivo* de ces deux promoteurs au sein d'un vecteur AAV. Le seul élément de réponse provient de travaux *in vitro* utilisant un lentivirus recombinant pour la GFP et indiquant que le PGK semble plus efficace pour transduire une culture primaire de neurones corticaux de souris, tandis que le CMV permettrait une plus forte expression dans les neurones cérébelleux de rat, les neurones différenciés issus de neuroblastome humain ainsi que dans une culture primaire d'astrocytes murins ([Li 2010](#)).

Discussion et perspectives

Une autre question concernant les promoteurs est de déterminer si l'efficacité de transcription du promoteur CMV est maintenue à long terme après injections ICis chez le chat, puisqu'une extinction du signal a été décrite par plusieurs études ([Klein 1998](#), [Tenenbaum 2004](#)). Une nette réduction de l'expression de GFP dans les MN a, en particulier, été observée chez la souris 70 jours après injections de vecteur scAAV9 par rapport au fort signal obtenu à 20 jours ([Gray 2011a](#)).

Dans notre étude chez le chat, nous avons obtenu près de 100% de MN transduits 30 jours après injections ICis de 10^{12} vg/kg de scAAV9-CMV-GFP chez le nouveau-né et l'adulte. Toutefois, comme nous n'avons pas réalisé de tests à plus long terme, il n'est pas possible d'en déduire la longévité de l'expression de la GFP dans la moelle féline contrôlée par le promoteur CMV. Un élément de réponse peut néanmoins être fourni par des résultats préliminaires obtenus par notre équipe chez le chat. En effet, 30 jours après injection IV néonatale de 10^{13} vg/kg de scAAV9-CMV-GFP, nous avons retrouvé environ 80% de MN transduits dans la moelle lombaire d'un chaton, et seulement 27 et 0% chez deux autres chatons injectés avec la même dose de vecteur mais analysés à 100 jours post-injection. Ces données préliminaires pourraient suggérer une extinction du promoteur CMV entre 30 et 100 jours post-injection, responsable de la réduction du nombre de MN transduits chez le chat. Ces résultats devront être prochainement approfondis par une analyse de qPCR de la moelle des chats injectés, associée à une étude de la méthylation du promoteur CMV dans ce contexte.

Afin de s'affranchir d'une potentielle extinction de l'expression à long terme du transgène dans la moelle tout en maintenant une efficacité de transduction optimale dans les MN, le promoteur CBh, un nouveau promoteur hybride dérivé du CAG_{courts}, a été construit et testé au sein d'un vecteur scAAV9 injecté dans le LCS à l'âge adulte chez la souris ([Gray 2011a](#)), le porc ([Federici 2011](#)) et le macaque ([Gray 2013](#)). Ces études ont indiqué, d'une part que le CBh présente une capacité de transcription dans les MN aussi importante que le CMV, et d'autre part qu'il permet de maintenir 30 jours post-injection la transduction dans un grand nombre de MN chez des modèles gros animaux.

Par ailleurs, des résultats préliminaires chez le chat ont montré que ce promoteur était aussi capable de maintenir l'expression de la GFP tout le long de la moelle 100 jours après injection ICis chez un nouveau-né injecté avec 10^{13} vg/kg de vecteur scAAV9-CBh-GFP ([fig24](#)). Ces résultats devront néanmoins être confirmés sur un plus grand nombre d'animaux.

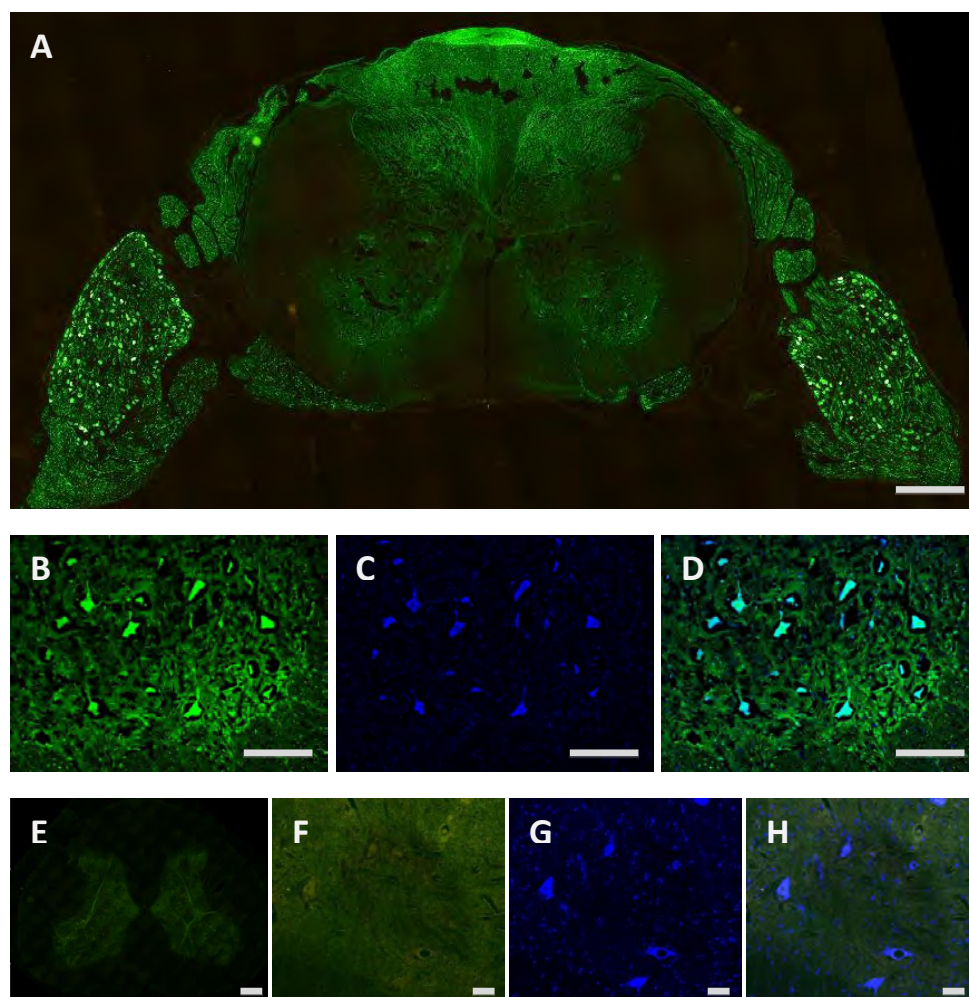


Fig.24) Expression du vecteur scAAV9-CBh-GFP chez un chaton nouveau-né injecté par voie ICis à une dose de 10^{13} vg/kg. Coupes transversales de moelle cervicale d'un chaton nouveau-né injecté par voie ICis à une dose de 10^{13} vg/kg (A) et d'un chaton non injecté (E) ; (B-D) agrandissements d'une corne ventrale de la moelle cervicale avec (B, F) le marquage GFP natif, (C, G) le marquage neurotrace, et (D, H) la superposition des deux. Le comptage des MN a indiqué pour ce chaton injecté 100% de MN transduits en région cervicale et 100% en région lombaire. Barres d'échelles : 200 μ m (A, E) et 25 μ m (B-D, F-H).

Perspectives

Bien que des injections ICis de vecteur scAAV9 semblent particulièrement efficaces pour apporter un transgène dans la moelle et les MN, une telle stratégie n'a pas encore été testée dans un contexte thérapeutique de maladie du MN autre que dans la présente étude chez le modèle félin LIX1^{-/-}. Il pourrait être intéressant de tester cette voie dans d'autres modèles

Discussion et perspectives

animaux de maladie du MN, chez les modèles murins de SMA ou chez des gros animaux comme le porc SMN-KO. En effet, comme suggéré dans une étude comparant des injections ICV et IV de scAAV9-CAG-SMN chez la souris SMN Δ 7 ([Glascock 2012a](#)), le vecteur scAAV9 injecté dans le LCS aboutit à une transduction majoritaire du SNC tout en fournissant une quantité plus faible mais suffisante aux organes périphériques. Des injections ICis de vecteur scAAV9 recombinant pour SMN pourraient ainsi permettre de réduire les doses de vecteur utilisées par rapport à une stratégie IV, tout en ayant une efficacité thérapeutique similaire voire supérieure. De la même façon, il pourrait être intéressant de comparer chez ces modèles animaux l'efficacité thérapeutique d'une stratégie d'injections ICis de vecteur scAAV9-SMN, à celle d'une stratégie basée sur des oligonucléotides antisens utilisés notamment par voies IV et ICV pour forcer l'inclusion de l'exon 7 au niveau de SMN2, et ainsi augmenter la quantité de protéines SMN fonctionnelles sans apporter de transgène nécessitant une forte expression dans les MN ([Porensky 2012](#), [Porensky 2013](#), [Zhou 2013](#)).

Enfin, il pourrait également être pertinent de tester des injections ICis de vecteur scAAV9 recombinant pour le gène SMN1 humain à long terme chez le macaque afin de déterminer dans quelles mesures cette stratégie peut être appliquée à l'homme. En effet, d'une part l'efficacité du transfert de gène suite à des injections IV n'est pas la même chez la souris ou chez le macaque, avec plus d'astrocytes et moins de MN transduits chez ce dernier malgré une dose comparable une fois rapportée au poids de l'animal ([Gray 2011b](#)). D'autre part, une plus forte efficacité de transduction a été retrouvée dans le cerveau après injections ICis chez le macaque, par rapport à une administration IV ([Samaranch 2012](#)). Ainsi, des injections ICis de vecteur scAAV9-CBh-hSMN pourraient être réalisées chez le macaque à une dose de 10^{12} vg/kg ou de 10^{13} vg/kg, avec une analyse de la biodistribution à 3 mois post-injection et une recherche d'anticorps neutralisants dirigés contre la capsid de l'AAV9. Cela apporterait de nombreux éléments concernant la faisabilité d'une telle stratégie chez des patients SMA, notamment en statuant par rapport aux précédents titres d'anticorps observés après injections ICis chez le macaque d'AAV9 ([Samaranch 2013](#)) ou d'AAV2.5 ([Gray 2013](#)). Cela permettrait également d'étudier la potentielle toxicité associée à la surexpression de SMN, son rôle au sein des complexes d'épissage serait en effet susceptible de perturber un certain nombre de fonctions. D'autre part, il a été montré *in vitro* que la surexpression de SMN mène à une accumulation cytoplasmique de complexes SMN et à une altération de la structure nucléaire de la cellule ([Sleeman 2003](#)).

Efficacité thérapeutique

Dans notre étude, nous avons utilisé des vecteurs scAAV9 recombinants pour le cDNA codant pour la protéine VEGF murine ou le cDNA codant pour la protéine LIX1 féline, afin d'évaluer l'impact phénotypique de ces deux facteurs potentiellement thérapeutiques chez le chat LIX1^{-/-}. Nous n'avons pas observé d'amélioration clinique suite à des injections de scAAV9-PGK-mVEGF par voies ICis et IV, ni de scAAV9-CMV-fLIX1 par voie IV néonatale. En effet, les examens cliniques ont indiqué pour les animaux traités des scores neurologiques et électromyographiques comparables à ceux mesurés chez des chats malades non traités, en termes de sévérité, de progression et d'âge d'apparition des symptômes. De plus, après le sacrifice des animaux, une analyse histologique des racines ventrales de la moelle lombaire a montré que le nombre d'axones moteurs de gros calibres était comparable chez les chats malades traités et non traités, en quantités plus faibles que chez les chats sains. Enfin, ces résultats ont été confirmés chez les chats injectés LIX1 par des analyses CMAP et accélérométriques, indiquant chez ces animaux un potentiel musculaire diminué, accompagné par des troubles de locomotion.

mVEGF

L'absence d'effet thérapeutique obtenu après injections de vecteur scAAV9-PGK-mVEGF ne semble pas liée au niveau d'expression du facteur neuroprotecteur dans les MN. En effet, la quantité de protéine mVEGF dans la moelle a été évaluée après injection ICis à environ 10 pg/mg de protéines totales avec une dose de 10¹² vg/kg, et à plus de 40 pg/mg de protéines totales avec une dose de 10¹³ vg/kg, soit environ 6 et 30 fois plus que chez les chats non injectés, respectivement. Or, de telles augmentations ont déjà été montrées capables d'induire des effets neuroprotecteurs dans le cerveau de rat ([Wang 2005b](#), [Nicoletti 2008](#)). Nos résultats suggèrent ainsi que, malgré un niveau d'expression dans la moelle suffisant obtenu par injections ICis d'AAV9, l'action neuroprotectrice du VEGF ne permet pas de protéger les MN et les axones moteurs de la dégénérescence observée chez les chats LIX1^{-/-}.

Il est d'autre part peu probable que l'âge des chats LIX1^{-/-}, de 7 semaines au moment de l'injection du vecteur scAAV9-PGK-mVEGF, soit responsable de l'absence d'efficacité du VEGF. En effet, à cet âge, nos examens neurologiques et électromyographiques ne permettent

Discussion et perspectives

de détecter aucune différence de scores entre les chats sains et les chats LIX1^{-/-}, ce qui est confirmé au niveau histologique avec un nombre équivalent d'axones moteurs ([Wakeling 2012](#)). De plus, des injections ICis de vecteur scAAV9-CMV-GFP chez des chats de 7 semaines ont abouti à une forte expression de GFP dans les MN dès 15 jours post-injection ([Duque 2009](#)), suggérant que le VEGF est bien exprimé dans les MN avant l'apparition des premiers symptômes. Par ailleurs, une coloration HES de la moelle et un marquage IBA1 susceptible de révéler l'activation des macrophages et de la microglie, n'ont montré aucun signe d'inflammation chez les chats injectés avec le vecteur scAAV9-PGK-mVEGF, suggérant que l'absence d'effet du VEGF ne peut pas être expliquée par une réaction inflammatoire menant à l'instabilité de son expression dans les MN.

Nous avons également vérifié par Western blot l'expression à la taille attendue de la protéine mVEGF₁₆₄ produite par notre vecteur scAAV9-PGK-mVEGF. D'autre part, nous avons analysé la fonctionnalité de la protéine VEGF murine chez le chat à l'aide d'un test de Miles, c'est-à-dire avec une injection IV de réactif bleu Evans puis des injections intradermiques de protéine mVEGF₁₆₄, la peau se colorant localement en bleu si le VEGF aboutit bien à une perméabilisation vasculaire. Cette perméabilisation vasculaire, comme l'effet neuroprotecteur du VEGF, est médiée par la reconnaissance du VEGF avec son récepteur VEGFR-2, tandis que VEGFR-2 est plutôt impliqué dans la croissance des astrocytes ([Greenberg 2005](#)).

L'ensemble de ces résultats suggère que la fonction neuroprotectrice du VEGF est sans effet sur le processus neurodégénératif impliqué dans la pathogénie du chat LIX1^{-/-}. Cette hypothèse est cohérente avec les observations réalisées chez la souris SMA de type III (*Smn*^{-/-}, *SMN2*^{+/-}), pour laquelle l'apport d'un autre facteur neuroprotecteur, l'IGF1, n'a pas permis d'amélioration phénotypique pour les souris traitées ([Tsai 2012](#)). En effet, des injections bilatérales de 10¹⁰ vg de vecteur AAV1-CAG_{long}-hIGF1 dans les noyaux cérébelleux profonds de souris SMA âgées de 4 mois, c'est-à-dire deux mois avant l'apparition des premiers signes de dégénérescence des MN, ont conduit à une expression d'IGF1 détectée dans le cervelet ainsi qu'à tous les niveaux de la moelle. Si cette expression d'IGF1 a mené à une réduction significative de la perte des corps cellulaires des MN dans la moelle, elle n'a en revanche pas abouti à une amélioration de la morphologie des jonctions neuromusculaires et des fibres musculaires, ce qui s'est traduit pour les souris injectées par des performances motrices comparables à celles des souris malades non traitées. Ces résultats suggèrent que le rôle

Discussion et perspectives

neuroprotecteur de l'IGF1 permet de maintenir les MN en vie mais pas d'empêcher la perte de leur fonction au niveau neuromusculaire.

Il est possible que les facteurs neuroprotecteurs tels que l'IGF1 ou le VEGF puissent, au sein de la moelle, protéger le corps cellulaire des MN par un effet anti-apoptotique comme cela a été récemment montré chez le rat, après administration ICV de 50 ng de protéine VEGF conduisant à une réduction de la mort des MN induite par excitotoxicité à l'AMPA, un agoniste du récepteur au glutamate, ([Tovar-y-Romo 2012](#)). Ces travaux indiquent que le rôle neuroprotecteur du VEGF est cliniquement pertinent pour des maladies du MN telles que l'ALS dont la pathogénie, dans un certain nombre de cas, pourrait impliquer une apoptose des MN antérieure ou contemporaine à la dénervation musculaire.

Cette hypothèse pourrait expliquer les effets bénéfiques observés chez la souris SOD1^{G93A} avec des stratégies pourtant moins efficaces que la nôtre pour exprimer un transgène à long terme dans la moelle, comme des injections intrapéritonéales de protéine VEGF seule ([Zheng 2004](#), [Zheng 2007](#)), ou des injections IM de lentivirus recombinant pour le VEGF ([Azzouz 2004](#)).

Pour ces raisons, il n'est pas exclu que notre stratégie d'administration ICis de vecteur scAAV9-PGK-mVEGF, menant à une forte expression de VEGF à long terme dans l'ensemble de la moelle, puisse réduire la mort des MN et aboutir à une efficacité clinique dans des modèles d'ALS, comme les souris ou les rats SOD1^{G93A}, ou encore le macaque surexprimant le gène TDP-43 humain ([Uchida 2012](#)).

fLIX1

Dans une deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons testé la réintroduction du gène LIX1 félin chez des chats LIX1^{-/-} nouveau-nés, dans un premier temps par voie IV à une dose de 10¹³ vg/kg (voir [Choix du mode d'injection](#) dans la partie Résultats). Ceci a abouti à la présence du vecteur scAAV9-CMV-fLIX1 dans la moelle des chatons injectés, ainsi qu'à l'expression du cDNA fLIX1 à un niveau comparable à ce qui a été mesuré pour des chats sains LIX1^{+/+}. Toutefois, ces chats injectés LIX1 en IV n'ont pas présenté d'amélioration clinique. Pour expliquer cette absence d'effet thérapeutique, nous avons supposé que le niveau d'expression de LIX1 était insuffisant, spécifiquement au sein de la population des MN. En effet, une grande partie de l'ARNm LIX1 quantifié dans la moelle par RT-qPCR

Discussion et perspectives

pourrait provenir d'une expression du vecteur dans d'autres types cellulaires, comme les astrocytes, ou encore de génomes viraux et d'ARNm piégés dans les faisceaux axonaux en provenance des tissus périphériques ou des neurones sensitifs des DRG qui sont systématiquement transduits après des injections systémiques de vecteur scAAV9.

Nous avons supposé, à partir des résultats que nous avons obtenu au cours de la première partie de l'étude concernant le transfert de gène VEGF, que la voie ICis pourrait permettre d'augmenter le niveau d'expression de LIX1 dans la moelle, en particulier dans les MN. En effet, les injections ICis de vecteur scAAV9-PGK-mVEGF à une dose de 10^{12} vg/kg ont mené chez le chat adulte à environ dix fois plus de protéine mVEGF dans la moelle que par voie IV, et la même dose de scAAV9-CMV-GFP a abouti chez le chat nouveau-né comme chez le chat adulte à une forte transduction de MN tout le long de la moelle. Devant le nombre restreint de chatons LIX1^{-/-}, les injections ICis de vecteur scAAV9-CMV-fLIX1 ont été préalablement réalisées chez deux chatons nouveau-nés sains à une dose de 10^{12} vg/kg, puis, grâce à une concentration plus importante d'un nouveau lot de vecteur, à une dose de 10^{13} vg/kg chez deux autres chatons nouveau-nés. Ces injections ICis ont abouti, par rapport aux injections IV, à une quantité de vecteur dans la moelle comparable, voire quatre fois supérieure pour un des deux chatons injectés à la dose de 10^{13} vg/kg, et à une expression du cDNA fLIX1 plus forte d'un facteur 20 dans l'ensemble de la moelle ventrale.

Pour évaluer l'impact thérapeutique de cette stratégie, deux chatons LIX1^{-/-} nouveau-nés ont récemment pu être injectés à une dose de 10^{13} vg/kg de scAAV9-CMV-fLIX1. Toutefois, il est encore trop tôt pour déterminer l'effet de ces injections sur la pathologie féline.

Si ces deux chatons LIX1^{-/-} injectés par voie ICis venaient à ne pas présenter d'amélioration clinique, nos principales hypothèses seraient :

- 1) Une variabilité liée au geste de l'injection ICis. En effet, les résultats des différentes injections ICis ont montré des hétérogénéités importantes en termes de niveau d'expression du transgène dans la moelle, en particulier suite aux injections ICis de scAAV9-CMV-fLIX1 à une dose de 10^{13} vg/kg. Si l'un des deux chatons a présenté un grand nombre de copies de vecteur dans l'ensemble de la moelle, associé à une forte expression du cDNA fLIX1 dans la moelle ventrale, le deuxième a en revanche montré des niveaux de vecteur et d'expression en moyenne plus faibles que pour les chats injectés par voie IV. Une hétérogénéité a par ailleurs également été retrouvée chez les chats injectés en ICis avec un vecteur scAAV9-CMV-GFP, un nouveau-né sur trois et un adulte sur trois montrant une proportion de MN transduits plus faible de moitié au niveau de la moelle cervicale. Une variabilité similaire a été relevée lors

Discussion et perspectives

d'une étude chez le rat adulte avec des injections en IT lombaire de vecteur scAAV1-CMV-GFP ([Storek 2006](#)). En effet, un rat sur six n'a présenté aucun MN transduit dans la moelle, ce qui est dû, pour les auteurs, à un saignement observé suite au placement du cathéter, suggérant qu'une majorité du vecteur a été administrée plutôt dans la circulation sanguine que dans l'espace subarachnoïdien. Cette hétérogénéité liée à aux injections dans le LCS est aussi connue des cliniciens ; une étude récente a montré que le rythme cardiaque et la vitesse d'injection influencent fortement la distribution dans le LCS et la moelle de la solution injectée (dire la nature de la solution) chez les patients ([Hsu 2012](#)). Afin d'éviter ce type de variations, la meilleure façon de contrôler l'injection dans le LCS serait d'utiliser un agent radioopaque pour visualiser le site d'injection et suivre les flux de LCS par radioscopie ou fluoroscopie, comme cela a été réalisé chez le porc ([Bevan 2011](#)) et le macaque ([Gray 2013](#)). Cette technique n'est cependant pas applicable aux chatons nouveau-nés qui supportent difficilement les anesthésies de longue durée. Si pour nos deux chatons LIX1^{-/-} injectés en ICis, une telle variabilité mène à une absence d'effet thérapeutique, nous devrions pouvoir le confirmer en analysant l'expression du cDNA fLIX1 dans la moelle après leur sacrifice.

2) Une mauvaise fonctionnalité du cDNA fLIX1. Il reste possible, malgré les vérifications de la cassette d'expression CMV-fLIX1 effectuées par séquençage, et les tests d'expression de la protéine LIX1-cmyc réalisés *in vitro* indiquant l'obtention d'une forme à la taille attendue de 33 kDa, que notre vecteur scAAV9-CMV-fLIX1 n'aboutisse pas *in vivo* à la production d'une protéine fonctionnelle. En effet, nous ne sommes pas parvenus à mettre au point une technique immunohistochimique pour détecter la protéine fLIX1 dans des tissus de chat et, comme le rôle de cette protéine n'est pas connu, nous ne disposons pas non plus de test permettant de vérifier la fonctionnalité du LIX1. Afin de s'affranchir d'une potentielle erreur de clonage du cDNA fLIX1 conduisant *in vivo* à l'expression d'une protéine non fonctionnelle, nous avons pensé utiliser une autre construction LIX1, le cDNA LIX1 humain commercialisé par OriGene ([NM_153234](#)), qui possède une identité avec le cDNA félin de plus de 93% (**fig25**). Nous avons produit un vecteur scAAV9-CMV-hLIX1, et nous l'avons injecté en ICis chez un chaton LIX1^{-/-} nouveau-né. Ce chaton est cependant encore trop jeune pour que nous puissions déterminer l'efficacité thérapeutique de ce vecteur.

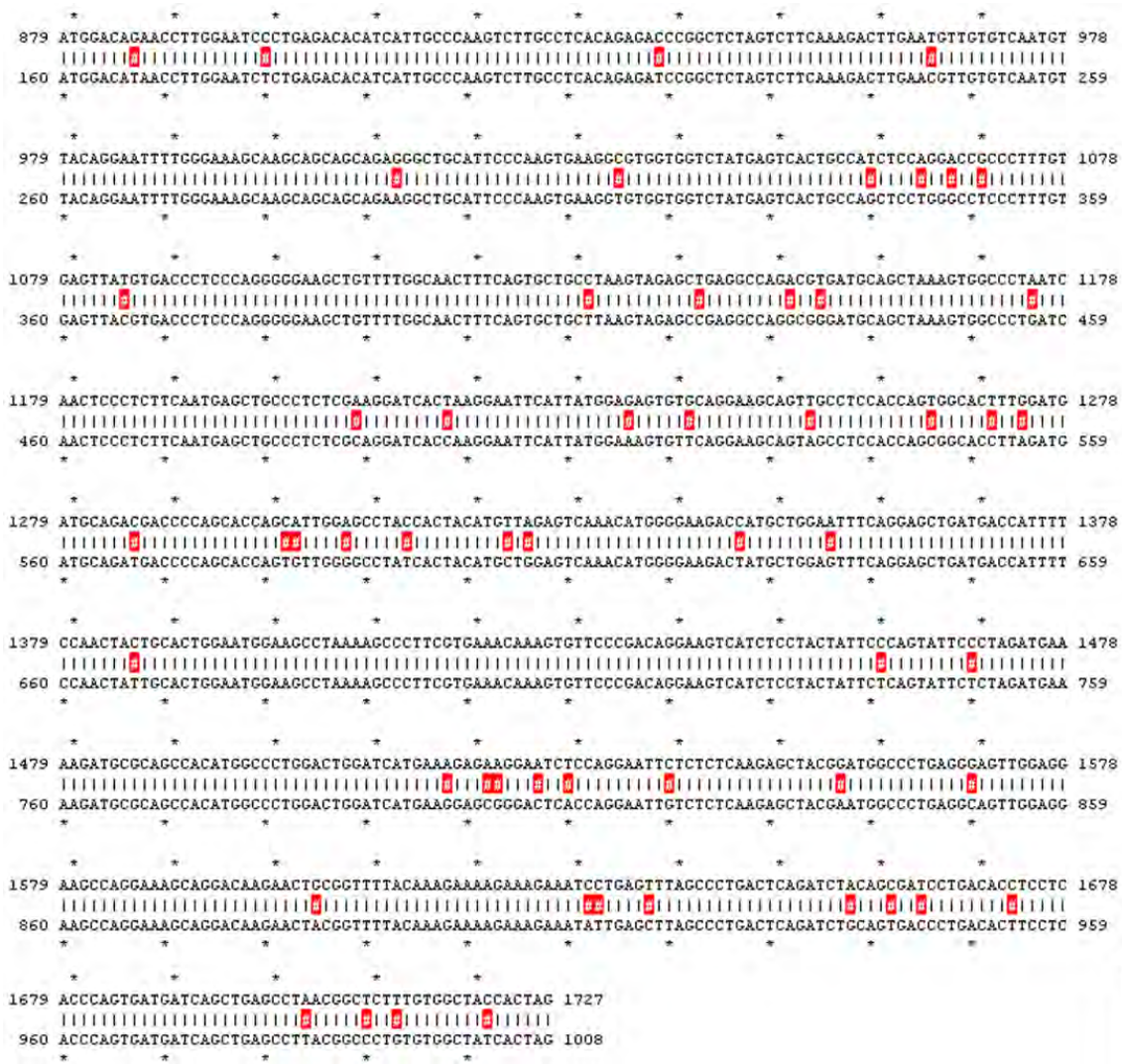


Fig.25) Alignement des séquences des cDNA LIX1 félin ([NM 001048162.1](#)) et LIX1 humain ([NM 153234.4](#)). Les deux séquences montrent 793 bases communes sur un total de 846, soit une identité de plus de 93%. Réalisé avec le logiciel ApE.

3) L'implication de régions non codantes, UTRs ou introns, dans la fonction jouée par LIX1. En effet, le cDNA fLIX1 que nous avons utilisé dans cette étude contient uniquement les 846 paires de bases codantes du gène LIX1 félin, réparties en 6 exons. Or, les séquences non codantes sont susceptibles de jouer un rôle fonctionnel important, comme suggéré par le projet ENCODE, chargé d'analyser le génome humain ([Pennisi 2012](#)). Ces séquences pourraient être indispensables pour le contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel qui semble particulièrement important pour l'expression du gène LIX1, comme le suggère la séquence 5'UTR, fortement conservée entre les espèces (95 et 88% d'identité entre la séquence féline et les séquences humaine et murine, respectivement), et présentant une

Discussion et perspectives

structure secondaire en tige-boucle, connue pour moduler la stabilité ou la traduction de nombreux ARN messagers ([Fyfe 2006](#)). De plus, la présence de quatre signaux de polyadénylation au niveau de la séquence 3'UTR du gène LIX1, retrouvés chez la plupart des mammifères, pourrait indiquer que plusieurs ARN messagers LIX1 alternatifs seraient produits, dans des tissus ou à des périodes du développement différents. Cependant, une seule forme d'ARN messenger d'environ 4 kb a été détectée dans le SNC, le rein et le cœur de jeunes chats ([Fyfe 2006](#)). Ainsi, bien que la fonction de LIX1 ne soit pas connue, il est possible que ces séquences de régulation soient nécessaires à l'expression appropriée de LIX1, c'est-à-dire dans le bon tissu et au bon moment.

Il est également probable que les régions non codantes du gène LIX1, incluant les introns, puissent porter des micro-ARN et/ou des séquences cibles de micro-ARN. Cela a en effet été proposé par une étude chez le criquet, indiquant qu'un ARN interférence dirigé contre *Lowfat*, l'homologue de LIX1 chez les insectes, abouti à une réduction du niveau protéique de deux partenaires de *Lowfat* : *Dachsous* et *Fat*, mais pas de leur niveau de transcrits ([Bando 2011](#)). De ce fait, et parallèlement au rôle hypothétique de LIX1 dans le métabolisme de l'ARN, l'absence des régions non codantes du gène LIX1 pourrait avoir un fort impact sur la régulation de ses partenaires ou de ses cibles métaboliques.

En attendant d'avoir plus d'informations sur la fonction LIX1 et sur l'implication de ces régions non codantes, il est difficile de répondre à cette hypothèse par thérapie génique. En effet, le gène fLIX1 entier a une taille d'environ 50 kb, les introns étant particulièrement longs ([fig26](#)). Ainsi, seuls les vecteurs dérivés du HSV, avec une capacité d'encapsidation allant jusqu'à 150 kb, pourraient permettre d'apporter *in vivo* le gène LIX1 entier. Toutefois, bien que ce type de vecteur ait un tropisme naturel pour le SNC, ils présentent une expression seulement transitoire, associée à de forts risques d'inflammation et de réponse humorale ([Berto 2005](#), [Manservigi 2010](#)). Encapsider les ~5 kb du cDNA fLIX1 avec ses UTR et le promoteur dans un adénovirus « *gutless* », qui possède une capacité de 8 à 30 kb et mène à une expression à plus long terme que les vecteurs dérivés du virus de l'herpès ([Kreppel 2004](#)), pourrait représenter un compromis intéressant à tester chez le chat.

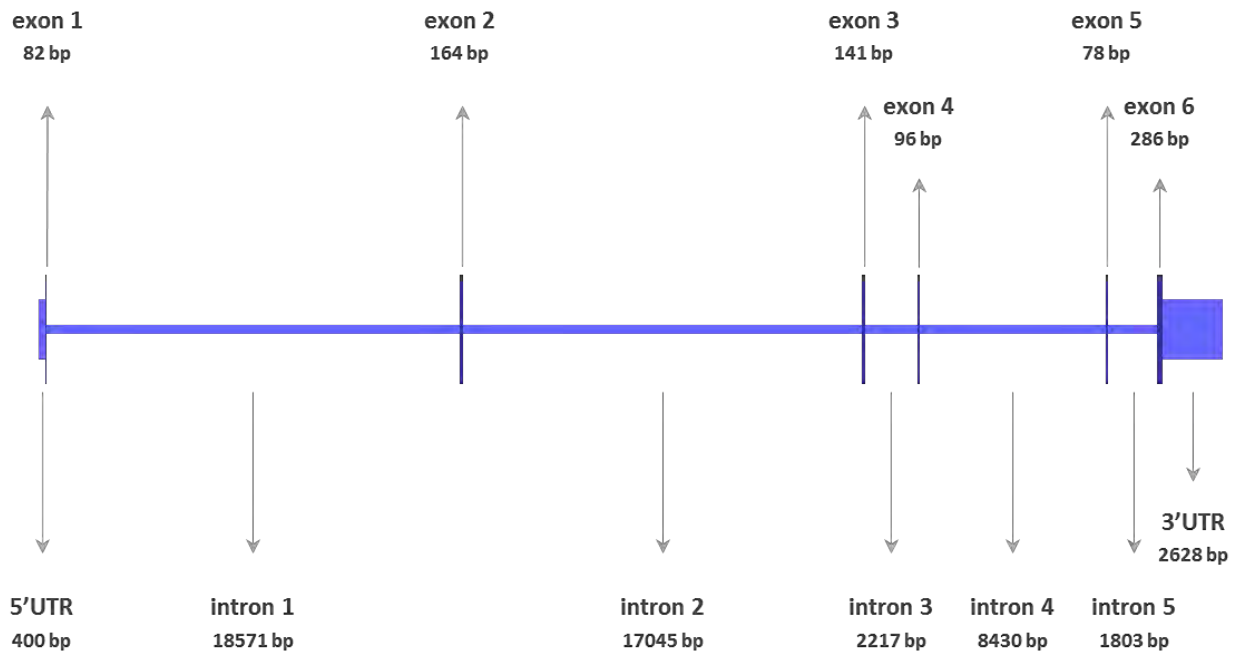


Fig.26) Schéma représentant le gène *LIX1* félin et illustrant la taille importante des introns par rapports aux régions codantes. Adapté de la fiche RefSeq [Gene ID: 751823](#).

4) Un rôle plus précoce de la protéine LIX1. Il est possible que LIX1 joue un rôle lors du développement embryonnaire ou fœtal, et que l'absence de cette fonction provoque un défaut qui n'est pas corrigeable après la naissance. Toutefois, bien que l'expression de LIX1 ait été retrouvée chez la souris en intensité croissante depuis les derniers stades de gestation jusqu'à l'âge adulte au niveau des MN de la corne ventrale de la moelle ([Moeller 2002](#)), les premiers signes de la pathologie du chat *LIX1*^{-/-} ne sont détectables qu'à partir de l'âge de 8 semaines, avec une diminution du nombre d'axones moteurs de grand calibre au niveau des racines ventrales de la moelle ([Wakeling 2012](#)).

La même problématique s'est posée dans le cadre de la SMA. En effet, les plus importantes quantités de SMN mesurées dans le SNC de souris ont été retrouvées pendant le développement embryonnaire ([Gabanella 2005](#)). Des études *in vitro* ont également indiqué une forte relation entre, d'une part le niveau de protéine SMN, et d'autre part la croissance axonale ([Fan 2001](#)), le transport axonal, notamment de β -actine ([Rossoll 2003](#)), et la différenciation des cellules neuronales ([Shafey 2008](#)). De plus, une étude récente chez un modèle de poisson zèbre possédant peu de copies SMN a montré, pendant le développement de l'embryon, des axones moteurs plus courts avec moins de branches, et des dendrites également plus courtes et moins nombreuses ([Hao 2013](#)). Ces résultats suggèrent un rôle de

Discussion et perspectives

SMN lors du développement du SNC. Cependant, une étude chez des embryons de souris SMN2 présentant une forme sévère de SMA de type I, n'a pas mis en évidence d'anomalie de formation ou de croissance des axones moteurs ([McGovern 2008](#)).

Par ailleurs, le développement des myotubes a été retrouvé anormal dans des prélèvements de fœtus humains atteints de SMA, avec une taille plus faible et une organisation plus dispersée ([Martínez-Hernández 2009](#)), indiquant que SMN a un impact sur le développement musculaire. Il pourrait ainsi être possible que des faibles niveaux de SMN lors du développement neuromusculaire induisent une vulnérabilité de l'unité motrice prédisposant à la neurodégénérescence ([Murray 2010](#)). Une telle vulnérabilité de l'unité motrice pourrait également être mise en place précocement chez le chat LIX1^{-/-}, puisqu'une expression du gène LIX1 a été relevée de façon transitoire dans les bourgeons des membres lors du développement embryonnaire du poulet ([Swindell 2001](#)). Des études ont de plus montré que *Lowfat*, l'orthologue de LIX1 chez les insectes, jouait un rôle dans le développement et la régénération des membres de drosophile et de criquet ([Mao 2009](#), [Bando 2011](#)). Ainsi, même si l'absence du gène LIX1 ne conduit pas aux mêmes conséquences que le manque de SMN au cours du développement embryonnaire ([Schrank 1997](#)), il est probable que la mise en place et la maturation du système neuromusculaire chez le chat LIX1^{-/-} soient imparfaites.

Pour répondre à cette hypothèse, il pourrait être nécessaire de tester des injections prénatales, c'est-à-dire *in utero*. Cela a été réalisé récemment chez le mouton, avec des injections intrapéritonéales d'AAV8 recombinant pour le facteur IX chez des femelles gestantes, aboutissant à une forte expression de FIX dans la circulation sanguine fœtale tout le long de la gestation ([David 2011](#)). Il peut également être possible de réaliser des injections intravitellines, comme cela a été fait chez la souris, avec 2.10¹¹ vg d'AAV9, menant à la transduction de plus de 90% des neurones dans le cerveau ([Rahim 2011](#)).

Perspectives

S'il est probable que l'absence chez le chat LIX1^{-/-} d'effet thérapeutique suite à des injections ICis d'AAV9 recombinant pour le VEGF soit due à l'inefficacité de ce facteur neuroprotecteur pour éviter la dégénérescence axonale, les raisons pour lesquelles l'apport du cDNA fLIX1 n'a pas mené à un bénéfice clinique sont moins évidentes, principalement du fait que la fonction de LIX1 n'est pas encore connue. Par conséquent, il serait nécessaire pour continuer cette étude sur le modèle félin de maladie du MN, de mieux comprendre le rôle joué

Discussion et perspectives

par la protéine LIX1 chez le chat, en identifiant en particulier sa localisation intracellulaire et ses partenaires.

Concernant la détermination de sa localisation intracellulaire au sein des neurones de la moelle, une technique d'immunofluorescence et/ou une technique d'hybridation avec une sonde fluorescente complémentaire de l'ARN LIX1 pourraient permettre de détecter l'expression de la protéine LIX1 *in situ*. Ces techniques, appliquées à plusieurs types de tissus de chatons de différents âges, devraient pouvoir déterminer plus précisément dans quelles cellules et à quel moment du développement du SNC la protéine LIX1 est exprimée.

La détection de l'expression pourrait également être intéressante *in vitro* dans des cellules peu différenciées pour analyser l'effet de LIX1 sur la croissance cellulaire, comme ce qui a été réalisé avec SMN ([Fan 2001](#), [Rossoll 2003](#), [Shafey 2008](#)). Ainsi, une fois connue, la localisation intracellulaire de LIX1 pourra nous éclairer sur le ou les rôles de LIX1, notamment au niveau des axones et des jonctions neuromusculaires.

L'identification des facteurs interagissant avec LIX1 s'avèrerait essentielle pour comprendre la fonction de la protéine LIX1. En effet, dans le cas de SMN, la découverte de ses partenaires, les protéines Sm, Gemin et Unrip au sein du complexe SMN, a permis de déterminer le rôle de SMN dans l'assemblage et le recyclage de complexes d'épissage (pour revues : [Burghes 2009](#), [Workman 2012](#)). Pour LIX1, la prédiction d'un domaine de liaison à l'ARN double brin en N-terminal ([Fyfe 2006](#)), retrouvé en particulier sur TDP-43 et sur des partenaires de SMN et FUS ([Saunders 2003](#)), et du côté C-terminal d'une structure surenroulée de type *coil-coiled* ([Swindell 2001](#)), suggère que LIX1 ne remplit pas sa fonction de façon isolée. À l'heure actuelle, des analyses de co-immunoprécipitation ont indiqué une liaison de LIX1 et de *Lowfat*, avec *Dachsous*, *Fat* et son orthologue humain FAT4 dans des cellules S2 d'insecte ([Mao 2009](#)). Ceci a été confirmé à l'aide d'une colocalisation de LIX1 et de *Dachsous*1, l'orthologue de *Dachsous* chez les mammifères, dans des cellules 293, Cos7 (fibroblastes de macaque) et NSC34 par nos collaborateurs John Fyfe et Erin Wakeling (données non publiées). Ces données suggèrent un lien entre LIX1 et la voie de signalisation régulant la polarité cellulaire plane (PCP) dans laquelle sont impliqués *Dachsous* et *Fat*, essentielle notamment pour les épithéliums. Toutefois, aucun défaut de PCP n'a jusque-là été observé chez le chat LIX1^{-/-}.

D'autre part, s'il s'avère que, comme SMN, LIX1 est impliqué dans le métabolisme des ARN, il serait pertinent d'identifier les ARN affectés par l'absence de LIX1. Pour cela, il

Discussion et perspectives

faudrait rechercher les ARN dont le niveau est modifié dans les tissus de chat LIX1^{-/-} par rapport à des tissus de chat sain, en réalisant un criblage à haut débit à l'aide d'une puce à ARN ou par des techniques plus récentes basées sur la qPCR ([Albulescu 2012](#)). Il pourrait ensuite être intéressant d'analyser les candidats dérégulés par hybridation *in situ* sur coupes de tissus ou *in vitro* afin de déterminer si leur localisation est anormale, ce qui serait susceptible de créer un nouveau lien avec SMN dont une fonction de transport axonal a été suggéré ([Rossoll 2009](#), [Fallini 2012a](#)).

Enfin, un dernier point à explorer serait l'obtention d'une pathologie liée à l'absence de LIX1 dans un autre modèle animal. En effet, cela permettrait d'analyser la fonction de LIX1 dans un autre contexte que le chat, notamment dans des modèles murins qui peuvent être obtenus relativement rapidement. À l'aide d'une technique de *gene trapping*, qui consiste à introduire des mutations insertionnelles dans un intron, un KO LIX1 murin a été réalisé par nos collaborateurs John Fyfe et Erin Wakeling ([Wakeling 2011](#)). Si le KO a bien abouti à une absence complète d'expression de LIX1 dans la moelle des souris, celles-ci n'ont en revanche présenté aucune atteinte clinique ou histologique, et leur survie n'a pas été affectée. Cela est probablement dû au fait que les souris produisent naturellement et de façon spécifique aux rongeurs, un transcript LIX1 alternatif contenant une partie de l'intron 4 et les exons 5 et 6 du gène LIX1, qui compenserait la perte de LIX1 en protégeant les MN de la dégénérescence observée chez le chat LIX1^{-/-}. La même technique de *gene trapping* a également été utilisée par des sous-traitants du consortium international pour les KO chez la souris (<http://www.knockoutmouse.org>), pour réaliser des KO LIX1 murins. Si l'obtention de souris LIX1^{-/-} est en cours (<http://www.knockoutmouse.org/genedetails/MGI:1913893>), un KO a déjà été décrit pour le gène LIX1-like ou LIX1L, un paralogue de LIX1 défini par son identité de séquence avec LIX1, et retrouvé également chez tous les mammifères. Les résultats publiés sur leur [site](#) concernant les souris LIX1L^{-/-} semblent indiquer qu'elles présentent un niveau de potassium circulant diminué et une hypercalcémie, et développent des œdèmes fatals. Davantage d'informations seraient néanmoins nécessaires pour extrapoler sur le rôle de LIX1L. Par ailleurs, ce consortium propose des cellules souches embryonnaires issues de ces animaux, incluant des cellules pouvant exprimer LIX1 de façon conditionnelle, ce qui pourrait être particulièrement intéressant pour l'étude de l'expression de LIX1 décrite plus haut.

Conclusion générale

Notre étude a démontré la pertinence d'injections intracisternales de vecteur AAV9 pour apporter un transgène dans l'ensemble de la moelle d'un modèle gros animal, le chat LIX1^{-/-}, un des seuls modèles gros animal de maladie du motoneurone actuellement disponible pour des essais précliniques de thérapie génique. L'efficacité et l'innocuité de cette stratégie, démontrées chez le chat LIX1, ouvrent la voie à une application préclinique dans des modèles murins d'amyotrophie spinale avec un vecteur scAAV9-SMN, avant une application clinique potentielle à l'homme. Cette stratégie pourrait être, par ailleurs, utilisée pour tester l'impact clinique de facteurs neuroprotecteurs tels que le VEGF dans le cadre d'autres maladies du motoneurone, comme l'ALS.

D'autre part, une meilleure compréhension du rôle de la protéine LIX1 dans la pathologie neurodégénérative féline pourrait mener à l'identification de mécanismes pathogéniques menant à la perte des axones moteurs, à la dénervation musculaire et finalement à la disparition des corps cellulaires des neurones moteurs, et ainsi permettre de mieux connaître les processus physio-pathogéniques impliqués dans les maladies du MNs.

IV Bibliographie

«La littérature est à la civilisation ce que la queue est à la casserole : quand il n'y en a pas,
l'homme a l'air con. »
Pierre Desproges

A

- Agerholm, J S, et A Basse. « Spinal Muscular Atrophy in Calves of the Red Danish Dairy Breed ». *The Veterinary Record* 134, n° 10 (5 mars 1994): 232-235.
- Ainsworth, Matt, Shane Lee, Mark O. Cunningham, Roger D. Traub, Nancy J. Kopell, et Miles A. Whittington. « Rates and Rhythms: A Synergistic View of Frequency and Temporal Coding in Neuronal Networks ». *Neuron* 75, n° 4 (23 août 2012): 572-583.
doi:10.1016/j.neuron.2012.08.004.
- Akten, Bikem, Min Jeong Kye, Le T Hao, Mary H Wertz, Sasha Singh, Duyu Nie, Jia Huang, et al. « Interaction of Survival of Motor Neuron (SMN) and HuD Proteins with mRNA Cpg15 Rescues Motor Neuron Axonal Deficits ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n° 25 (21 juin 2011): 10337-10342.
doi:10.1073/pnas.1104928108.
- Al-Saif, Amr, Saeed Bohlega, et Futwan Al-Mohanna. « Loss of ERLIN2 Function Leads to Juvenile Primary Lateral Sclerosis ». *Annals of Neurology* 72, n° 4 (2012): 510–516.
doi:10.1002/ana.23641.
- Albulescu, Laura-Oana, Nevin Sabet, Mohanram Gudipati, Nicholas Stepankiw, Zane J Bergman, Tim C Huffaker, et Jeffrey A Pleiss. « A Quantitative, High-throughput Reverse Genetic Screen Reveals Novel Connections Between Pre-mRNA Splicing and 5' and 3' End Transcript Determinants ». *PLoS Genetics* 8, n° 3 (2012): e1002530.
doi:10.1371/journal.pgen.1002530.
- Allay, James A., Susan Sleep, Scott Long, David M. Tillman, Rob Clark, Gael Carney, Paolo Fagone, et al. « Good Manufacturing Practice Production of Self-Complementary Serotype 8 Adeno-Associated Viral Vector for a Hemophilia B Clinical Trial ». *Human Gene Therapy* 22, n° 5 (mai 2011): 595-604. doi:10.1089/hum.2010.202.
- Anderson, P D, K H Parton, M G Collett, N D Sargison, et R D Jolly. « A Lower Motor Neuron Disease in Newborn Romney Lambs ». *New Zealand Veterinary Journal* 47, n° 3 (juin 1999): 112-114. doi:10.1080/00480169.1999.36125.
- Armstrong, Richard A., Peter L. Lantos, et Nigel J. Cairns. « Overlap Between Neurodegenerative Disorders ». *Neuropathology* 25, n° 2 (2005): 111–124. doi:10.1111/j.1440-1789.2005.00605.x.
- Arts, Ilse M.P., Sebastiaan Overeem, Sigrid Pillen, Bert U. Kleine, Werner A. Boeckstein, Machiel J. Zwarts, et H. Jurgen Schelhaas. « Muscle ultrasonography: A diagnostic tool for

- amyotrophic lateral sclerosis ». *Clinical Neurophysiology* 123, n° 8 (août 2012): 1662-1667. doi:10.1016/j.clinph.2011.11.262.
- Ashton, Randolph S., Anthony Conway, Chinmay Pangarkar, Jamie Bergen, Kwang-Il Lim, Priya Shah, Mina Bissell, et David V. Schaffer. « Astrocytes Regulate Adult Hippocampal Neurogenesis through ephrin-B Signaling ». *Nature Neuroscience* 15, n° 10 (2012): 1399-1406. doi:10.1038/nn.3212.
- Asokan, Aravind, Julia C Conway, Jana L Phillips, Chengwen Li, Julia Hegge, Rebecca Sinnott, Swati Yadav, et al. « Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle ». *Nature biotechnology* 28, n° 1 (janvier 2010): 79-82. doi:10.1038/nbt.1599.
- Asokan, Aravind, David V Schaffer, et R Jude Samulski. « The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads ». *Molecular Therapy* 20, n° 4 (avril 2012): 699-708. doi:10.1038/mt.2011.287.
- Auvinet, Bernard, Richard Bileckot, Anne-Sophie Alix, Denis Chaleil, et Eric Barrey. « Gait Disorders in Patients with Fibromyalgia ». *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme* 73, n° 5 (octobre 2006): 543-546. doi:10.1016/j.jbspin.2005.10.020.
- Awano, Tomoyuki, Gary S Johnson, Claire M Wade, Martin L Katz, Gayle C Johnson, Jeremy F Taylor, Michele Perloski, et al. « Genome-wide Association Analysis Reveals a SOD1 Mutation in Canine Degenerative Myelopathy That Resembles Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, n° 8 (24 février 2009): 2794-2799. doi:10.1073/pnas.0812297106.
- Ayala, Youhna M, Laura De Conti, S Eréndira Avendaño-Vázquez, Ashish Dhir, Maurizio Romano, Andrea D'Ambrogio, James Tollervy, et al. « TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop ». *The EMBO Journal* 30, n° 2 (3 décembre 2010): 277-288. doi:10.1038/emboj.2010.310.
- Ayuso, Eduard, Federico Mingozzi, et Fatima Bosch. « Production, Purification and Characterization of Adeno-Associated Vectors ». *Current Gene Therapy* 10, n° 6 (2010): 423-436. doi:10.2174/156652310793797685.
- Azzouz, Mimoun, G. Scott Ralph, Erik Storkebaum, Lucy E. Walmsley, Kyriacos A. Mitrophanous, Susan M. Kingsman, Peter Carmeliet, et Nicholas D. Mazarakis. « VEGF Delivery with Retrogradely Transported Lentivector Prolongs Survival in a Mouse ALS Model ». *Nature* 429, n° 6990 (27 mai 2004): 413-417. doi:10.1038/nature02544.

B

- Bach, John R., Katherine Saltstein, Diane Siquee, Brian Weaver, et Eugene Komaroff. « Long-Term Survival in Werdnig-Hoffmann Disease ». *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 86, n° 5 (mai 2007): 339-345. doi:10.1097/PHM.0b013e31804a8505.
- Baek, Rena C, Marike L D Broekman, Stanley G Leroy, Laryssa A Tierney, Michael A Sandberg, Alessandra d' Azzo, Thomas N Seyfried, et Miguel Sena-Esteves. « AAV-mediated Gene Delivery in Adult GM1-gangliosidosis Mice Corrects Lysosomal Storage in CNS and Improves Survival ». *PloS One* 5, n° 10 (2010): e13468. doi:10.1371/journal.pone.0013468.
- Balice-Gordon, R J, D B Smith, J Goldman, L C Cork, A Shirley, T C Cope, et M J Pinter. « Functional Motor Unit Failure Precedes Neuromuscular Degeneration in Canine Motor Neuron Disease ». *Annals of Neurology* 47, n° 5 (mai 2000): 596-605.
- Banack, Sandra A., Tracie A. Caller, et Elijah W. Stommel. « The Cyanobacteria Derived Toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Toxins* 2, n° 12 (20 décembre 2010): 2837-2850. doi:10.3390/toxins2122837.
- Bando, Tetsuya, Yoshimasa Hamada, Kazuki Kurita, Taro Nakamura, Taro Mito, Hideyo Ohuchi, et Sumihare Noji. « Lowfat, a Mammalian Lix1 Homologue, Regulates Leg Size and Growth Under the Dachous/Fat Signaling Pathway During Tissue Regeneration ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240, n° 6 (juin 2011): 1440-1453. doi:10.1002/dvdy.22647.
- Banno, Haruhiko, Masahisa Katsuno, Keisuke Suzuki, Fumiaki Tanaka, et Gen Sobue. « Pathogenesis and Molecular Targeted Therapy of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA) ». *Cell and Tissue Research* 349, n° 1 (juillet 2012): 313-320. doi:10.1007/s00441-012-1377-9.
- Bantel-Schaal, Ursula, Ilona Braspenning-Wesch, et Juergen Kartenbeck. « Adeno-associated Virus Type 5 Exploits Two Different Entry Pathways in Human Embryo Fibroblasts ». *Journal of General Virology* 90, n° 2 (2 janvier 2009): 317-322. doi:10.1099/vir.0.005595-0.
- Bartel, David P. « MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function ». *Cell* 116, n° 2 (23 janvier 2004): 281-297.
- Barthélémy, Inès, Eric Barrey, Pablo Aguilar, Ane Uriarte, Matthias Le Chevoir, Jean-Laurent Thibaud, Thomas Voit, Stéphane Blot, et Jean-Yves Hogrel. « Longitudinal Ambulatory Measurements of Gait Abnormality in Dystrophin-deficient Dogs ». *BMC Musculoskeletal Disorders* 12 (2011): 75. doi:10.1186/1471-2474-12-75.

- Barthélémy, Inès, Ane Uriarte, Carole Drougard, Yves Unterfinger, Jean-Laurent Thibaud, et Stéphane Blot. « Effects of an Immunosuppressive Treatment in the GRMD Dog Model of Duchenne Muscular Dystrophy ». *PloS One* 7, n° 11 (2012): e48478.
doi:10.1371/journal.pone.0048478.
- Bartlett, Jeffrey S., Rose Wilcher, et R. Jude Samulski. « Infectious Entry Pathway of Adeno-Associated Virus and Adeno-Associated Virus Vectors ». *Journal of Virology* 74, n° 6 (mars 2000): 2777-2785.
- Beck, K, et B Brodsky. « Supercoiled Protein Motifs: The Collagen Triple-helix and the Alpha-helical Coiled Coil ». *Journal of Structural Biology* 122, n° 1-2 (1998): 17-29.
doi:10.1006/jsbi.1998.3965.
- Beckett, Travis, Laura Bonneau, James Blanchard, Juan Toribio Borda, Daniel J Weiner, Lili Wang, Guangping Gao, et al. « Inhalation of Nebulized Perfluorochemical Enhances Recombinant Adenovirus and AAV-Mediated Gene Expression in Lung Epithelium ». *Human gene therapy methods* (29 juin 2012).
- Bell, Christie L, Brittney L Gurda, Kim Van Vliet, Mavis Agbandje-McKenna, et James M Wilson. « Identification of the Galactose Binding Domain of the Adeno-associated Virus Serotype 9 Capsid ». *Journal of Virology* 86, n° 13 (juillet 2012): 7326-7333.
doi:10.1128/JVI.00448-12.
- Benkhelifa-Ziyyat, Sofia, Aurore Besse, Marianne Roda, Sandra Duque, Stéphanie Astord, Romain Carcenac, Thibaut Marais, et Martine Barkats. « Intramuscular scAAV9-SMN Injection Mediates Widespread Gene Delivery to the Spinal Cord and Decreases Disease Severity in SMA Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21, n° 2 (février 2013): 282-290. doi:10.1038/mt.2012.261.
- Berg, Rune W., Aidas Alaburda, et Jørn Hounsgaard. « Balanced Inhibition and Excitation Drive Spike Activity in Spinal Half-Centers ». *Science* 315, n° 5810 (19 janvier 2007): 390-393.
doi:10.1126/science.1134960.
- Berto, E, A Bozac, et P Marconi. « Development and Application of Replication-incompetent HSV-1-based Vectors ». *Gene Therapy* 12 Suppl 1 (octobre 2005): S98-102.
doi:10.1038/sj.gt.3302623.
- Bessis, N., F. J. GarciaCozar, et M.-C. Boissier. « Immune Responses to Gene Therapy Vectors: Influence on Vector Function and Effector Mechanisms ». *Gene Therapy* 11 (2004): S10-S17.
doi:10.1038/sj.gt.3302364.
- Bevan, Adam K, Sandra Duque, Kevin D Foust, Pablo R Morales, Lyndsey Braun, Leah Schmelzer, Curtis M Chan, et al. « Systemic Gene Delivery in Large Species for Targeting

- Spinal Cord, Brain, and Peripheral Tissues for Pediatric Disorders ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19, n° 11 (novembre 2011): 1971-1980. doi:10.1038/mt.2011.157.
- Bevan, Adam K, Kirk R Hutchinson, Kevin D Foust, Lyndsey Braun, Vicki L McGovern, Leah Schmelzer, Jennifer G Ward, et al. « Early Heart Failure in the SMNDelta7 Model of Spinal Muscular Atrophy and Correction by Postnatal scAAV9-SMN Delivery ». *Human Molecular Genetics* 19, n° 20 (15 octobre 2010): 3895-3905. doi:10.1093/hmg/ddq300.
- Bishop, Kathie M, Eva K Hofer, Arpesh Mehta, Anthony Ramirez, Liangwu Sun, Mark Tuszynski, et Raymond T Bartus. « Therapeutic Potential of CERE-110 (AAV2-NGF): Targeted, Stable, and Sustained NGF Delivery and Trophic Activity on Rodent Basal Forebrain Cholinergic Neurons ». *Experimental Neurology* 211, n° 2 (juin 2008): 574-584. doi:10.1016/j.expneurol.2008.03.004.
- Blazej, R G, C S Mellersh, L C Cork, et E A Ostrander. « Hereditary Canine Spinal Muscular Atrophy Is Phenotypically Similar but Molecularly Distinct from Human Spinal Muscular Atrophy ». *The Journal of Heredity* 89, n° 6 (décembre 1998): 531-537.
- Blits, B, M Oudega, G.J Boer, M Bartlett Bunge, et J Verhaagen. « Adeno-associated viral vector-mediated neurotrophin gene transfer in the injured adult rat spinal cord improves hind-limb function ». *Neuroscience* 118, n° 1 (25 avril 2003): 271-281. doi:10.1016/S0306-4522(02)00970-3.
- Blits, Bas, Sanne Derks, Jaap Twisk, Erich Ehlert, Jolanda Prins, et Joost Verhaagen. « Adeno-associated Viral Vector (AAV)-mediated Gene Transfer in the Red Nucleus of the Adult Rat Brain: Comparative Analysis of the Transduction Properties of Seven AAV Serotypes and Lentiviral Vectors ». *Journal of Neuroscience Methods* 185, n° 2 (15 janvier 2010): 257-263. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.10.009.
- Blitterswijk, Marka van, Michael A. van Es, Eric A. M. Hennekam, Dennis Dooijes, Wouter van Rheenen, Jelena Medic, Pierre R. Bourque, et al. « Evidence for an Oligogenic Basis of Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Human Molecular Genetics* 21, n° 17 (9 janvier 2012): 3776-3784. doi:10.1093/hmg/dds199.
- Bockstael, Olivier, Kevin D Foust, Brian Kaspar, et Liliane Tenenbaum. « Recombinant AAV Delivery to the Central Nervous System ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 807 (2011): 159-177. doi:10.1007/978-1-61779-370-7_7.
- Boisgerault, Florence, David-Alexandre Gross, Maxime Ferrand, Jérôme Poupiot, Sylvie Darocha, Isabelle Richard, et Anne Galy. « Prolonged Gene Expression in Muscle Is Achieved Without

- Active Immune Tolerance Using MicrorRNA 142.3p-Regulated rAAV Gene Transfer ». *Human Gene Therapy* 24, n° 4 (avril 2013): 393-405. doi:10.1089/hum.2012.208.
- Bosch, A, E Perret, N Desmaris, et J M Heard. « Long-term and Significant Correction of Brain Lesions in Adult Mucopolysaccharidosis Type VII Mice Using Recombinant AAV Vectors ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 1, n° 1 (janvier 2000): 63-70. doi:10.1006/mthe.1999.0005.
- Boutin, Sylvie, Virginie Monteilhet, Philippe Veron, Christian Leborgne, Olivier Benveniste, Marie Françoise Montus, et Carole Masurier. « Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors ». *Human Gene Therapy* 21, n° 6 (juin 2010): 704-712. doi:10.1089/hum.2009.182.
- Bowerman, Mélissa, Carrie L. Anderson, Ariane Beauvais, Pietro Pilo Boyl, Walter Witke, et Rashmi Kothary. « SMN, profilin IIa and plastin 3: A link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 42, n° 1 (août 2009): 66-74. doi:10.1016/j.mcn.2009.05.009.
- Bowerman, Mélissa, Lyndsay M. Murray, Ariane Beauvais, Bruno Pinheiro, et Rashmi Kothary. « A critical smn threshold in mice dictates onset of an intermediate spinal muscular atrophy phenotype associated with a distinct neuromuscular junction pathology ». *Neuromuscular Disorders* 22, n° 3 (mars 2012): 263-276. doi:10.1016/j.nmd.2011.09.007.
- Bowles, Dawn E, Scott W J McPhee, Chengwen Li, Steven J Gray, Jade J Samulski, Angelique S Camp, Juan Li, et al. « Phase 1 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Using a Translational Optimized AAV Vector ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20, n° 2 (février 2012): 443-455. doi:10.1038/mt.2011.237.
- Brady, Owen A, Peter Meng, Yanqiu Zheng, Yuxin Mao, et Fenghua Hu. « Regulation of TDP-43 Aggregation by Phosphorylation and p62/SQSTM1 ». *Journal of Neurochemistry* 116, n° 2 (janvier 2011): 248-259. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07098.x.
- Briese, Michael, Behrooz Esmaeili, Sandrine Fraboulet, Emma C. Burt, Stefanos Christodoulou, Paula R. Towers, Kay E. Davies, et David B. Sattelle. « Deletion of smn-1, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan ». *Human Molecular Genetics* 18, n° 1 (1 janvier 2009): 97-104. doi:10.1093/hmg/ddn320.
- Brown, Brian D, Mary Anna Venneri, Anna Zingale, Lucia Sergi Sergi, et Luigi Naldini. « Endogenous microRNA Regulation Suppresses Transgene Expression in Hematopoietic

- Lineages and Enables Stable Gene Transfer ». *Nature Medicine* 12, n° 5 (mai 2006): 585-591.
doi:10.1038/nm1398.
- Bruijn, Lucie I., Megan K. Houseweart, Shinsuke Kato, Karen L. Anderson, Scott D. Anderson, Eisaku Ohama, Andrew G. Reaume, Rick W. Scott, et Don W. Cleveland. « Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1 ». *Science* 281, n° 5384 (18 septembre 1998): 1851-1854.
doi:10.1126/science.281.5384.1851.
- Bruijn, Lucie I., Timothy M. Miller, et Don W. Cleveland. « Unraveling the Mechanisms Involved in Motor Neuron Degeneration in Als ». *Annual Review of Neuroscience* 27, n° 1 (2004): 723-749. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144244.
- Brzustowicz, L M, T Lehner, L H Castilla, G K Penchaszadeh, K C Wilhelmsen, R Daniels, K E Davies, M Leppert, F Ziter, et D Wood. « Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3 ». *Nature* 344, n° 6266 (5 avril 1990): 540-541.
doi:10.1038/344540a0.
- Bu, Jie, Karen M Ashe, John Bringas, John Marshall, James C Dodge, Mario A Cabrera-Salazar, John Forsayeth, et al. « Merits of Combination Cortical, Subcortical, and Cerebellar Injections for the Treatment of Niemann-Pick Disease Type A ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20, n° 10 (octobre 2012): 1893-1901.
doi:10.1038/mt.2012.118.
- Bühler, Dirk, Veronica Raker, Reinhard Lührmann, et Utz Fischer. « Essential Role for the Tudor Domain of SMN in Spliceosomal U snRNP Assembly: Implications for Spinal Muscular Atrophy ». *Human Molecular Genetics* 8, n° 13 (12 janvier 1999): 2351-2357.
doi:10.1093/hmg/8.13.2351.
- Buj-Bello, A., F. Fougereuse, Y. Schwab, N. Messaddeq, D. Spehner, C. R. Pierson, M. Durand, et al. « AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis ». *Human Molecular Genetics* 17, n° 14 (15 avril 2008): 2132-2143.
doi:10.1093/hmg/ddn112.
- Burghes, Arthur H M, et Christine E Beattie. « Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? » *Nature Reviews. Neuroscience* 10, n° 8 (août 2009): 597-609. doi:10.1038/nrn2670.
- Bürglen, Lydie, Suzie Lefebvre, Olivier Clermont, Philippe Burlet, Louis Viollet, Corinne Cruaud, Arnold Munnich, et Judith Melki. « Structure and Organization of the Human Survival Motor

Neurone (SMN) Gene ». *Genomics* 32, n° 3 (15 mars 1996): 479-482.

doi:10.1006/geno.1996.0147.

Burman, Kathleen J, Susan M Palmer, Michela Gamberini, Matthew W Spitzer, et Marcello G P

Rosa. « Anatomical and Physiological Definition of the Motor Cortex of the Marmoset

Monkey ». *The Journal of Comparative Neurology* 506, n° 5 (10 février 2008): 860-876.

doi:10.1002/cne.21580.

C

Cai, Jingjing, Yuan Hong, Chunyan Weng, Chen Tan, Julianne Imperato-McGinley, et Yuan-Shan

Zhu. « Androgen Stimulates Endothelial Cell Proliferation via an Androgen

receptor/VEGF/cyclin A-mediated Mechanism ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 300, n° 4 (avril 2011): H1210-1221.

doi:10.1152/ajpheart.01210.2010.

Carrasco, Dario I, Mark M Rich, Qingbo Wang, Timothy C Cope, et Martin J Pinter. « Activity-

driven Synaptic and Axonal Degeneration in Canine Motor Neuron Disease ». *Journal of*

Neurophysiology 92, n° 2 (août 2004): 1175-1181. doi:10.1152/jn.00157.2004.

Carrel, Tessa L., Michelle L. McWhorter, Eileen Workman, Honglai Zhang, Elizabeth C.

Wolstencroft, Christian Lorson, Gary J. Bassell, Arthur H. M. Burghes, et Christine E.

Beattie. « Survival Motor Neuron Function in Motor Axons Is Independent of Functions

Required for Small Nuclear Ribonucleoprotein Biogenesis ». *The Journal of Neuroscience* 26, n° 43 (25 octobre 2006): 11014-11022. doi:10.1523/JNEUROSCI.1637-06.2006.

Cartegni, Luca, Michelle L. Hastings, John A. Calarco, Elisa de Stanchina, et Adrian R. Krainer.

« Determinants of Exon 7 Splicing in the Spinal Muscular Atrophy Genes, SMN1 and

SMN2 ». *The American Journal of Human Genetics* 78, n° 1 (janvier 2006): 63-77.

doi:10.1086/498853.

Carvalho, Teresa, Fátima Almeida, Alexandre Calapez, Miguel Lafarga, Maria T. Berciano, et

Maria Carmo-Fonseca. « The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, Smn: A Link

Between Snrnp Biogenesis and the Cajal (Coiled) Body ». *The Journal of Cell Biology* 147,

n° 4 (15 novembre 1999): 715.

Cary, Gregory A, et Albert R La Spada. « Androgen Receptor Function in Motor Neuron Survival

and Degeneration ». *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 19, n° 3

(août 2008): 479-494, viii. doi:10.1016/j.pmr.2008.03.002.

Cearley, Cassia N, et John H Wolfe. « Transduction Characteristics of Adeno-associated Virus

Vectors Expressing Cap Serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the Mouse Brain ». *Molecular*

- Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13, n° 3 (mars 2006): 528-537. doi:10.1016/j.ymthe.2005.11.015.
- Cecchelli, Romeo, Vincent Berezowski, Stefan Lundquist, Maxime Culot, Mila Renftel, Marie-Pierre Dehouck, et Laurence Fenart. « Modelling of the Blood-brain Barrier in Drug Discovery and Development ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 6, n° 8 (août 2007): 650-661. doi:10.1038/nrd2368.
- Chadeuf, Gilliane, Carine Ciron, Philippe Moullier, et Anna Salvetti. « Evidence for Encapsulation of Prokaryotic Sequences During Recombinant Adeno-Associated Virus Production and Their in Vivo Persistence after Vector Delivery ». *Molecular Therapy* 12, n° 4 (2005): 744-753. doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.003.
- Chahin, N., C. Klein, J. Mandrekar, et E. Sorenson. « Natural history of spinal-bulbar muscular atrophy ». *Neurology* 70, n° 21 (20 mai 2008): 1967-1971. doi:10.1212/01.wnl.0000312510.49768.eb.
- Chamberlin, N L, B Du, S de Lacalle, et C B Saper. « Recombinant Adeno-associated Virus Vector: Use for Transgene Expression and Anterograde Tract Tracing in the CNS ». *Brain Research* 793, n° 1-2 (18 mai 1998): 169-175.
- Chan, Yick Bun, Irene Miguel-Aliaga, Chris Franks, Natasha Thomas, Barbara Trülsch, David B. Sattelle, Kay E. Davies, et Marcel van den Heuvel. « Neuromuscular Defects in a Drosophila Survival Motor Neuron Gene Mutant ». *Human Molecular Genetics* 12, n° 12 (15 juin 2003): 1367-1376. doi:10.1093/hmg/ddg157.
- Chancellor, Michael B, Clare J Fowler, Apostolos Apostolidis, William C de Groat, Christopher P Smith, George T Somogyi, et K Roger Aoki. « Drug Insight: Biological Effects of Botulinum Toxin A in the Lower Urinary Tract ». *Nature Clinical Practice. Urology* 5, n° 6 (juin 2008): 319-328. doi:10.1038/ncpuro1124.
- Chandran, Jayanth, Jinhui Ding, et Huaibin Cai. « Alsin and the Molecular Pathways of Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Molecular Neurobiology* 36, n° 3 (10 juillet 2007): 224-231. doi:10.1007/s12035-007-0034-x.
- Chang, Howard Chia-Hao, Douglas N. Dimlich, Takakazu Yokokura, Ashim Mukherjee, Mark W. Kankel, Anindya Sen, Vasanthi Sridhar, et al. « Modeling Spinal Muscular Atrophy in Drosophila ». Édité par Alfred Lewin. *PLoS ONE* 3, n° 9 (15 septembre 2008): e3209. doi:10.1371/journal.pone.0003209.
- Chen, Chang-Zheng, Ling Li, Harvey F Lodish, et David P Bartel. « MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation ». *Science (New York, N.Y.)* 303, n° 5654 (2 janvier 2004): 83-86. doi:10.1126/science.1091903.

- Chen, H, D M McCarty, A T Bruce, et K Suzuki. « Oligodendrocyte-specific Gene Expression in Mouse Brain: Use of a Myelin-forming Cell Type-specific Promoter in an Adeno-associated Virus ». *Journal of Neuroscience Research* 55, n° 4 (15 février 1999): 504-513.
- Chiò, Adriano, Gianmartino Benzi, Maurizia Dossena, Roberto Mutani, et Gabriele Mora. « Severely Increased Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis Among Italian Professional Football Players ». *Brain* 128, n° 3 (3 janvier 2005): 472-476. doi:10.1093/brain/awh373.
- Choi, Vivian W., Douglas M. McCarty, et R. Jude Samulski. « Host Cell DNA Repair Pathways in Adeno-Associated Viral Genome Processing ». *Journal of Virology* 80, n° 21 (novembre 2006): 10346-10356. doi:10.1128/JVI.00841-06.
- Chowdary, Praveen D, Dung L Che, et Bianxiao Cui. « Neurotrophin signaling via long-distance axonal transport ». *Annual review of physical chemistry* 63 (2012): 571-594. doi:10.1146/annurev-physchem-032511-143704.
- Christine, C W, P A Starr, P S Larson, J L Eberling, W J Jagust, R A Hawkins, H F VanBrocklin, J F Wright, K S Bankiewicz, et M J Aminoff. « Safety and Tolerability of Putaminal AADC Gene Therapy for Parkinson Disease ». *Neurology* 73, n° 20 (17 novembre 2009): 1662-1669. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c29356.
- Chtarto, A, O Bockstael, T Tshibangu, O Dewitte, M Levivier, et L Tenenbaum. « A Next Step in Adeno-associated Virus (AAV)-mediated Gene Therapy for Neurological Diseases: Regulation and Targeting ». *British Journal of Clinical Pharmacology* (18 janvier 2013). doi:10.1111/bcp.12065.
- Cifuentes-Diaz, C, T Frugier, F D Tiziano, E Lacène, N Roblot, V Joshi, M H Moreau, et J Melki. « Deletion of Murine SMN Exon 7 Directed to Skeletal Muscle Leads to Severe Muscular Dystrophy ». *The Journal of Cell Biology* 152, n° 5 (5 mars 2001): 1107-1114.
- Cifuentes-Diaz, Carmen, Sophie Nicole, Maria E. Velasco, Christophe Borra-Cebrian, Cristina Panozzo, Tony Frugier, Gaelle Millet, Natacha Roblot, Vandana Joshi, et Judith Melki. « Neurofilament Accumulation at the Motor Endplate and Lack of Axonal Sprouting in a Spinal Muscular Atrophy Mouse Model ». *Human Molecular Genetics* 11, n° 12 (6 janvier 2002): 1439-1447. doi:10.1093/hmg/11.12.1439.
- Cioce, Mario, et Angus I. Lamond. « CAJAL BODIES: A Long History of Discovery ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, n° 1 (2005): 105-131. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.103738.
- Ciron, Carine, Arnaud Cressant, Françoise Roux, Sylvie Raoul, Yan Cherel, Philippe Hantraye, Nicole Déglon, et al. « Human Alpha-iduronidase Gene Transfer Mediated by Adeno-associated Virus Types 1, 2, and 5 in the Brain of Nonhuman Primates: Vector Diffusion and

- Biodistribution ». *Human Gene Therapy* 20, n° 4 (avril 2009): 350-360.
doi:10.1089/hum.2008.155.
- Ciron, Carine, Nathalie Desmaris, Marie-Anne Colle, Sylvie Raoul, Béatrice Joussemet, Lucie Vérot, Jérôme Ausseil, et al. « Gene Therapy of the Brain in the Dog Model of Hurler's Syndrome ». *Annals of Neurology* 60, n° 2 (août 2006): 204-213. doi:10.1002/ana.20870.
- Colle, Marie-Anne, Françoise Piguet, Lise Bertrand, Sylvie Raoul, Ivan Bieche, Laurence Dubreil, Didi Sloothak, et al. « Efficient Intracerebral Delivery of AAV5 Vector Encoding Human ARSA in Non-human Primate ». *Human Molecular Genetics* 19, n° 1 (1 janvier 2010): 147-158. doi:10.1093/hmg/ddp475.
- Cook, S A, K R Johnson, R T Bronson, et M T Davisson. « Neuromuscular Degeneration (nmd): a Mutation on Mouse Chromosome 19 That Causes Motor Neuron Degeneration ». *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 6, n° 3 (mars 1995): 187-191.
- Cooper-Knock, Johnathan, Christopher Hewitt, J. Robin Highley, Alice Brockington, Antonio Milano, Somai Man, Joanne Martindale, et al. « Clinico-pathological Features in Amyotrophic Lateral Sclerosis with Expansions in C9ORF72 ». *Brain* 135, n° 3 (3 janvier 2012): 751-764. doi:10.1093/brain/awr365.
- Cork, L C, J W Griffin, J F Munnell, M D Lorenz, et R J Adams. « Hereditary Canine Spinal Muscular Atrophy ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 38, n° 3 (mai 1979): 209-221.
- Corti, Stefania, Monica Nizzardo, Chiara Simone, Marianna Falcone, Martina Nardini, Dario Ronchi, Chiara Donadoni, et al. « Genetic Correction of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Spinal Muscular Atrophy ». *Science Translational Medicine* 4, n° 165 (19 décembre 2012): 165ra162-165ra162. doi:10.1126/scitranslmed.3004108.
- Court, Felipe A., et Michael P. Coleman. « Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli ». *Trends in Neurosciences* 35, n° 6 (juin 2012): 364-372.
doi:10.1016/j.tins.2012.04.001.
- Cox, G A, C L Mahaffey, et W N Frankel. « Identification of the Mouse Neuromuscular Degeneration Gene and Mapping of a Second Site Suppressor Allele ». *Neuron* 21, n° 6 (décembre 1998): 1327-1337.
- Cressant, Arnaud, Nathalie Desmaris, Lucie Verot, Thomas Bréjot, Roseline Froissart, Marie-T Vanier, Irène Maire, et Jean Michel Heard. « Improved Behavior and Neuropathology in the Mouse Model of Sanfilippo Type IIIB Disease after Adeno-associated Virus-mediated Gene Transfer in the Striatum ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society*

for Neuroscience 24, n° 45 (10 novembre 2004): 10229-10239.

doi:10.1523/JNEUROSCI.3558-04.2004.

Crystal, Ronald G, Dolan Sondhi, Neil R Hackett, Stephen M Kaminsky, Stefan Worgall, Philip Stieg, Mark Souweidane, et al. « Clinical Protocol. Administration of a Replication-deficient Adeno-associated Virus Gene Transfer Vector Expressing the Human CLN2 cDNA to the Brain of Children with Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis ». *Human Gene Therapy* 15, n° 11 (novembre 2004): 1131-1154. doi:10.1089/hum.2004.15.1131.

Culetto, Emmanuel, et David B. Sattelle. « A Role for Caenorhabditis Elegans in Understanding the Function and Interactions of Human Disease Genes ». *Human Molecular Genetics* 9, n° 6 (4 janvier 2000): 869-877. doi:10.1093/hmg/9.6.869.

Cummings, J F, A de Lahunta, C George, L Fuhrer, B A Valentine, B J Cooper, B A Summers, C R Huxtable, et H O Mohammed. « Equine Motor Neuron Disease; a Preliminary Report ». *The Cornell Veterinarian* 80, n° 4 (octobre 1990): 357-379.

D

D'Amico, Adele, Eugenio Mercuri, Francesco D Tiziano, et Enrico Bertini. « Spinal muscular atrophy ». *Orphanet journal of rare diseases* 6 (2011): 71. doi:10.1186/1750-1172-6-71.

David, Anna L, Jenny McIntosh, Donald M Peebles, Terry Cook, Simon Waddington, Boaz Weisz, Victoria Wigley, et al. « Recombinant Adeno-associated Virus-mediated in Utero Gene Transfer Gives Therapeutic Transgene Expression in the Sheep ». *Human Gene Therapy* 22, n° 4 (avril 2011): 419-426. doi:10.1089/hum.2010.007.

Davidson, B L, C S Stein, J A Heth, I Martins, R M Kotin, T A Derksen, J Zabner, A Ghodsi, et J A Chiorini. « Recombinant Adeno-associated Virus Type 2, 4, and 5 Vectors: Transduction of Variant Cell Types and Regions in the Mammalian Central Nervous System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n° 7 (28 mars 2000): 3428-3432. doi:10.1073/pnas.050581197.

Day, M J. « Immune System Development in the Dog and Cat ». *Journal of Comparative Pathology* 137 Suppl 1 (juillet 2007): S10-15. doi:10.1016/j.jcpa.2007.04.005.

De la Rúa-Doménech, R, H O Mohammed, J F Cummings, T J Divers, A de Lahunta, B Valentine, B A Summers, et C A Jackson. « Incidence and Risk Factors of Equine Motor Neuron Disease: An Ambidirectional Study ». *Neuroepidemiology* 14, n° 2 (1995): 54-64.

De Vos, Kurt J., Andrew J. Grierson, Steven Ackerley, et Christopher C.J. Miller. « Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases* ». *Annual Review of Neuroscience* 31, n° 1 (2008): 151-173. doi:10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711.

- Decressac, M, B Mattsson, M Lundblad, P Weikop, et A Björklund. « Progressive Neurodegenerative and Behavioural Changes Induced by AAV-mediated Overexpression of A-synuclein in Midbrain Dopamine Neurons ». *Neurobiology of Disease* 45, n° 3 (mars 2012): 939-953. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.013.
- DeJesus-Hernandez, Mariely, Ian R. Mackenzie, Bradley F. Boeve, Adam L. Boxer, Matt Baker, Nicola J. Rutherford, Alexandra M. Nicholson, et al. « Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS ». *Neuron* 72, n° 2 (octobre 2011): 245-256. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011.
- Deng, Han-Xiang, Wenjie Chen, Seong-Tshool Hong, Kym M Boycott, George H Gorrie, Nailah Siddique, Yi Yang, et al. « Mutations in UBQLN2 Cause Dominant X-linked Juvenile and Adult-onset ALS and ALS/dementia ». *Nature* 477, n° 7363 (8 septembre 2011): 211-215. doi:10.1038/nature10353.
- Dewey, Colleen M., Basar Cenik, Chantelle F. Sephton, Brett A. Johnson, Joachim Herz, et Gang Yu. « TDP-43 aggregation in neurodegeneration: Are stress granules the key? » *Brain Research* 1462 (26 juin 2012): 16-25. doi:10.1016/j.brainres.2012.02.032.
- Dewitt, John D., Julia Kwon, Rebecca Burton, et Jeffrey S. Stroup. « Conjugal Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Proceedings (Baylor University. Medical Center)* 25, n° 1 (janvier 2012): 31.
- Diefenbach, Russell J, Monica Miranda-Saksena, Mark W Douglas, et Anthony L Cunningham. « Transport and Egress of Herpes Simplex Virus in Neurons ». *Reviews in Medical Virology* 18, n° 1 (février 2008): 35-51. doi:10.1002/rmv.560.
- Dimitriadi, Maria, James N Sleight, Amy Walker, Howard C Chang, Anindya Sen, Geetika Kalloo, Jevade Harris, et al. « Conserved Genes Act as Modifiers of Invertebrate SMN Loss of Function Defects ». *PLoS Genetics* 6, n° 10 (2010): e1001172. doi:10.1371/journal.pgen.1001172.
- Ding, W., L. Zhang, Z. Yan, et J. F. Engelhardt. « Intracellular Trafficking of Adeno-associated Viral Vectors ». *Gene Therapy* 12, n° 11 (2005): 873-880. doi:10.1038/sj.gt.3302527.
- Dodge, James C, Jennifer Clarke, Antonius Song, Jie Bu, Wendy Yang, Tatyana V Taksir, Denise Griffiths, et al. « Gene Transfer of Human Acid Sphingomyelinase Corrects Neuropathology and Motor Deficits in a Mouse Model of Niemann-Pick Type A Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n° 49 (6 décembre 2005): 17822-17827. doi:10.1073/pnas.0509062102.
- Dodge, James C, Amanda M Haidet, Wendy Yang, Marco A Passini, Mark Hester, Jennifer Clarke, Eric M Roskelley, et al. « Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS Extends Survival in

- ALS Mice through Modification of Aberrant Glial Cell Activity ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, n° 6 (juin 2008): 1056-1064.
doi:10.1038/mt.2008.60.
- Dominguez, Elisa, Thibaut Marais, Nicolas Chatauret, Sofia Benkhelifa-Ziyyat, Sandra Duque, Philippe Ravassard, Romain Carcenac, et al. « Intravenous scAAV9 Delivery of a Codon-optimized SMN1 Sequence Rescues SMA Mice ». *Human Molecular Genetics* 20, n° 4 (15 février 2011): 681-693. doi:10.1093/hmg/ddq514.
- Dong, Biao, Hiroyuki Nakai, et Weidong Xiao. « Characterization of Genome Integrity for Oversized Recombinant AAV Vector ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 1 (janvier 2010): 87-92. doi:10.1038/mt.2009.258.
- Douar, Anne-Marie, Karine Poulard, Daniel Stockholm, et Olivier Danos. « Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Vectors: Routing to the Late Endosomal Compartment and Proteasome Degradation ». *Journal of Virology* 75, n° 4 (février 2001): 1824-1833. doi:10.1128/JVI.75.4.1824-1833.2001.
- Duan, Dongsheng, Yongping Yue, et John F. Engelhardt. « Consequences of DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Deficiency on Recombinant Adeno-Associated Virus Genome Circularization and Heterodimerization in Muscle Tissue ». *Journal of Virology* 77, n° 8 (avril 2003): 4751-4759. doi:10.1128/JVI.77.8.4751-4759.2003.
- Dubowitz, Victor. « Chaos in the classification of SMA: A possible resolution ». *Neuromuscular Disorders* 5, n° 1 (janvier 1995): 3-5. doi:10.1016/0960-8966(94)00075-K.
- Duchen, L W, et S J Strich. « An Hereditary Motor Neurone Disease with Progressive Denervation of Muscle in the Mouse: The Mutant "Wobbler" ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 31, n° 6 (décembre 1968): 535-542.
- Dupuis, Luc, Jose-Luis Gonzalez de Aguilar, Hugues Oudart, Marc de Tapia, Luis Barbeito, et Jean-Philippe Loeffler. « Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Trigger and a Target ». *Neuro-degenerative Diseases* 1, n° 6 (2004): 245-254. doi:10.1159/000085063.
- Dupuis, Luc, et Jean-Philippe Loeffler. « Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models ». *Current Opinion in Pharmacology* 9, n° 3 (juin 2009): 341-346. doi:10.1016/j.coph.2009.03.007.
- Duque, Sandra, Beatrice Joussemet, Christel Riviere, Thibaut Marais, Laurence Dubreil, Anne-Marie Douar, John Fyfe, Philippe Moullier, Marie-Anne Colle, et Martine Barkats.
« Intravenous Administration of Self-complementary AAV9 Enables Transgene Delivery to Adult Motor Neurons ». *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 17, n° 7 (juillet 2009): 1187-1196. doi:10.1038/mt.2009.71.

- During, M J, M G Kaplitt, M B Stern, et D Eidelberg. « Subthalamic GAD Gene Transfer in Parkinson Disease Patients Who Are Candidates for Deep Brain Stimulation ». *Human Gene Therapy* 12, n° 12 (10 août 2001): 1589-1591.
- During, M J, R J Samulski, J D Elsworth, M G Kaplitt, P Leone, X Xiao, J Li, et al. « In Vivo Expression of Therapeutic Human Genes for Dopamine Production in the Caudates of MPTP-treated Monkeys Using an AAV Vector ». *Gene Therapy* 5, n° 6 (juin 1998): 820-827. doi:10.1038/sj.gt.3300650.
- During, Matthew J, et Lei Cao. « VEGF, a Mediator of the Effect of Experience on Hippocampal Neurogenesis ». *Current Alzheimer Research* 3, n° 1 (février 2006): 29-33.
- E**
- Eaton. « Amelioration of Chronic Neuropathic Pain after Partial Nerve Injury by Adeno-associated Viral (AAV) Vector-mediated Over-expression of BDNF in the Rat Spinal Cord ». , *Published Online: 01 October 2002; | Doi:10.1038/sj.gt.3301814* 9, n° 20 (1 octobre 2002). doi:10.1038/sj.gt.3301814.
- Eberling, J L, W J Jagust, C W Christine, P Starr, P Larson, K S Bankiewicz, et M J Aminoff. « Results from a Phase I Safety Trial of hAADC Gene Therapy for Parkinson Disease ». *Neurology* 70, n° 21 (20 mai 2008): 1980-1983. doi:10.1212/01.wnl.0000312381.29287.ff.
- Egawa, Naohiro, Shiho Kitaoka, Kayoko Tsukita, Motoko Naitoh, Kazutoshi Takahashi, Takuya Yamamoto, Fumihiko Adachi, et al. « Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells ». *Science Translational Medicine* 4, n° 145 (8 janvier 2012): 145ra104-145ra104. doi:10.1126/scitranslmed.3004052.
- Ek, Carl Joakim, Katarzyna Magdalena Dziegielewska, Helen Stolp, et Norman Ruthven Saunders. « Functional Effectiveness of the Blood-brain Barrier to Small Water-soluble Molecules in Developing and Adult Opossum (Monodelphis Domestica) ». *The Journal of Comparative Neurology* 496, n° 1 (1 mai 2006): 13-26. doi:10.1002/cne.20885.
- el-Hamidi, M, H W Leipold, J G Vestweber, et G Saperstein. « Spinal Muscular Atrophy in Brown Swiss Calves ». *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe A* 36, n° 10 (décembre 1989): 731-738.
- El-Assaad, Iqbal, Jeremy A Di Bari, Koji Yasuda, Thomas J Divers, Brian A Summers, Alexander de Lahunta, et Hussni Mohammed. « Differential Expression of TAR DNA-binding Protein (TDP-43) in the Central Nervous System of Horses Afflicted with Equine Motor Neuron Disease (EMND): a Preliminary Study of a Potential Pathologic Marker ». *Veterinary*

Research Communications 36, n° 4 (décembre 2012): 221-226. doi:10.1007/s11259-012-9533-y.

Elliger, S S, C A Elliger, C P Aguilar, N R Raju, et G L Watson. « Elimination of Lysosomal Storage in Brains of MPS VII Mice Treated by Intrathecal Administration of an Adeno-associated Virus Vector ». *Gene Therapy* 6, n° 6 (juin 1999): 1175-1178. doi:10.1038/sj.gt.3300931.

Ellinwood, N Matthew, Jérôme Ausseil, Nathalie Desmaris, Stéphanie Bigou, Song Liu, Jackie K Jens, Elizabeth M Snella, et al. « Safe, Efficient, and Reproducible Gene Therapy of the Brain in the Dog Models of Sanfilippo and Hurler Syndromes ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19, n° 2 (février 2011): 251-259. doi:10.1038/mt.2010.265.

Ellis, B. L., M. L. Hirsch, S. N. Porter, R. J. Samulski, et M. H. Porteus. « Zinc-finger Nuclease-mediated Gene Correction Using Single AAV Vector Transduction and Enhancement by Food and Drug Administration-approved Drugs ». *Gene Therapy* 20, n° 1 (2013): 35-42. doi:10.1038/gt.2011.211.

Elsheikh, Bakri, Thomas Prior, Xiaoli Zhang, Robert Miller, Stephen J. Kolb, Dan Moore, Walter Bradley, et al. « An Analysis of Disease Severity Based on SMN2 Copy Number in Adults with Spinal Muscular Atrophy ». *Muscle & Nerve* 40, n° 4 (2009): 652–656. doi:10.1002/mus.21350.

Esau, Christine, Scott Davis, Susan F Murray, Xing Xian Yu, Sanjay K Pandey, Michael Pear, Lynnetta Watts, et al. « miR-122 Regulation of Lipid Metabolism Revealed by in Vivo Antisense Targeting ». *Cell Metabolism* 3, n° 2 (février 2006): 87-98. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.005.

F

Fallini, Claudia, Gary J Bassell, et Wilfried Rossoll. « Spinal muscular atrophy: The role of SMN in axonal mRNA regulation ». *Brain Research* (28 janvier 2012). doi:10.1016/j.brainres.2012.01.044.

Fallini, Claudia, Gary J. Bassell, et Wilfried Rossoll. « The ALS Disease Protein TDP-43 Is Actively Transported in Motor Neuron Axons and Regulates Axon Outgrowth ». *Human Molecular Genetics* (28 mai 2012). doi:10.1093/hmg/dds205.

Fan, Li, et Louise R Simard. « Survival Motor Neuron (SMN) Protein: Role in Neurite Outgrowth and Neuromuscular Maturation During Neuronal Differentiation and Development ». *Human Molecular Genetics* 11, n° 14 (1 juillet 2002): 1605-1614.

- Favaro, Patricia, Harre D Downey, J Shangzhen Zhou, J Fraser Wright, Bernd Hauck, Federico Mingozzi, Katherine A High, et Valder R Arruda. « Host and Vector-dependent Effects on the Risk of Germline Transmission of AAV Vectors ». *Molecular Therapy* 17, n° 6 (17 mars 2009): 1022-1030. doi:10.1038/mt.2009.56.
- Fecto, Faisal, et Teepu Siddique. « UBQLN2/P62 Cellular Recycling Pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia ». *Muscle & Nerve* 45, n° 2 (février 2012): 157-162. doi:10.1002/mus.23278.
- Federici, T, J S Taub, G R Baum, S J Gray, J C Grieger, K A Matthews, C R Handy, M A Passini, R J Samulski, et N M Boulis. « Robust Spinal Motor Neuron Transduction Following Intrathecal Delivery of AAV9 in Pigs ». *Gene Therapy* 19, n° 8 (août 2012): 852-859. doi:10.1038/gt.2011.130.
- Feldkötter, Markus, Verena Schwarzer, Radu Wirth, Thomas F. Wienker, et Brunhilde Wirth. « Quantitative Analyses of SMN1 and SMN2 Based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and Highly Reliable Carrier Testing and Prediction of Severity of Spinal Muscular Atrophy ». *American Journal of Human Genetics* 70, n° 2 (février 2002): 358-368.
- Felsburg, P J. « Overview of Immune System Development in the Dog: Comparison with Humans ». *Human & Experimental Toxicology* 21, n° 9-10 (octobre 2002): 487-492.
- Ferrara, Napoleone, Hans-Peter Gerber, et Jennifer LeCouter. « The Biology of VEGF and Its Receptors ». *Nature Medicine* 9, n° 6 (juin 2003): 669-676. doi:10.1038/nm0603-669.
- Fiacco, Todd A., Cendra Agulhon, et Ken D. McCarthy. « Sorting Out Astrocyte Physiology from Pharmacology ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49, n° 1 (2009): 151-174. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145602.
- Finsterer, J. « Bulbar and Spinal Muscular Atrophy (Kennedy's Disease): a Review ». *European Journal of Neurology* 16, n° 5 (2009): 556-561. doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02591.x.
- Finsterer, Josef, Lea Papić, et Michaela Auer-Grumbach. « Motor neuron, nerve, and neuromuscular junction disease ». *Current opinion in neurology* 24, n° 5 (octobre 2011): 469-474. doi:10.1097/WCO.0b013e32834a9448.
- Fischer, Utz, Qing Liu, et Gideon Dreyfuss. « The SMN-SIP1 Complex Has an Essential Role in Spliceosomal snRNP Biogenesis ». *Cell* 90, n° 6 (19 septembre 1997): 1023-1029. doi:10.1016/S0092-8674(00)80368-2.
- Fisher, K J, G P Gao, M D Weitzman, R DeMatteo, J F Burda, et J M Wilson. « Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. » *Journal of Virology* 70, n° 1 (janvier 1996): 520-532.

- Flotte, Terence R, Thomas J Conlon, Amy Poirier, Martha Campbell-Thompson, et Barry J Byrne. « Preclinical Characterization of a Recombinant Adeno-associated Virus Type 1-pseudotyped Vector Demonstrates Dose-dependent Injection Site Inflammation and Dissemination of Vector Genomes to Distant Sites ». *Human Gene Therapy* 18, n° 3 (mars 2007): 245-256. doi:10.1089/hum.2006.113.
- Forsayeth, John R, et Krystof S Bankiewicz. « AAV9: Over the Fence and Into the Woods . . . » *Molecular Therapy* 19, n° 6 (juin 2011): 1006-1007. doi:10.1038/mt.2011.95.
- Foust, Kevin D, Terence R Flotte, Paul J Reier, et Ronald J Mandel. « Recombinant Adeno-associated Virus-mediated Global Anterograde Delivery of Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor to the Spinal Cord: Comparison of Rubrospinal and Corticospinal Tracts in the Rat ». *Human Gene Therapy* 19, n° 1 (janvier 2008): 71-82. doi:10.1089/hum.2007.104.
- Foust, Kevin D, Xueyong Wang, Vicki L McGovern, Lyndsey Braun, Adam K Bevan, Amanda M Haidet, Thanh T Le, et al. « Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN ». *Nature Biotechnology* 28, n° 3 (28 février 2010): 271-274. doi:10.1038/nbt.1610.
- Foust, Kevin D., Emily Nurre, Chrystal L. Montgomery, Anna Hernandez, Curtis M. Chan, et Brian K. Kaspar. « Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS ». *Nature biotechnology* 27, n° 1 (janvier 2009): 59-65. doi:10.1038/nbt.1515.
- Fraldi, Alessandro, Kim Hemsley, Allison Crawley, Alessia Lombardi, Adeline Lau, Leanne Sutherland, Alberto Auricchio, Andrea Ballabio, et John J Hopwood. « Functional Correction of CNS Lesions in an MPS-IIIa Mouse Model by Intracerebral AAV-mediated Delivery of Sulfamidase and SUMF1 Genes ». *Human Molecular Genetics* 16, n° 22 (15 novembre 2007): 2693-2702. doi:10.1093/hmg/ddm223.
- Franklin K.B.J., Paxinos G., 1997. *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates*, San Diego Academic Press.
- Fu, H., L. Kang, J. S. Jennings, S. S. Moy, A. Perez, J. DiRosario, D. M. McCarty, et J. Muenzer. « Significantly Increased Lifespan and Improved Behavioral Performances by rAAV Gene Delivery in Adult Mucopolysaccharidosis IIIB Mice ». *Gene Therapy* 14, n° 14 (2007): 1065-1077. doi:10.1038/sj.gt.3302961.
- Fu, Haiyan, Julianne DiRosario, Lu Kang, Joseph Muenzer, et Douglas M McCarty. « Restoration of Central Nervous System alpha-N-acetylglucosaminidase Activity and Therapeutic Benefits in Mucopolysaccharidosis IIIB Mice by a Single Intracisternal Recombinant Adeno-

- associated Viral Type 2 Vector Delivery ». *The Journal of Gene Medicine* 12, n° 7 (juillet 2010): 624-633. doi:10.1002/jgm.1480.
- Fu, Haiyan, Joseph Muenzer, Richard J. Samulski, George Breese, Jerilyn Sifford, Xinhua Zeng, et Douglas M. McCarty. « Self-Complementary Adeno-associated Virus Serotype 2 Vector: Global Distribution and Broad Dispersion of AAV-Mediated Transgene Expression in Mouse Brain ». *Molecular Therapy* 8, n° 6 (2003): 911-917. doi:10.1016/j.ymthe.2003.08.021.
- Fu, Haiyan, Richard J Samulski, Thomas J McCown, Yoana J Picornell, David Fletcher, et Joseph Muenzer. « Neurological Correction of Lysosomal Storage in a Mucopolysaccharidosis IIIB Mouse Model by Adeno-associated Virus-mediated Gene Delivery ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 5, n° 1 (janvier 2002): 42-49. doi:10.1006/mthe.2001.0514.
- Fujimura, Masatake, Fusako Usuki, Miwako Kawamura, et Shuji Izumo. « Inhibition of the Rho/ROCK Pathway Prevents Neuronal Degeneration in Vitro and in Vivo Following Methylmercury Exposure ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 250, n° 1 (1 janvier 2011): 1-9. doi:10.1016/j.taap.2010.09.011.
- Fukuchi, Ken-ichiro, Kazuki Tahara, Hong-Duck Kim, J Adam Maxwell, Terry L Lewis, Mary Ann Accavitti-Loper, Helen Kim, Selvarangan Ponnazhagan, et Robert Lalonde. « Anti-Abeta Single-chain Antibody Delivery via Adeno-associated Virus for Treatment of Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Disease* 23, n° 3 (septembre 2006): 502-511. doi:10.1016/j.nbd.2006.04.012.
- Fyfe, John C, Marilyn Menotti-Raymond, Victor A David, Lars Brichta, Alejandro A Schäffer, Richa Agarwala, William J Murphy, et al. « An approximately 140-kb deletion associated with feline spinal muscular atrophy implies an essential LIX1 function for motor neuron survival ». *Genome Research* 16, n° 9 (septembre 2006): 1084-1090. doi:10.1101/gr.5268806.

G

- Gabanella, Francesca, Matthew E R Butchbach, Luciano Saieva, Claudia Carissimi, Arthur H M Burghes, et Livio Pellizzoni. « Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs ». *PLoS One* 2, n° 9 (2007): e921. doi:10.1371/journal.pone.0000921.
- Gabanella, Francesca, Claudia Carissimi, Alessandro Usiello, et Livio Pellizzoni. « The Activity of the Spinal Muscular Atrophy Protein Is Regulated During Development and Cellular Differentiation ». *Human Molecular Genetics* 14, n° 23 (1 décembre 2005): 3629-3642. doi:10.1093/hmg/ddi390.

- Gadalla, Kamal K E, Mark E S Bailey, Rosemary C Spike, Paul D Ross, Kenton T Woodard, Sahana Nagabhushan Kalburgi, Lavanya Bachaboina, et al. « Improved Survival and Reduced Phenotypic Severity Following AAV9/MECP2 Gene Transfer to Neonatal and Juvenile Male Mecp2 Knockout Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21, n° 1 (janvier 2013): 18-30. doi:10.1038/mt.2012.200.
- Galibert, Lionel, et Otto-Wilhelm Merten. « Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases ». *Journal of invertebrate pathology* 107 Suppl (juillet 2011): S80-93. doi:10.1016/j.jip.2011.05.008.
- Gao, Guangping, Luk H Vandenberghe, et James M Wilson. « New recombinant serotypes of AAV vectors ». *Current gene therapy* 5, n° 3 (juin 2005): 285-297.
- Geisler, A, A Jungmann, J Kurreck, W Poller, H A Katus, R Vetter, H Fechner, et O J Müller. « microRNA122-regulated Transgene Expression Increases Specificity of Cardiac Gene Transfer Upon Intravenous Delivery of AAV9 Vectors ». *Gene Therapy* 18, n° 2 (février 2011): 199-209. doi:10.1038/gt.2010.141.
- Gellhaus, Katharina, Tatjana I Cornu, Regine Heilbronn, et Toni Cathomen. « Fate of recombinant adeno-associated viral vector genomes during DNA double-strand break-induced gene targeting in human cells ». *Human gene therapy* 21, n° 5 (mai 2010): 543-553. doi:10.1089/hum.2009.167.
- Gerbino, Valeria, Maria Teresa Carri, Mauro Cozzolino, et Tilmann Achsel. « Mislocalised FUS Mutants Stall Spliceosomal snRNPs in the Cytoplasm ». *Neurobiology of Disease* (21 mars 2013). doi:10.1016/j.nbd.2013.03.003.
- Giesemann, Torsten, Silvia Rathke-Hartlieb, Martin Rothkegel, Jörg W. Bartsch, Sabine Buchmeier, Brigitte M. Jockusch, et Harald Jockusch. « A Role for Polyproline Motifs in the Spinal Muscular Atrophy Protein SMN PROFILINS BIND TO AND COLOCALIZE WITH SMN IN NUCLEAR GEMS ». *Journal of Biological Chemistry* 274, n° 53 (31 décembre 1999): 37908-37914. doi:10.1074/jbc.274.53.37908.
- Gilbert, S. F., 2010. *Developmental Biology*, 9th ed. Sinauer.
- Glascock, Jacqueline J., Erkan Y. Osman, Mary J. Wetz, Megan M. Krogman, Monir Shababi, et Christian L. Lorson. « Decreasing Disease Severity in Symptomatic, Smn^{-/-};SMN2^{+/+}, Spinal Muscular Atrophy Mice Following scAAV9-SMN Delivery ». *Human Gene Therapy* 23, n° 3 (mars 2012): 330-335. doi:10.1089/hum.2011.166.
- Glascock, Jacqueline J., Monir Shababi, Mary J. Wetz, Megan M. Krogman, et Christian L. Lorson. « Direct central nervous system delivery provides enhanced protection following

- vector mediated gene replacement in a severe model of Spinal Muscular Atrophy ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417, n° 1 (6 janvier 2012): 376-381. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.121.
- Gonzalez de Aguilar, Jose-Luis, Andoni Echaniz-Laguna, Anissa Fergani, Frédérique René, Vincent Meininger, Jean-Philippe Loeffler, et Luc Dupuis. « Amyotrophic lateral sclerosis: all roads lead to Rome ». *Journal of Neurochemistry* 101, n° 5 (juin 2007): 1153-1160. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04408.x.
- Gordon, Paul H, Dan H Moore, Robert G Miller, Julaine M Florence, Joseph L Verheijde, Carolyn Doorish, Joan F Hilton, et al. « Efficacy of Minocycline in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Phase III Randomised Trial ». *Lancet Neurology* 6, n° 12 (décembre 2007): 1045-1053. doi:10.1016/S1474-4422(07)70270-3.
- Gray, S J, S Nagabhushan Kalburgi, T J McCown, et R Jude Samulski. « Global CNS Gene Delivery and Evasion of anti-AAV-neutralizing Antibodies by Intrathecal AAV Administration in Non-human Primates ». *Gene Therapy* 20, n° 4 (avril 2013): 450-459. doi:10.1038/gt.2012.101.
- Gray, Steven J, Bonita L Blake, Hugh E Criswell, Sarah C Nicolson, R Jude Samulski, Thomas J McCown, et Wuping Li. « Directed Evolution of a Novel Adeno-associated Virus (AAV) Vector That Crosses the Seizure-compromised Blood-brain Barrier (BBB) ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 3 (mars 2010): 570-578. doi:10.1038/mt.2009.292.
- Gray, Steven J, Stacey B Foti, Joel W Schwartz, Lavanya Bachaboina, Bonnie Taylor-Blake, Jennifer Coleman, Michael D Ehlers, Mark J Zylka, Thomas J McCown, et R Jude Samulski. « Optimizing Promoters for Recombinant Adeno-associated Virus-mediated Gene Expression in the Peripheral and Central Nervous System Using Self-complementary Vectors ». *Human Gene Therapy* 22, n° 9 (septembre 2011): 1143-1153. doi:10.1089/hum.2010.245.
- Gray, Steven J, Valerie Matagne, Lavanya Bachaboina, Swati Yadav, Sergio R Ojeda, et R Jude Samulski. « Preclinical Differences of Intravascular AAV9 Delivery to Neurons and Glia: A Comparative Study of Adult Mice and Nonhuman Primates ». *Molecular Therapy* 19, n° 6 (12 avril 2011): 1058-1069. doi:10.1038/mt.2011.72.
- Greenberg, David A., et Kunlin Jin. « From Angiogenesis to Neuropathology ». *Nature* 438, n° 7070 (15 décembre 2005): 954-959. doi:10.1038/nature04481.
- Greenway, Matthew J, Peter M Andersen, Carsten Russ, Sean Ennis, Susan Cashman, Colette Donaghy, Victor Patterson, et al. « ANG mutations segregate with familial and “sporadic”

amyotrophic lateral sclerosis ». *Nature Genetics* 38, n° 4 (avril 2006): 411-413.

doi:10.1038/ng1742.

Grice, Stuart J, James N Sleight, Ji-Long Liu, et David B Sattelle. « Invertebrate Models of Spinal Muscular Atrophy: Insights into Mechanisms and Potential Therapeutics ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 33, n° 12 (décembre 2011): 956-965. doi:10.1002/bies.201100082.

Grimmler, Matthias, Simon Otter, Christoph Peter, Felicitas Müller, Ashwin Chari, et Utz Fischer. « Unrip, a Factor Implicated in Cap-independent Translation, Associates with the Cytosolic SMN Complex and Influences Its Intracellular Localization ». *Human Molecular Genetics* 14, n° 20 (15 octobre 2005): 3099-3111. doi:10.1093/hmg/ddi343.

Grohmann, K, M Schuelke, A Diers, K Hoffmann, B Lucke, C Adams, E Bertini, et al. « Mutations in the Gene Encoding Immunoglobulin Mu-binding Protein 2 Cause Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type 1 ». *Nature Genetics* 29, n° 1 (septembre 2001): 75-77. doi:10.1038/ng703.

Guidetti, D, R Sabadini, A Ferlini, et I Torrente. « Epidemiological survey of X-linked bulbar and spinal muscular atrophy, or Kennedy disease, in the province of Reggio Emilia, Italy ». *European journal of epidemiology* 17, n° 6 (2001): 587-591. doi:10.1023/A:1014580219761.

Guo, Xia, et Leaf Huang. « Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery ». *Accounts of Chemical Research* 45, n° 7 (17 juillet 2012): 971-979. doi:10.1021/ar200151m.

Gurney, M E, H Pu, A Y Chiu, M C Dal Canto, C Y Polchow, D D Alexander, J Caliando, A Hentati, Y W Kwon, et H X Deng. « Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation ». *Science (New York, N.Y.)* 264, n° 5166 (17 juin 1994): 1772-1775.

H

Hacein-Bey-Abina, Salima, Christof von Kalle, Manfred Schmidt, Françoise Le Deist, Nicolas Wulffraat, Elisabeth McIntyre, Isabelle Radford, et al. « A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency ». *New England Journal of Medicine* 348, n° 3 (2003): 255-256. doi:10.1056/NEJM200301163480314.

Hafezparast, Majid, Rainer Klocke, Christiana Ruhrberg, Andreas Marquardt, Azlina Ahmad-Annuar, Samantha Bowen, Giovanna Lalli, et al. « Mutations in Dynein Link Motor Neuron Degeneration to Defects in Retrograde Transport ». *Science* 300, n° 5620 (5 février 2003): 808-812. doi:10.1126/science.1083129.

- Händel, Eva-Maria, et Toni Cathomen. « Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity ». *Current gene therapy* 11, n° 1 (février 2011): 28-37.
- Hanrott, Katharine, Louise Gudmunsen, Michael J O'Neill, et Susan Wonnacott. « 6-hydroxydopamine-induced Apoptosis Is Mediated via Extracellular Auto-oxidation and Caspase 3-dependent Activation of Protein Kinase Cdelta ». *The Journal of Biological Chemistry* 281, n° 9 (3 mars 2006): 5373-5382. doi:10.1074/jbc.M511560200.
- Hao, L. T., M. Wolman, M. Granato, et C. E. Beattie. « Survival Motor Neuron Affects Plastin 3 Protein Levels Leading to Motor Defects ». *Journal of Neuroscience* 32, n° 15 (11 avril 2012): 5074-5084. doi:10.1523/JNEUROSCI.5808-11.2012.
- Hao, Le T, Phan Q Duy, James D Jontes, Marc Wolman, Michael Granato, et Christine E Beattie. « Temporal Requirement for SMN in Motoneuron Development ». *Human Molecular Genetics* (26 mars 2013). doi:10.1093/hmg/ddt110.
- Hardy, John, et Dennis J Selkoe. « The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics ». *Science (New York, N.Y.)* 297, n° 5580 (19 juillet 2002): 353-356. doi:10.1126/science.1072994.
- He, Qianchuan, Charles Lowrie, G Diane Shelton, Rudy J Castellani, Marilyn Menotti-Raymond, William Murphy, Stephen J O'Brien, William F Swanson, et John C Fyfe. « Inherited motor neuron disease in domestic cats: a model of spinal muscular atrophy ». *Pediatric Research* 57, n° 3 (mars 2005): 324-330. doi:10.1203/01.PDR.0000153625.46892.6F.
- Heimann, P, S Laage, et H Jockusch. « Defect of Sperm Assembly in a Neurological Mutant of the Mouse, Wobbler (WR) ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 47, n° 2 (juillet 1991): 77-83.
- Henckaerts, Els, Nathalie Dutheil, Nadja Zeltner, Steven Kattman, Erik Kohlbrenner, Peter Ward, Nathalie Clément, et al. « Site-specific integration of adeno-associated virus involves partial duplication of the target locus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, n° 18 (5 mai 2009): 7571-7576. doi:10.1073/pnas.0806821106.
- Hensley, Kenneth, Molina Mhatre, Shenyun Mou, Quentin N Pye, Charles Stewart, Melinda West, et Kelly S Williamson. « On the Relation of Oxidative Stress to Neuroinflammation: Lessons Learned from the G93A-SOD1 Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 8, n° 11-12 (décembre 2006): 2075-2087. doi:10.1089/ars.2006.8.2075.
- Hermening, Stephan, Sebastian Kügler, Mathias Bähr, et Stefan Isenmann. « Increased Protein Expression from Adenoviral Shuttle Plasmids and Vectors by Insertion of a Small Chimeric

- Intron Sequence ». *Journal of Virological Methods* 122, n° 1 (1 décembre 2004): 73-77.
doi:10.1016/j.jviromet.2004.08.005.
- Herzog, Roland W, Paul A Fields, Valder R Arruda, Jeff O Brubaker, Elina Armstrong, Darryl McClintock, Dwight A Bellinger, Linda B Couto, Timothy C Nichols, et Katherine A High. « Influence of Vector Dose on Factor IX-specific T and B Cell Responses in Muscle-directed Gene Therapy ». *Human Gene Therapy* 13, n° 11 (20 juillet 2002): 1281-1291.
doi:10.1089/104303402760128513.
- Hirsch, Matthew L, Mavis Agbandje-McKenna, et R Jude Samulski. « Little Vector, Big Gene Transduction: Fragmented Genome Reassembly of Adeno-associated Virus ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 1 (janvier 2010): 6-8.
doi:10.1038/mt.2009.280.
- Hirsch, N. P. « Neuromuscular Junction in Health and Disease ». *British Journal of Anaesthesia* 99, n° 1 (7 janvier 2007): 132-138. doi:10.1093/bja/aem144.
- Hollenbeck, Peter J., et William M. Saxton. « The Axonal Transport of Mitochondria ». *Journal of Cell Science* 118, n° 23 (12 janvier 2005): 5411-5419. doi:10.1242/jcs.02745.
- Hollis, Edmund R. Hollis, Ken Kadoya, Matthew Hirsch, Richard J. Samulski, et Mark H. Tuszynski. « Efficient Retrograde Neuronal Transduction Utilizing Self-complementary AAV1 ». *Molecular Therapy* 16, n° 2 (2007): 296-301. doi:10.1038/sj.mt.6300367.
- Horowitz, Eric D., K. Shefaet Rahman, Brian D. Bower, David J. Dismuke, Michael C. Falvo, Jack D. Griffith, Stephen C. Harvey, et Aravind Asokan. « Biophysical and Ultrastructural Characterization of Adeno-associated Viral Capsid Uncoating and Genome Release ». *Journal of Virology* (26 décembre 2012). doi:10.1128/JVI.03017-12.
- Hrabé de Angelis, M H, H Flaswinkel, H Fuchs, B Rathkolb, D Soewarto, S Marschall, S Heffner, et al. « Genome-wide, Large-scale Production of Mutant Mice by ENU Mutagenesis ». *Nature Genetics* 25, n° 4 (août 2000): 444-447. doi:10.1038/78146.
- Hsieh-Li, H M, J G Chang, Y J Jong, M H Wu, N M Wang, C H Tsai, et H Li. « A mouse model for spinal muscular atrophy ». *Nature Genetics* 24, n° 1 (janvier 2000): 66-70.
doi:10.1038/71709.
- Hsu, Ying, H D Madhawa Hettiarachchi, David C Zhu, et Andreas A Linninger. « The Frequency and Magnitude of Cerebrospinal Fluid Pulsations Influence Intrathecal Drug Distribution: Key Factors for Interpatient Variability ». *Anesthesia and Analgesia* 115, n° 2 (août 2012): 386-394. doi:10.1213/ANE.0b013e3182536211.
- Hu, Chuhong, Ronald W Busuttil, et Gerald S Lipshutz. « RH10 Provides Superior Transgene Expression in Mice When Compared with Natural AAV Serotypes for Neonatal Gene

- Therapy ». *The Journal of Gene Medicine* 12, n° 9 (septembre 2010): 766-778.
doi:10.1002/jgm.1496.
- Hua, Yimin, Kentaro Sahashi, Frank Rigo, Gene Hung, Guy Horev, C Frank Bennett, et Adrian R Krainer. « Peripheral SMN Restoration Is Essential for Long-term Rescue of a Severe Spinal Muscular Atrophy Mouse Model ». *Nature* 478, n° 7367 (6 octobre 2011): 123-126.
doi:10.1038/nature10485.
- Huang, Cao, Hongxia Zhou, Jianbin Tong, Han Chen, Yong-Jian Liu, Dian Wang, Xiaotao Wei, et Xu-Gang Xia. « FUS Transgenic Rats Develop the Phenotypes of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration ». *PLoS Genetics* 7, n° 3 (mars 2011): e1002011. doi:10.1371/journal.pgen.1002011.
- Hudry, Eloise, Debby Van Dam, Wim Kulik, Peter P De Deyn, Femke S Stet, Ornella Ahouansou, Abdellatif Benraiss, et al. « Adeno-associated Virus Gene Therapy with Cholesterol 24-hydroxylase Reduces the Amyloid Pathology before or after the Onset of Amyloid Plaques in Mouse Models of Alzheimer's Disease ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 1 (janvier 2010): 44-53. doi:10.1038/mt.2009.175.
- Hutson, T H, J Verhaagen, R J Yáñez-Muñoz, et L D F Moon. « Corticospinal Tract Transduction: a Comparison of Seven Adeno-associated Viral Vector Serotypes and a Non-integrating Lentiviral Vector ». *Gene Therapy* 19, n° 1 (janvier 2012): 49-60. doi:10.1038/gt.2011.71.
- Ikenaka, Kensuke, Masahisa Katsuno, Kaori Kawai, Shinsuke Ishigaki, Fumiaki Tanaka, et Gen Sobue. « Disruption of axonal transport in motor neuron diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 13, n° 1 (2012): 1225-1238. doi:10.3390/ijms13011225.

I

- Imlach, Wendy L., Erin S. Beck, Ben Jiwon Choi, Francesco Lotti, Livio Pellizzoni, et Brian D. McCabe. « SMN Is Required for Sensory-Motor Circuit Function in Drosophila ». *Cell* 151, n° 2 (12 octobre 2012): 427-439. doi:10.1016/j.cell.2012.09.011.
- International Workshop, National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal. « The Development of Science-based Guidelines for Laboratory Animal Care ». Text, 2004.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK25397/>.
- Iwamoto, Naotaka, Atsushi Watanabe, Motoko Yamamoto, Noriko Miyake, Toshiyuki Kurai, Akira Teramoto, et Takashi Shimada. « Global Diffuse Distribution in the Brain and Efficient Gene Delivery to the Dorsal Root Ganglia by Intrathecal Injection of Adeno-associated Viral Vector Serotype 1 ». *The Journal of Gene Medicine* 11, n° 6 (juin 2009): 498-505.
doi:10.1002/jgm.1325.

J

- Janson, Christopher, Scott McPhee, Larissa Bilaniuk, John Haselgrove, Mark Testaiuti, Andrew Freese, Dah-Jyuu Wang, et al. « Clinical Protocol. Gene Therapy of Canavan Disease: AAV-2 Vector for Neurosurgical Delivery of Aspartoacylase Gene (ASPA) to the Human Brain ». *Human Gene Therapy* 13, n° 11 (20 juillet 2002): 1391-1412. doi:10.1089/104303402760128612.
- Jimenez-Andrade, Juan M, Monica B Herrera, Joseph R Ghilardi, Marina Vardanyan, Ohannes K Melemedjian, et Patrick W Mantyh. « Vascularization of the Dorsal Root Ganglia and Peripheral Nerve of the Mouse: Implications for Chemical-induced Peripheral Sensory Neuropathies ». *Molecular Pain* 4 (2008): 10. doi:10.1186/1744-8069-4-10.
- Jin, K. « Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, n° 18 (14 août 2002): 11946-11950. doi:10.1073/pnas.182296499.
- Jin, Kun Lin, Xiao Ou Mao, et David A. Greenberg. « Vascular Endothelial Growth Factor: Direct Neuroprotective Effect in in Vitro Ischemia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n° 18 (29 août 2000): 10242.
- Joussemet, Béatrice, Brahim Belbellaa, Alexandra Mendes-Madeira, Thomas Bucher, Delphine Briot-Nivard, Laurence Dubreil, Marie-Anne Colle, Yan Cherel, Philippe Moullier, et Fabienne Rolling. « Neonatal Systemic Delivery of scAAV9 in Rodents and Large Animals Results in Gene Transfer to RPE Cells in the Retina ». *Experimental Eye Research* 93, n° 4 (octobre 2011): 491-502. doi:10.1016/j.exer.2011.06.012.
- Jung, Hosung, Byung C. Yoon, et Christine E. Holt. « Axonal mRNA Localization and Local Protein Synthesis in Nervous System Assembly, Maintenance and Repair ». *Nature Reviews Neuroscience* 13, n° 5 (5 janvier 2012): 308-324. doi:10.1038/nrn3210.

K

- Kaemmerer, W F, R G Reddy, C A Warlick, S D Hartung, R S McIvor, et W C Low. « In Vivo Transduction of Cerebellar Purkinje Cells Using Adeno-associated Virus Vectors ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 2, n° 5 (novembre 2000): 446-457. doi:10.1006/mthe.2000.0134.
- Kane, N. M., et A. Oware. « Nerve Conduction and Electromyography Studies ». *Journal of Neurology* 259, n° 7 (1 juillet 2012): 1502-1508. doi:10.1007/s00415-012-6497-3.

- Kaplitt, M G, P Leone, R J Samulski, X Xiao, D W Pfaff, K L O'Malley, et M J During. « Long-term Gene Expression and Phenotypic Correction Using Adeno-associated Virus Vectors in the Mammalian Brain ». *Nature Genetics* 8, n° 2 (octobre 1994): 148-154.
doi:10.1038/ng1094-148.
- Kaplitt, Michael G, Andrew Feigin, Chengke Tang, Helen L Fitzsimons, Paul Mattis, Patricia A Lawlor, Ross J Bland, et al. « Safety and Tolerability of Gene Therapy with an Adeno-associated Virus (AAV) Borne GAD Gene for Parkinson's Disease: An Open Label, Phase I Trial ». *Lancet* 369, n° 9579 (23 juin 2007): 2097-2105. doi:10.1016/S0140-6736(07)60982-9.
- Kaplitt, et Pfaff. « Viral Vectors for Gene Delivery and Expression in the CNS ». *Methods (San Diego, Calif.)* 10, n° 3 (décembre 1996): 343-350.
- Karam, Chafic, Stephen N. Scelsa, et Daniel J. L. MacGowan. « The clinical course of progressive bulbar palsy ». *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 11, n° 4 (août 2010): 364-368.
doi:10.3109/17482960903513159.
- Kariya, Shingo, Gyu-Hwan Park, Yuka Maeno-Hikichi, Olga Leykekhman, Cathleen Lutz, Marc S Arkovitz, Lynn T Landmesser, et Umrao R Monani. « Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy ». *Human Molecular Genetics* 17, n° 16 (15 août 2008): 2552-2569. doi:10.1093/hmg/ddn156.
- Kaspar, Brian K, Jerònia Lladó, Nushin Sherkat, Jeffrey D Rothstein, et Fred H Gage.
« Retrograde Viral Delivery of IGF-1 Prolongs Survival in a Mouse ALS Model ». *Science (New York, N.Y.)* 301, n° 5634 (8 août 2003): 839-842. doi:10.1126/science.1086137.
- Katsuno, M, H Adachi, A Inukai, et G Sobue. « Transgenic Mouse Models of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA) ». *Cytogenetic and Genome Research* 100, n° 1-4 (2003): 243-251. doi:72860.
- Katsuno, Masahisa, Fumiaki Tanaka, Hiroaki Adachi, Haruhiko Banno, Keisuke Suzuki, Hirohisa Watanabe, et Gen Sobue. « Pathogenesis and Therapy of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA) ». *Progress in Neurobiology* 99, n° 3 (décembre 2012): 246-256.
doi:10.1016/j.pneurobio.2012.05.007.
- Kedersha, Nancy, et Paul Anderson. « Regulation of Translation by Stress Granules and Processing Bodies ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 90 (2009): 155-185. doi:10.1016/S1877-1173(09)90004-7.
- Keller, Susanna R, Ann C Davis, et Kevin B Clairmont. « Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels

- but maintain normal glucose homeostasis ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n° 20 (17 mai 2002): 17677-17686. doi:10.1074/jbc.M202037200.
- Kiernan, Matthew C, Steve Vucic, Benjamin C Cheah, Martin R Turner, Andrew Eisen, Orla Hardiman, James R Burrell, et Margaret C Zoing. « Amyotrophic lateral sclerosis ». *The Lancet* 377, n° 9769 (12): 942-955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7.
- King, Anna E, Catherine A Blizzard, Katherine A Southam, James C Vickers, et Tracey C Dickson. « Degeneration of Axons in Spinal White Matter in G93A mSOD1 Mouse Characterized by NFL and A-internexin Immunoreactivity ». *Brain Research* 1465 (17 juillet 2012): 90-100. doi:10.1016/j.brainres.2012.05.018.
- Kisby, Glen E., Rebecca C. Fry, Michael R. Lasarev, Theodor K. Bammler, Richard P. Beyer, Mona Churchwell, Daniel R. Doerge, et al. « The Cycad Genotoxin MAM Modulates Brain Cellular Pathways Involved in Neurodegenerative Disease and Cancer in a DNA Damage-Linked Manner ». Édité par Mel B. Feany. *PLoS ONE* 6, n° 6 (23 juin 2011): e20911. doi:10.1371/journal.pone.0020911.
- Klarica, Marijan, Milan Radoš, Pero Draganić, Gorislav Erceg, Darko Orešković, Jurica Maraković, et Marin Bulat. « Effect of Head Position on Cerebrospinal Fluid Pressure in Cats: Comparison with Artificial Model ». *Croatian medical journal* 47, n° 2 (avril 2006): 233-238.
- Klein, R L, E M Meyer, A L Peel, S Zolotukhin, C Meyers, N Muzyczka, et M A King. « Neuron-specific Transduction in the Rat Septohippocampal or Nigrostriatal Pathway by Recombinant Adeno-associated Virus Vectors ». *Experimental Neurology* 150, n° 2 (avril 1998): 183-194. doi:10.1006/exnr.1997.6736.
- Klein, Ronald L, Robert D Dayton, Nancy J Leidenheimer, Karen Jansen, Todd E Golde, et Richard M Zweig. « Efficient Neuronal Gene Transfer with AAV8 Leads to Neurotoxic Levels of Tau or Green Fluorescent Proteins ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13, n° 3 (mars 2006): 517-527. doi:10.1016/j.ymthe.2005.10.008.
- Klein, Ronald L, Robert D Dayton, Jason B Tatom, Karen M Henderson, et Phillip P Henning. « AAV8, 9, Rh10, Rh43 Vector Gene Transfer in the Rat Brain: Effects of Serotype, Promoter and Purification Method ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, n° 1 (janvier 2008): 89-96. doi:10.1038/sj.mt.6300331.
- Koerber, James T, Jae-Hyung Jang, et David V Schaffer. « DNA Shuffling of Adeno-associated Virus Yields Functionally Diverse Viral Progeny ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, n° 10 (octobre 2008): 1703-1709. doi:10.1038/mt.2008.167.

- Koerber, James T, Ryan Klimczak, Jae-Hyung Jang, Deniz Dalkara, John G Flannery, et David V Schaffer. « Molecular Evolution of Adeno-associated Virus for Enhanced Glial Gene Delivery ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17, n° 12 (décembre 2009): 2088-2095. doi:10.1038/mt.2009.184.
- Kole, Maarten H.P., et Greg J. Stuart. « Signal Processing in the Axon Initial Segment ». *Neuron* 73, n° 2 (26 janvier 2012): 235-247. doi:10.1016/j.neuron.2012.01.007.
- Kong, L., X. Wang, D. W. Choe, M. Polley, B. G. Burnett, M. Bosch-Marce, J. W. Griffin, M. M. Rich, et C. J. Sumner. « Impaired Synaptic Vesicle Release and Immaturity of Neuromuscular Junctions in Spinal Muscular Atrophy Mice ». *Journal of Neuroscience* 29, n° 3 (21 janvier 2009): 842-851. doi:10.1523/JNEUROSCI.4434-08.2009.
- Kosik, K S. « Tau Protein and Neurodegeneration ». *Molecular Neurobiology* 4, n° 3-4 (Fall-Winter 1990): 171-179. doi:10.1007/BF02780339.
- Kou, Jinghong, HongDuck Kim, Abhinandan Pattanayak, Min Song, Jeong-Eun Lim, Hiroaki Taguchi, Sudhir Paul, John R Cirrito, Selvarangan Ponnazhagan, et Ken-ichiro Fukuchi. « Anti-Amyloid- β Single-Chain Antibody Brain Delivery Via AAV Reduces Amyloid Load But May Increase Cerebral Hemorrhages in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 27, n° 1 (2011): 23-38. doi:10.3233/JAD-2011-110230.
- Krebs, Stefan, Ivica Medugorac, Susanne Röther, Katja Strässer, et Martin Förster. « A Missense Mutation in the 3-ketodihydrosphingosine Reductase FVT1 as Candidate Causal Mutation for Bovine Spinal Muscular Atrophy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 16 (17 avril 2007): 6746-6751. doi:10.1073/pnas.0607721104.
- Kreppel, Florian, et Stefan Kochanek. « Long-term Transgene Expression in Proliferating Cells Mediated by Episomally Maintained High-capacity Adenovirus Vectors ». *Journal of Virology* 78, n° 1 (janvier 2004): 9-22.
- Kriegstein, Arnold, et Arturo Alvarez-Buylla. « The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells ». *Annual Review of Neuroscience* 32 (2009): 149-184. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Kwon, Brian K, Jie Liu, Clarrie Lam, Ward Plunet, Loren W Oschipok, William Hauswirth, Adriana Di Polo, Armin Blesch, et Wolfram Tetzlaff. « Brain-derived Neurotrophic Factor Gene Transfer with Adeno-associated Viral and Lentiviral Vectors Prevents Rubrospinal Neuronal Atrophy and Stimulates Regeneration-associated Gene Expression after Acute Cervical Spinal Cord Injury ». *Spine* 32, n° 11 (15 mai 2007): 1164-1173. doi:10.1097/BRS.0b013e318053ec35.

L

- La Spada, A R, E M Wilson, D B Lubahn, A E Harding, et K H Fischbeck. « Androgen Receptor Gene Mutations in X-linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy ». *Nature* 352, n° 6330 (4 juillet 1991): 77-79. doi:10.1038/352077a0.
- Lagier-Tourenne, C., M. Polymenidou, et D. W. Cleveland. « TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration ». *Human Molecular Genetics* 19, n° R1 (15 avril 2010): R46-R64. doi:10.1093/hmg/ddq137.
- Lagier-Tourenne, Clotilde, et Don W. Cleveland. « Neurodegeneration: An Expansion in ALS Genetics ». *Nature* 466, n° 7310 (26 août 2010): 1052-1053. doi:10.1038/4661052a.
- Lagier-Tourenne, Clotilde, Magdalini Polymenidou, Kasey R. Hutt, Anthony Q. Vu, Michael Baughn, Stephanie C. Huelga, Kevin M. Clutario, et al. « Divergent Roles of ALS-linked Proteins FUS/TLS and TDP-43 Intersect in Processing Long pre-mRNAs ». *Nature Neuroscience* 15, n° 11 (2012): 1488-1497. doi:10.1038/nn.3230.
- Lai, C., X. Lin, J. Chandran, H. Shim, W.-J. Yang, et H. Cai. « The G59S Mutation in p150glued Causes Dysfunction of Dynactin in Mice ». *Journal of Neuroscience* 27, n° 51 (19 décembre 2007): 13982-13990. doi:10.1523/JNEUROSCI.4226-07.2007.
- Lai, D. « The fragile X mental retardation protein interacts with a distinct mRNA nuclear export factor NXF2 ». *RNA* 12, n° 8 (29 juin 2006): 1446-1449. doi:10.1261/rna.94306.
- Lai, Yi, Yongping Yue, et Dongsheng Duan. « Evidence for the Failure of Adeno-associated Virus Serotype 5 to Package a Viral Genome > or = 8.2 Kb ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 1 (janvier 2010): 75-79. doi:10.1038/mt.2009.256.
- Laing, Nigel G. « Genetics of neuromuscular disorders ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 49, n° 2 (avril 2012): 33-48. doi:10.3109/10408363.2012.658906.
- LaMonte, Bernadette H, Karen E Wallace, Beth A Holloway, Spencer S Shelly, Jennifer Ascaño, Mariko Tokito, Thomas Van Winkle, David S Howland, et Erika L.F Holzbaur. « Disruption of Dynein/Dynactin Inhibits Axonal Transport in Motor Neurons Causing Late-Onset Progressive Degeneration ». *Neuron* 34, n° 5 (30 mai 2002): 715-727. doi:10.1016/S0896-6273(02)00696-7.
- Lanson Jr., Nicholas A., et Udai Bhan Pandey. « FUS-related proteinopathies: Lessons from animal models ». *Brain Research* 1462 (26 juin 2012): 44-60. doi:10.1016/j.brainres.2012.01.039.

- Laustsen, P G, T E Rasmussen, K Petersen, S Pedraza-Diaz, S K Moestrup, J Gliemann, L Sottrup-Jensen, et T Kristensen. « The Complete Amino Acid Sequence of Human Placental Oxytocinase ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1352, n° 1 (2 mai 1997): 1-7.
- Lawlor, Patricia A, Ross J Bland, Alexandre Mouravlev, Deborah Young, et Matthew J During. « Efficient Gene Delivery and Selective Transduction of Glial Cells in the Mammalian Brain by AAV Serotypes Isolated from Nonhuman Primates ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17, n° 10 (octobre 2009): 1692-1702. doi:10.1038/mt.2009.170.
- Le Guiner, Caroline, Phillipe Moullier, et Valder R Arruda. « Biodistribution and shedding of AAV vectors ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 807 (2011): 339-359. doi:10.1007/978-1-61779-370-7_15.
- Le, Thanh T, Lan T Pham, Matthew E R Butchbach, Honglai L Zhang, Umrao R Monani, Daniel D Coover, Tatiana O Gavrilina, Lei Xing, Gary J Bassell, et Arthur H M Burghes. « SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN ». *Human Molecular Genetics* 14, n° 6 (15 mars 2005): 845-857. doi:10.1093/hmg/ddi078.
- Lee, Ni-Chung, Darin J Falk, Barry J Byrne, Thomas J Conlon, Nathalie Clement, Stacy Porvasnik, Marda L Jorgensen, et al. « An acidic oligopeptide displayed on AAV2 improves axial muscle tropism after systemic delivery ». *Genetic Vaccines and Therapy* 10, n° 1 (2012): 3. doi:10.1186/1479-0556-10-3.
- Lee, Tong Ihn, Richard G. Jenner, Laurie A. Boyer, Matthew G. Guenther, Stuart S. Levine, Roshan M. Kumar, Brett Chevalier, et al. « Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell* 125, n° 2 (21 avril 2006): 301-313. doi:10.1016/j.cell.2006.02.043.
- Lefebvre, Suzie, Lydie Bürglen, Sophie Reboullet, Olivier Clermont, Philippe Burlet, Louis Viollet, Bernard Benichou, et al. « Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene ». *Cell* 80, n° 1 (13 janvier 1995): 155-165. doi:10.1016/0092-8674(95)90460-3.
- Léger, Adrien, Caroline Le Guiner, Michael L. Nickerson, Kate McGee Im, Nicolas Ferry, Philippe Moullier, Richard O. Snyder, et Magalie Penaud-Budloo. « Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Transgene Expression Is Independent of DNA Methylation in Primate Liver and Skeletal Muscle ». *PLoS ONE* 6, n° 6 (8 juin 2011). doi:10.1371/journal.pone.0020881.
- Leitner, M L, D C Molliver, P A Osborne, R Vejsada, J P Golden, P A Lampe, A C Kato, J Milbrandt, et E M Johnson Jr. « Analysis of the Retrograde Transport of Glial Cell Line-

- derived Neurotrophic Factor (GDNF), Neurturin, and Persephin Suggests That in Vivo Signaling for the GDNF Family Is GFRalpha Coreceptor-specific ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, n° 21 (1 novembre 1999): 9322-9331.
- Leung, Cary H, Michele A Kliem, Brenten L Heeke, Scott W J McPhee, Thais Federici, Brooke R Snyder, et Nicholas M Boulis. « Assessment of Hippocampal Adeno-associated Viral Vector Gene Delivery via Frameless Stereotaxis in a Nonhuman Primate ». *Stereotactic and Functional Neurosurgery* 89, n° 5 (2011): 275-285. doi:10.1159/000328265.
- Levites, Yona, Karen Jansen, Lisa A Smithson, Rachel Dakin, Vallie M Holloway, Pritam Das, et Todd E Golde. « Intracranial Adeno-associated Virus-mediated Delivery of Anti-pan Amyloid Beta, Amyloid Beta40, and Amyloid Beta42 Single-chain Variable Fragments Attenuates Plaque Pathology in Amyloid Precursor Protein Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, n° 46 (15 novembre 2006): 11923-11928. doi:10.1523/JNEUROSCI.2795-06.2006.
- Lewelt, Aga, Kristin J. Krosschell, Charles Scott, Ai Sakonju, John T. Kissel, Thomas O. Crawford, Gyula Acsadi, et al. « Compound muscle action potential and motor function in children with spinal muscular atrophy ». *Muscle & Nerve* 42, n° 5 (novembre 2010): 703-708. doi:10.1002/mus.21838.
- Li, J, D Dressman, Y P Tsao, A Sakamoto, E P Hoffman, et X Xiao. « rAAV Vector-mediated Sarcoglycan Gene Transfer in a Hamster Model for Limb Girdle Muscular Dystrophy ». *Gene Therapy* 6, n° 1 (janvier 1999): 74-82. doi:10.1038/sj.gt.3300830.
- Li, Mingjie, Nada Husic, Ying Lin, Heather Christensen, Ibrahim Malik, Sally McIver, Christine M LaPash Daniels, et al. « Optimal Promoter Usage for Lentiviral Vector-mediated Transduction of Cultured Central Nervous System Cells ». *Journal of Neuroscience Methods* 189, n° 1 (30 mai 2010): 56-64. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.03.019.
- Li, Q., N. Y. Spencer, N. J. Pantazis, et J. F. Engelhardt. « Alsln and SOD1G93A Proteins Regulate Endosomal Reactive Oxygen Species Production by Glial Cells and Proinflammatory Pathways Responsible for Neurotoxicity ». *Journal of Biological Chemistry* 286, n° 46 (20 septembre 2011): 40151-40162. doi:10.1074/jbc.M111.279711.
- Li, Wuping, Aravind Asokan, Zhijian Wu, Terry Van Dyke, Nina DiPrimio, Jarrod S Johnson, Lakshmanan Govindaswamy, et al. « Engineering and Selection of Shuffled AAV Genomes: a New Strategy for Producing Targeted Biological Nanoparticles ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, n° 7 (juillet 2008): 1252-1260. doi:10.1038/mt.2008.100.

- Lin, En-Ju D, Cristina Richichi, Deborah Young, Kristin Baer, Annamaria Vezzani, et Matthew J During. « Recombinant AAV-mediated Expression of Galanin in Rat Hippocampus Suppresses Seizure Development ». *The European Journal of Neuroscience* 18, n° 7 (octobre 2003): 2087-2092.
- Liu, Q, et G Dreyfuss. « A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein ». *The EMBO journal* 15, n° 14 (15 juillet 1996): 3555-3565.
- Lloyd, Thomas E, et J Paul Taylor. « Flightless Flies: Drosophila Models of Neuromuscular Disease ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1184 (janvier 2010): e1-20.
- Lo, W D, G Qu, T J Sferra, R Clark, R Chen, et P R Johnson. « Adeno-associated Virus-mediated Gene Transfer to the Brain: Duration and Modulation of Expression ». *Human Gene Therapy* 10, n° 2 (20 janvier 1999): 201-213. doi:10.1089/10430349950018995.
- Lorenzoni, Paulo José, Rosana Herminia Scola, Cláudia Suemi Kamoï Kay, et Lineu Cesar Werneck. « Congenital Myasthenic Syndrome: A Brief Review ». *Pediatric Neurology* 46, n° 3 (mars 2012): 141-148. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2011.12.001.
- Lorson, C L, J Strasswimmer, J M Yao, J D Baleja, E Hahnen, B Wirth, T Le, A H Burghes, et E J Androphy. « SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity ». *Nature genetics* 19, n° 1 (mai 1998): 63-66. doi:10.1038/ng0598-63.
- Lorson, Monique A, Lee D Spate, Randall S Prather, et Christian L Lorson. « Identification and Characterization of the Porcine (*Sus Scrofa*) Survival Motor Neuron (SMN1) Gene: An Animal Model for Therapeutic Studies ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237, n° 8 (août 2008): 2268-2278. doi:10.1002/dvdy.21642.
- Lorson, Monique A, Lee D Spate, Melissa S Samuel, Clifton N Murphy, Christian L Lorson, Randall S Prather, et Kevin D Wells. « Disruption of the Survival Motor Neuron (SMN) Gene in Pigs Using ssDNA ». *Transgenic Research* 20, n° 6 (décembre 2011): 1293-1304. doi:10.1007/s11248-011-9496-8.
- Lowenstein, Pedro R. « Crossing the Rubicon ». *Nature Biotechnology* 27, n° 1 (janvier 2009): 42-44. doi:10.1038/nbt0109-42.
- Lowery, Rebecca L, Yu Zhang, Emily A Kelly, Cassandra E Lamantia, Brandon K Harvey, et Ania K Majewska. « Rapid, Long-term Labeling of Cells in the Developing and Adult Rodent Visual Cortex Using Double-stranded Adeno-associated Viral Vectors ». *Developmental Neurobiology* 69, n° 10 (1 septembre 2009): 674-688. doi:10.1002/dneu.20735.
- Lu, Yan-Yan, Li-Jun Wang, Shin-ichi Muramatsu, Kunihiro Ikeguchi, Ken-ichi Fujimoto, Takashi Okada, Hiroaki Mizukami, et al. « Intramuscular Injection of AAV-GDNF Results in

Sustained Expression of Transgenic GDNF, and Its Delivery to Spinal Motoneurons by Retrograde Transport ». *Neuroscience Research* 45, n° 1 (janvier 2003): 33-40.

Lukacs, Gergely L., Peter Haggie, Olivier Seksek, D. Lechardeur, Neal Freedman, et A. S. Verkman. « Size-dependent DNA Mobility in Cytoplasm and Nucleus ». *Journal of Biological Chemistry* 275, n° 3 (21 janvier 2000): 1625-1629. doi:10.1074/jbc.275.3.1625.

M

Maheshri, Narendra, James T Koerber, Brian K Kaspar, et David V Schaffer. « Directed Evolution of Adeno-associated Virus Yields Enhanced Gene Delivery Vectors ». *Nature Biotechnology* 24, n° 2 (février 2006): 198-204. doi:10.1038/nbt1182.

Mai J.K., Paxinos G., 1997. Atlas Of Human Brain, Academic Press.

Mandel, R J, R O Snyder, et S E Leff. « Recombinant Adeno-associated Viral Vector-mediated Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Gene Transfer Protects Nigral Dopamine Neurons after Onset of Progressive Degeneration in a Rat Model of Parkinson's Disease ». *Experimental Neurology* 160, n° 1 (novembre 1999): 205-214. doi:10.1006/exnr.1999.7203.

Mandel, Ronald J. « CERE-110, an Adeno-associated Virus-based Gene Delivery Vector Expressing Human Nerve Growth Factor for the Treatment of Alzheimer's Disease ». *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 12, n° 2 (avril 2010): 240-247.

Manservigi, Roberto, Rafaela Argnani, et Peggy Marconi. « HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy ». *The Open Virology Journal* 4 (2010): 123-156. doi:10.2174/1874357901004030123.

Mao, Yaopan, Binnaz Kucuk, et Kenneth D Irvine. « Drosophila lowfat, a novel modulator of Fat signaling ». *Development (Cambridge, England)* 136, n° 19 (octobre 2009): 3223-3233. doi:10.1242/dev.036152.

Mao, Yuntao S., Bin Zhang, et David L. Spector. « Biogenesis and function of nuclear bodies ». *Trends in Genetics* 27, n° 8 (août 2011): 295-306. doi:10.1016/j.tig.2011.05.006.

Marieb E.N., 1999. Anatomie et physiologie humaines, 2nd ed. ERPI.

Markowitsch, H J, et M Pritzel. « A Stereotaxic Atlas of the Prefrontal Cortex of the Cat ». *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 37, n° 2 (1977): 63-81.

Markowitz, Jennifer A., Priyamvada Singh, et Basil T. Darras. « Spinal Muscular Atrophy: A Clinical and Research Update ». *Pediatric Neurology* 46, n° 1 (janvier 2012): 1-12. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2011.09.001.

Marks, William J, Jr, Jill L Ostrem, Leonard Verhagen, Philip A Starr, Paul S Larson, Roy Ae Bakay, Robin Taylor, et al. « Safety and Tolerability of Intraputaminial Delivery of CERE-120

- (adeno-associated Virus Serotype 2-neurturin) to Patients with Idiopathic Parkinson's Disease: An Open-label, Phase I Trial ». *Lancet Neurology* 7, n° 5 (mai 2008): 400-408. doi:10.1016/S1474-4422(08)70065-6.
- Martin, Natalia, Jean Jaubert, Pierre Gounon, Eduardo Salido, Georg Haase, Marek Szatanik, et Jean-Louis Guénet. « A Missense Mutation in Tbc1a Causes Progressive Motor Neuronopathy in Mice ». *Nature Genetics* 32, n° 3 (novembre 2002): 443-447. doi:10.1038/ng1016.
- Martínez-Hernández, Rebeca, Carolina Soler-Botija, Eva Also, Laura Alias, Lidia Caselles, Ignasi Gich, Sara Bernal, et Eduardo F Tizzano. « The Developmental Pattern of Myotubes in Spinal Muscular Atrophy Indicates Prenatal Delay of Muscle Maturation ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68, n° 5 (mai 2009): 474-481. doi:10.1097/NEN.0b013e3181a10ea1.
- Masamizu, Y, T Okada, K Kawasaki, H Ishibashi, S Yuasa, S Takeda, I Hasegawa, et K Nakahara. « Local and Retrograde Gene Transfer into Primate Neuronal Pathways via Adeno-associated Virus Serotype 8 and 9 ». *Neuroscience* 193 (13 octobre 2011): 249-258. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.080.
- Masamizu, Yoshito, Takashi Okada, Hidetoshi Ishibashi, Shin'ichi Takeda, Shigeki Yuasa, et Kiyoshi Nakahara. « Efficient Gene Transfer into Neurons in Monkey Brain by Adeno-associated Virus 8 ». *Neuroreport* 21, n° 6 (21 avril 2010): 447-451. doi:10.1097/WNR.0b013e3181833ba0.
- Masu, Yasuo, Eckhard Wolf, Bettina Holtmann, Michael Sendtner, Gottfried Brem, et Hans Thoenen. « Disruption of the CNTF Gene Results in Motor Neuron Degeneration ». , *Published Online: 02 September 1993; | Doi:10.1038/365027a0* 365, n° 6441 (2 septembre 1993): 27-32. doi:10.1038/365027a0.
- Matsushita, M. « Projections from the Upper Lumbar Cord to the Cerebellar Nuclei in the Rat, Studied by Anterograde Axonal Tracing ». *The Journal of Comparative Neurology* 412, n° 4 (4 octobre 1999): 633-648.
- Matsushita, M, et X Gao. « Projections from the Thoracic Cord to the Cerebellar Nuclei in the Rat, Studied by Anterograde Axonal Tracing ». *The Journal of Comparative Neurology* 386, n° 3 (29 septembre 1997): 409-421.
- Matsuzaki, Hideo, Michio Tamatani, Atsushi Yamaguchi, Kazuhiko Namikawa, Hiroshi Kiyama, Michael P. Vitek, Noriaki Mitsuda, et Masaya Tohyama. « Vascular Endothelial Growth Factor Rescues Hippocampal Neurons from Glutamate-induced Toxicity: Signal Transduction Cascades ». *The FASEB Journal* (12 mars 2001). doi:10.1096/fj.00-0495fje.

- Mattar, C N, S N Waddington, A Biswas, N Johana, X W Ng, A S Fisk, N M Fisk, et al.
« Systemic Delivery of scAAV9 in Fetal Macaques Facilitates Neuronal Transduction of the Central and Peripheral Nervous Systems ». *Gene Therapy* 20, n° 1 (janvier 2013): 69-83.
doi:10.1038/gt.2011.216.
- McCarty, D M, P E Monahan, et R J Samulski. « Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis ». *Gene Therapy* 8, n° 16 (août 2001): 1248-1254. doi:10.1038/sj.gt.3301514.
- McCarty, D. M., H. Fu, P. E. Monahan, C. E. Toulson, P. Naik, et R. J. Samulski. « Adeno-associated Virus Terminal Repeat (TR) Mutant Generates Self-complementary Vectors to Overcome the Rate-limiting Step to Transduction in Vivo ». *Gene Therapy* 10, n° 26 (2003): 2112-2118. doi:10.1038/sj.gt.3302134.
- McCown, T J, X Xiao, J Li, G R Breese, et R J Samulski. « Differential and Persistent Expression Patterns of CNS Gene Transfer by an Adeno-associated Virus (AAV) Vector ». *Brain Research* 713, n° 1-2 (25 mars 1996): 99-107.
- McGovern, Vicki L, Tatiana O Gavrilina, Christine E Beattie, et Arthur H M Burghes.
« Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse ». *Human Molecular Genetics* 17, n° 18 (15 septembre 2008): 2900-2909. doi:10.1093/hmg/ddn189.
- McManamny, Patrick, Hun S. Chy, David I. Finkelstein, Rebecca G. Craythorn, Peter J. Crack, Ismail Kola, Surindar S. Cheema, et al. « A Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy ». *Human Molecular Genetics* 11, n° 18 (9 janvier 2002): 2103-2111.
doi:10.1093/hmg/11.18.2103.
- McPhee, S W J, C G Janson, C Li, R J Samulski, A S Camp, J Francis, D Shera, et al. « Immune Responses to AAV in a Phase I Study for Canavan Disease ». *The Journal of Gene Medicine* 8, n° 5 (mai 2006): 577-588. doi:10.1002/jgm.885.
- Melki, J, S Abdelhak, P Sheth, M F Bachelot, P Burlet, A Marcadet, J Aicardi, A Barois, J P Carriere, et M Fardeau. « Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q ». *Nature* 344, n° 6268 (19 avril 1990): 767-768. doi:10.1038/344767a0.
- Menezes, Manoj P, et Kathryn N North. « Inherited Neuromuscular Disorders: Pathway to Diagnosis ». *Journal of Paediatrics and Child Health* 48, n° 6 (2012): 458-465.
doi:10.1111/j.1440-1754.2011.02210.x.
- Mentis, George Z., Dvir Blivis, Wenfang Liu, Estelle Drobac, Melissa E. Crowder, Lingling Kong, Francisco J. Alvarez, Charlotte J. Sumner, et Michael J. O'Donovan. « Early Functional Impairment of Sensory-Motor Connectivity in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy ». *Neuron* 69, n° 3 (février 2011): 453-467. doi:10.1016/j.neuron.2010.12.032.

- Michelfelder, Stefan, et Martin Trepel. « Adeno-associated Viral Vectors and Their Redirection to Cell-type Specific Receptors ». *Advances in Genetics* 67 (2009): 29-60. doi:10.1016/S0065-2660(09)67002-4.
- Miguel-Aliaga, I, Y B Chan, K E Davies, et M van den Heuvel. « Disruption of SMN Function by Ectopic Expression of the Human SMN Gene in Drosophila ». *FEBS Letters* 486, n° 2 (8 décembre 2000): 99-102.
- Miller, Daniel G., Elizabeth A. Rutledge, et David W. Russell. « Chromosomal Effects of Adeno-associated Virus Vector Integration ». *Nature Genetics* 30, n° 2 (22 janvier 2002): 147-148. doi:10.1038/ng824.
- Miller, Daniel G., Grant D. Trobridge, Lisa M. Petek, Michael A. Jacobs, Rajinder Kaul, et David W. Russell. « Large-Scale Analysis of Adeno-Associated Virus Vector Integration Sites in Normal Human Cells ». *Journal of Virology* 79, n° 17 (septembre 2005): 11434-11442. doi:10.1128/JVI.79.17.11434-11442.2005.
- Miyake, Noriko, Koichi Miyake, Motoko Yamamoto, Yukihiro Hirai, et Takashi Shimada. « Global Gene Transfer into the CNS Across the BBB after Neonatal Systemic Delivery of Single-stranded AAV Vectors ». *Brain Research* 1389 (10 mai 2011): 19-26. doi:10.1016/j.brainres.2011.03.014.
- Moeller, Carsten, Murat B Yaylaoglu, Gonzalo Alvarez-Bolado, Christina Thaller, et Gregor Eichele. « Murine Lix1, a novel marker for substantia nigra, cortical layer 5, and hindbrain structures ». *Brain Research. Gene Expression Patterns* 1, n° 3-4 (octobre 2002): 199-203.
- Mohammed, H O, J F Cummings, T J Divers, B Valentine, A de Lahunta, B Summers, B R Farrow, K Trembicki-Graves, et A Mauskopf. « Risk Factors Associated with Equine Motor Neuron Disease: a Possible Model for Human MND ». *Neurology* 43, n° 5 (mai 1993): 966-971.
- Mohammed, Hussni O, Thomas J Divers, Brian A Summers, et Alexander de Lahunta. « Vitamin E Deficiency and Risk of Equine Motor Neuron Disease ». *Acta Veterinaria Scandinavica* 49 (2007): 17. doi:10.1186/1751-0147-49-17.
- Monani, Umrao R., Michael Sendtner, Daniel D. Covert, D. William Parsons, Catia Andreassi, Thanh T. Le, Sibylle Jablonka, et al. « The Human Centromeric Survival Motor Neuron Gene (SMN2) Rescues Embryonic Lethality in Smn^{-/-} Mice and Results in a Mouse with Spinal Muscular Atrophy ». *Human Molecular Genetics* 9, n° 3 (2 décembre 2000): 333-339. doi:10.1093/hmg/9.3.333.
- Morfini, Gerardo A., Matthew Burns, Lester I. Binder, Nicholas M. Kanaan, Nichole LaPointe, Daryl A. Bosco, Robert H. Brown, et al. « Axonal Transport Defects in Neurodegenerative

Diseases ». *The Journal of Neuroscience* 29, n° 41 (14 octobre 2009): 12776-12786.
doi:10.1523/JNEUROSCI.3463-09.2009.

Mori, Seiichiro, Lina Wang, Takamasa Takeuchi, et Tadahito Kanda. « Two Novel Adeno-associated Viruses from Cynomolgus Monkey: Pseudotyping Characterization of Capsid Protein ». *Virology* 330, n° 2 (20 décembre 2004): 375-383. doi:10.1016/j.virol.2004.10.012.

Müller, Oliver J, Felix Kaul, Matthew D Weitzman, Renata Pasqualini, Wadih Arap, Jürgen A Kleinschmidt, et Martin Trepel. « Random Peptide Libraries Displayed on Adeno-associated Virus to Select for Targeted Gene Therapy Vectors ». *Nature Biotechnology* 21, n° 9 (septembre 2003): 1040-1046. doi:10.1038/nbt856.

Murakami, T., S.-P. Yang, L. Xie, T. Kawano, D. Fu, A. Mukai, C. Bohm, et al. « ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism ». *Human Molecular Genetics* 21, n° 1 (23 septembre 2011): 1-9. doi:10.1093/hmg/ddr417.

Murray, L M, K Talbot, et T H Gillingwater. « Review: neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy ». *Neuropathology and applied neurobiology* 36, n° 2 (avril 2010): 133-156. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01061.x.

N

Nagai, Makiko, Masashi Aoki, Ichiro Miyoshi, Masaaki Kato, Piera Pasinelli, Noriyuki Kasai, Robert H. Brown, et Yasuto Itoyama. « Rats Expressing Human Cytosolic Copper–Zinc Superoxide Dismutase Transgenes with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Associated Mutations Develop Motor Neuron Disease ». *The Journal of Neuroscience* 21, n° 23 (12 janvier 2001): 9246-9254.

Nam, Hyun-Joo, Brittney L. Gurda, Robert McKenna, Mark Potter, Barry Byrne, Maxim Salganik, Nicholas Muzyczka, et Mavis Agbandje-McKenna. « Structural Studies of Adeno-Associated Virus Serotype 8 Capsid Transitions Associated with Endosomal Trafficking ▽ ». *Journal of Virology* 85, n° 22 (novembre 2011): 11791-11799. doi:10.1128/JVI.05305-11.

Nandedkar, Sanjeev D., Paul E. Barkhaus, et Erik V. Stålberg. « Motor Unit Number Index (MUNIX): Principle, Method, and Findings in Healthy Subjects and in Patients with Motor Neuron Disease ». *Muscle & Nerve* 42, n° 5 (2010): 798–807. doi:10.1002/mus.21824.

Nardo, Giovanni, Silvia Pozzi, Mauro Pignataro, Eliana Lauranzano, Giorgia Spano, Silvia Garbelli, Stefania Mantovani, et al. « Amyotrophic Lateral Sclerosis Multiprotein Biomarkers

- in Peripheral Blood Mononuclear Cells ». Édité par Harish Pant. *PLoS ONE* 6, n° 10 (5 octobre 2011): e25545. doi:10.1371/journal.pone.0025545.
- Nathwani, Amit C, Cecilia Rosales, Jenny McIntosh, Ghasem Rastegarlar, Devhrut Nathwani, Deepak Raj, Sushmita Nawathe, et al. « Long-term Safety and Efficacy Following Systemic Administration of a Self-complementary AAV Vector Encoding Human FIX Pseudotyped With Serotype 5 and 8 Capsid Proteins ». *Molecular Therapy* 19, n° 5 (18 janvier 2011): 876-885. doi:10.1038/mt.2010.274.
- Netter F.H., 1999. Atlas d'anatomie humaine, 2nd ed. Maloine.
- Neumann, Manuela, Deepak M. Sampathu, Linda K. Kwong, Adam C. Truax, Matthew C. Micsenyi, Thomas T. Chou, Jennifer Bruce, et al. « Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Science* 314, n° 5796 (10 juin 2006): 130-133. doi:10.1126/science.1134108.
- Newsom-Davis, J. « The emerging diversity of neuromuscular junction disorders ». *Acta Myologica* 26, n° 1 (juillet 2007): 5.
- Nicoletti, J N, S K Shah, D P McCloskey, J H Goodman, A Elkady, H Atassi, D Hylton, J S Rudge, H E Scharfman, et S D Croll. « Vascular Endothelial Growth Factor Is Up-regulated after Status Epilepticus and Protects Against Seizure-induced Neuronal Loss in Hippocampus ». *Neuroscience* 151, n° 1 (2 janvier 2008): 232-241. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.09.083.
- Nishimune. « Molecular Mechanism of Active Zone Organization at Vertebrate Neuromuscular Junctions - Springer ». Consulté le 16 novembre 2012. <http://link.springer.com.gate2.inist.fr/article/10.1007/s12035-011-8216-y/fulltext.html>.
- Noe, F, V Vaghi, C Balducci, H Fitzsimons, R Bland, D Zardoni, G Sperk, M Carli, M J During, et A Vezzani. « Anticonvulsant Effects and Behavioural Outcomes of rAAV Serotype 1 Vector-mediated Neuropeptide Y Overexpression in Rat Hippocampus ». *Gene Therapy* 17, n° 5 (mai 2010): 643-652. doi:10.1038/gt.2010.23.
- Noè, Francesco, Allan-Hermann Pool, Jari Nissinen, Marco Gobbi, Ross Bland, Massimo Rizzi, Claudia Balducci, et al. « Neuropeptide Y Gene Therapy Decreases Chronic Spontaneous Seizures in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy ». *Brain: a Journal of Neurology* 131, n° Pt 6 (juin 2008): 1506-1515. doi:10.1093/brain/awn079.
- Nonnenmacher, Mathieu, et Thomas Weber. « Adeno-Associated Virus 2 Infection Requires Endocytosis through the CLIC/GEEC Pathway ». *Cell Host & Microbe* 10, n° 6 (15 décembre 2011): 563-576. doi:10.1016/j.chom.2011.10.014.

Nony, Pascale, Gilliane Chadeuf, Jacques Tessier, Philippe Moullier, et Anna Salvetti. « Evidence for Packaging of rep-cap Sequences into Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Capsids in the Absence of Inverted Terminal Repeats: a Model for Generation of rep-Positive AAV Particles ». *Journal of Virology* 77, n° 1 (janvier 2003): 776-781. doi:10.1128/JVI.77.1.776-781.2003.

Nowrouzi, Ali, Magalie Penaud-Budloo, Christine Kaepfel, Uwe Appelt, Caroline Le Guiner, Philippe Moullier, Christof von Kalle, Richard O. Snyder, et Manfred Schmidt. « Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver ». *Molecular Therapy* 20, n° 6 (2012): 1177-1186. doi:10.1038/mt.2012.47.

O

Oosthuysen, B, L Moons, E Storkebaum, H Beck, D Nuyens, K Brusselmans, J Van Dorpe, et al. « Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration ». *Nature Genetics* 28, n° 2 (juin 2001): 131-138. doi:10.1038/88842.

P

Padua, L., G. Liotta, A. Di Pasquale, G. Granata, C. Pazzaglia, P. Caliandro, et C. Martinoli. « Contribution of Ultrasound in the Assessment of Nerve Diseases ». *European Journal of Neurology* 19, n° 1 (2012): 47-54. doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03421.x.

Palazzi X., 2011. *The Beagle Brain In Stereotaxic Coordinates*, Springer.

Palazzolo, Isabella, Alessandra Gliozzi, Paola Rusmini, Daniela Sau, Valeria Crippa, Francesca Simonini, Elisa Onesto, Elena Bolzoni, et Angelo Poletti. « The role of the polyglutamine tract in androgen receptor ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108, n° 3-5 (février 2008): 245-253. doi:10.1016/j.jsbmb.2007.09.016.

Parkinson, N J, D Baumer, A Rose-Morris, et K Talbot. « Candidate Screening of the Bovine and Feline Spinal Muscular Atrophy Genes Reveals No Evidence for Involvement in Human Motor Neuron Disorders ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 18, n° 5 (mai 2008): 394-397. doi:10.1016/j.nmd.2008.03.003.

Parra, Juan, Rebeca Martínez-Hernández, Eva Also-Rallo, Laura Alias, María Jesús Barceló, María Amenedo, Carmen Medina, et al. « Ultrasound evaluation of fetal movements in pregnancies at risk for severe spinal muscular atrophy ». *Neuromuscular Disorders* 21, n° 2 (février 2011): 97-101. doi:10.1016/j.nmd.2010.09.010.

- Passini, M A, et J H Wolfe. « Widespread Gene Delivery and Structure-specific Patterns of Expression in the Brain after Intraventricular Injections of Neonatal Mice with an Adeno-associated Virus Vector ». *Journal of Virology* 75, n° 24 (décembre 2001): 12382-12392. doi:10.1128/JVI.75.24.12382-12392.2001.
- Passini, Marco A, Shannon L Macauley, Michael R Huff, Tatyana V Taksir, Jie Bu, I-Huan Wu, Peter A Piepenhagen, et al. « AAV Vector-mediated Correction of Brain Pathology in a Mouse Model of Niemann-Pick A Disease ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 11, n° 5 (mai 2005): 754-762. doi:10.1016/j.ymthe.2005.01.011.
- Passini, Marco A, Deborah J Watson, Charles H Vite, Daniel J Landsburg, Alyson L Feigenbaum, et John H Wolfe. « Intraventricular Brain Injection of Adeno-associated Virus Type 1 (AAV1) in Neonatal Mice Results in Complementary Patterns of Neuronal Transduction to AAV2 and Total Long-term Correction of Storage Lesions in the Brains of Beta-glucuronidase-deficient Mice ». *Journal of Virology* 77, n° 12 (juin 2003): 7034-7040.
- Passini, Marco A., Jie Bu, Eric M. Roskelley, Amy M. Richards, S. Pablo Sardi, Catherine R. O’Riordan, Katherine W. Klinger, Lamya S. Shihabuddin, et Seng H. Cheng. « CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy ». *Journal of Clinical Investigation* 120, n° 4 (1 avril 2010): 1253-1264. doi:10.1172/JCI41615.
- Paxinos G., Watson C., 1986. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, San Diego Academic Press.
- Paxinos G., Huang X.F., Petrides M., Toga A., 2008. *The Rhesus Monkey Brain In Stereotaxic Coordinates*, Academic Press.
- Pellizzoni, Livio, Naoyuki Kataoka, Bernard Charroux, et Gideon Dreyfuss. « A Novel Function for SMN, the Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, in Pre-mRNA Splicing ». *Cell* 95, n° 5 (25 novembre 1998): 615-624. doi:10.1016/S0092-8674(00)81632-3.
- Penaud-Budloo, Magalie, Caroline Le Guiner, Ali Nowrouzi, Alice Toromanoff, Yan Chérel, Pierre Chenuaud, Manfred Schmidt, et al. « Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle ». *Journal of Virology* 82, n° 16 (août 2008): 7875-7885. doi:10.1128/JVI.00649-08.
- Pennisi, Elizabeth. « Genomics. ENCODE Project Writes Eulogy for Junk DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 337, n° 6099 (7 septembre 2012): 1159, 1161. doi:10.1126/science.337.6099.1159.

- Pennisi, Elizabeth. « The Tale of the TALEs ». *Science* 338, n° 6113 (14 décembre 2012): 1408-1411. doi:10.1126/science.338.6113.1408.
- Perabo, Luca, Hildegard Büning, David M Kofler, Martin U Ried, Anne Girod, Clemens M Wendtner, Jörg Enssle, et Michael Hallek. « In Vitro Selection of Viral Vectors with Modified Tropism: The Adeno-associated Virus Display ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 8, n° 1 (juillet 2003): 151-157.
- Pereira, D J, D M McCarty, et N Muzyczka. « The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. » *Journal of Virology* 71, n° 2 (février 1997): 1079-1088.
- Peters, Iain R, Dominique Peeters, Chris R Helps, et Michael J Day. « Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies ». *Veterinary immunology and immunopathology* 117, n° 1-2 (15 mai 2007): 55-66. doi:10.1016/j.vetimm.2007.01.011.
- Petruska, Jeffrey C, Brandon Kitay, Vanessa S Boyce, Brian K Kaspar, Damien D Pearse, Fred H Gage, et Lorne M Mendell. « Intramuscular AAV Delivery of NT-3 Alters Synaptic Transmission to Motoneurons in Adult Rats ». *The European Journal of Neuroscience* 32, n° 6 (septembre 2010): 997-1005. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07392.x.
- Pichon, Chantal, Ludvine Billiet, et Patrick Midoux. « Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking ». *Current Opinion in Biotechnology* 21, n° 5 (octobre 2010): 640-645. doi:10.1016/j.copbio.2010.07.003.
- Piguet, Françoise, Dolan Sondhi, Monique Piraud, Françoise Fouquet, Neil R Hackett, Ornella Ahouansou, Marie-Thérèse Vanier, et al. « Correction of Brain Oligodendrocytes by AAVrh.10 Intracerebral Gene Therapy in Metachromatic Leukodystrophy Mice ». *Human Gene Therapy* 23, n° 8 (août 2012): 903-914. doi:10.1089/hum.2012.015.
- Pirozzi, Marinella, Angelo Quattrini, Gennaro Andolfi, Giorgia Dina, Maria Chiara Malaguti, Alberto Auricchio, et Elena I Rugarli. « Intramuscular Viral Delivery of Paraplegin Rescues Peripheral Axonopathy in a Model of Hereditary Spastic Paraplegia ». *The Journal of Clinical Investigation* 116, n° 1 (janvier 2006): 202-208. doi:10.1172/JCI26210.
- Pollay, Michael. « The function and structure of the cerebrospinal fluid outflow system ». *Cerebrospinal Fluid Research* 7, n° 1 (2010): 9. doi:10.1186/1743-8454-7-9.
- Ponting, Christopher P. « Tudor domains in proteins that interact with RNA ». *Trends in Biochemical Sciences* 22, n° 2 (février 1997): 51-52. doi:10.1016/S0968-0004(96)30049-2.
- Popa-Wagner, Ruth, Manvi Porwal, Michael Kann, Matthias Reuss, Marc Weimer, Luise Florin, et Jürgen A. Kleinschmidt. « Impact of VP1-Specific Protein Sequence Motifs on Adeno-

- Associated Virus Type 2 Intracellular Trafficking and Nuclear Entry ». *Journal of Virology* 86, n° 17 (9 janvier 2012): 9163-9174. doi:10.1128/JVI.00282-12.
- Porensky, Paul, et Arthur Burghes. « Antisense Oligonucleotides for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy ». *Human Gene Therapy* (2 avril 2013). doi:10.1089/hum.2012.225.
- Porensky, Paul N, Chalermchai Mitrpant, Vicki L McGovern, Adam K Bevan, Kevin D Foust, Brain K Kaspar, Stephen D Wilton, et Arthur H M Burghes. « A Single Administration of Morpholino Antisense Oligomer Rescues Spinal Muscular Atrophy in Mouse ». *Human Molecular Genetics* 21, n° 7 (1 avril 2012): 1625-1638. doi:10.1093/hmg/ddr600.
- Poulsen, D J, D Standing, K Bullshields, K Spencer, P E Micevych, et A M Babcock. « Overexpression of Hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent Protein Kinase II Improves Spatial Memory ». *Journal of Neuroscience Research* 85, n° 4 (mars 2007): 735-739. doi:10.1002/jnr.21163.
- Pramatarova, Albéna, Janet Laganière, Julie Roussel, Katéri Brisebois, et Guy A. Rouleau. « Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment ». *The Journal of Neuroscience* 21, n° 10 (15 mai 2001): 3369-3374.
- Prasad, R. « Immunoglobulins in Certain CNS Disorders: a Study of CSF Ig Classes G, A, M, D, and E Concentrations ». *American Journal of Clinical Pathology* 83, n° 2 (février 1985): 190-195.
- Prior, Thomas W. « Spinal muscular atrophy: a time for screening ». *Current opinion in pediatrics* 22, n° 6 (décembre 2010): 696-702. doi:10.1097/MOP.0b013e32833f3046.
- Pulicherla, Nagesh, Shen Shen, Swati Yadav, Kari Debbink, Lakshmanan Govindasamy, Mavis Agbandje-McKenna, et Aravind Asokan. « Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19, n° 6 (juin 2011): 1070-1078. doi:10.1038/mt.2011.22.
- Puls, Imke, Catherine Jonnakuty, Bernadette H. LaMonte, Erika L. F. Holzbaur, Mariko Tokito, Eric Mann, Mary Kay Floeter, et al. « Mutant Dynactin in Motor Neuron Disease ». *Nature Genetics* 33, n° 4 (10 mars 2003): 455-456. doi:10.1038/ng1123.
- Pumarola, M, S Añor, N Majó, D Borrás, et I Ferrer. « Spinal Muscular Atrophy in Holstein-Friesian Calves ». *Acta Neuropathologica* 93, n° 2 (février 1997): 178-183.
- Punga, Anna Rostedt, et Markus A Ruegg. « Signaling and aging at the neuromuscular synapse: lessons learnt from neuromuscular diseases ». *Current Opinion in Pharmacology* 12, n° 3 (juin 2012): 340-346. doi:10.1016/j.coph.2012.02.002.

Q

Qiao, C, Z Yuan, J Li, B He, H Zheng, C Mayer, J Li, et X Xiao. « Liver-specific microRNA-122 Target Sequences Incorporated in AAV Vectors Efficiently Inhibits Transgene Expression in the Liver ». *Gene Therapy* 18, n° 4 (avril 2011): 403-410. doi:10.1038/gt.2010.157.

R

Rabinowitz, Joseph E., Fabienne Rolling, Chengwen Li, Hervé Conrath, Weidong Xiao, Xiao Xiao, et R. Jude Samulski. « Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity ». *Journal of Virology* 76, n° 2 (janvier 2002): 791-801. doi:10.1128/JVI.76.2.791-801.2002.

Rahim, Ahad A., Andrew M. S. Wong, Klemens Hoefer, Suzanne M. K. Buckley, Citra N. Mattar, Seng H. Cheng, Jerry K. Y. Chan, Jonathan D. Cooper, et Simon N. Waddington. « Intravenous Administration of AAV2/9 to the Fetal and Neonatal Mouse Leads to Differential Targeting of CNS Cell Types and Extensive Transduction of the Nervous System ». *The FASEB Journal* 25, n° 10 (10 janvier 2011): 3505-3518. doi:10.1096/fj.11-182311.

Rathke-Hartlieb, S, V C Schmidt, H Jockusch, T Schmitt-John, et J W Bartsch. « Spatiotemporal Progression of Neurodegeneration and Glia Activation in the Wobbler Neuropathy of the Mouse ». *Neuroreport* 10, n° 16 (8 novembre 1999): 3411-3416.

Redler, Rachel L, et Nikolay V Dokholyan. « The Complex Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 107 (2012): 215-262. doi:10.1016/B978-0-12-385883-2.00002-3.

Renton, Alan E., Elisa Majounie, Adrian Waite, Javier Simón-Sánchez, Sara Rollinson, J. Raphael Gibbs, Jennifer C. Schymick, et al. « A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD ». *Neuron* 72, n° 2 (octobre 2011): 257-268. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.010.

Rexed, Bror. « A Cytoarchitectonic Atlas of the Spinal Cord in the Cat ». *The Journal of Comparative Neurology* 100, n° 2 (1954): 297–379. doi:10.1002/cne.901000205.

Rich, Mark M, Robert F Waldeck, Linda C Cork, Rita J Balice-Gordon, Robert E W Fyffe, Xueyong Wang, Timothy C Cope, et Martin J Pinter. « Reduced Endplate Currents Underlie Motor Unit Dysfunction in Canine Motor Neuron Disease ». *Journal of Neurophysiology* 88, n° 6 (décembre 2002): 3293-3304. doi:10.1152/jn.00270.2002.

- Richichi, Cristina, En-Ju D Lin, Daniela Stefanin, Daniele Colella, Teresa Ravizza, Giuliano Grignaschi, Pietro Vegliane, Günther Sperk, Matthew J During, et Annamaria Vezzani. « Anticonvulsant and Antiepileptogenic Effects Mediated by Adeno-associated Virus Vector Neuropeptide Y Expression in the Rat Hippocampus ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, n° 12 (24 mars 2004): 3051-3059. doi:10.1523/JNEUROSCI.4056-03.2004.
- Rocheffort, Nathalie L., et Arthur Konnerth. « Dendritic Spines: From Structure to in Vivo Function ». *EMBO Reports* 13, n° 8 (8 janvier 2012): 699-708. doi:10.1038/embor.2012.102.
- Rogers, Derek C., Jo Peters, Joanne E. Martin, Simon Ball, Sharon J. Nicholson, Abi S. Witherden, Majid Hafezparast, et al. « SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice ». *Neuroscience Letters* 306, n° 1-2 (22 juin 2001): 89-92. doi:10.1016/S0304-3940(01)01885-7.
- Roselli, Francesco, et Pico Caroni. « A Circuit Mechanism for Neurodegeneration ». *Cell* 151, n° 2 (12 octobre 2012): 250-252. doi:10.1016/j.cell.2012.09.030.
- Rosen, Daniel R., Teepu Siddique, David Patterson, Denise A. Figlewicz, Peter Sapp, Afif Hentati, Deirdre Donaldson, et al. « Mutations in Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis ». , *Published Online: 04 March 1993*; | *Doi:10.1038/362059a0* 362, n° 6415 (4 mars 1993): 59-62. doi:10.1038/362059a0.
- Rosenfeld, M R, I Bergman, L Schramm, J A Griffin, M G Kaplitt, et P I Meneses. « Adeno-associated Viral Vector Gene Transfer into Leptomeningeal Xenografts ». *Journal of Neuro-oncology* 34, n° 2 (septembre 1997): 139-144.
- Rosenstein, Jeffrey M., Janette M. Krum, et Christiana Ruhrberg. « VEGF in the Nervous System ». *Organogenesis* 6, n° 2 (juin 2010): 107.
- Rossoll, Wilfried, et Gary J Bassell. « Spinal muscular atrophy and a model for survival of motor neuron protein function in axonal ribonucleoprotein complexes ». *Results and problems in cell differentiation* 48 (2009): 289-326. doi:10.1007/400_2009_4.
- Rossoll, Wilfried, Sibylle Jablonka, Catia Andreassi, Ann-Kathrin Kröning, Kathrin Karle, Umrao R Monani, et Michael Sendtner. « Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons ». *The Journal of Cell Biology* 163, n° 4 (24 novembre 2003): 801-812. doi:10.1083/jcb.200304128.
- Rowland, Lewis P. « Primary lateral sclerosis: disease, syndrome, both or neither? » *Journal of the Neurological Sciences* 170, n° 1 (15 novembre 1999): 1-4. doi:10.1016/S0022-510X(99)00183-5.

- Rowland, Lewis P. « Progressive Muscular Atrophy and Other Lower Motor Neuron Syndromes of Adults ». *Muscle & Nerve* 41, n° 2 (2010): 161–165. doi:10.1002/mus.21565.
- Ruitenbergh, Marc J, Bas Blits, Paul A Dijkhuizen, Erik T te Beek, Arne Bakker, Joop J van Heerikhuizen, Chris W Pool, Wim T J Hermens, Gerard J Boer, et Joost Verhaagen. « Adeno-associated Viral Vector-mediated Gene Transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor Reverses Atrophy of Rubrospinal Neurons Following Both Acute and Chronic Spinal Cord Injury ». *Neurobiology of Disease* 15, n° 2 (mars 2004): 394-406. doi:10.1016/j.nbd.2003.11.018.
- Ruitenbergh, Marc J, Ruben Eggers, Gerard J Boer, et Joost Verhaagen. « Adeno-associated Viral Vectors as Agents for Gene Delivery: Application in Disorders and Trauma of the Central Nervous System ». *Methods (San Diego, Calif.)* 28, n° 2 (octobre 2002): 182-194.
- Ryan, Deborah A, Michael A Mastrangelo, Wade C Narrow, Mark A Sullivan, Howard J Federoff, et William J Bowers. « Abeta-directed Single-chain Antibody Delivery via a Serotype-1 AAV Vector Improves Learning Behavior and Pathology in Alzheimer's Disease Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 8 (août 2010): 1471-1481. doi:10.1038/mt.2010.111.

S

- Sadananda, Aparna, et Krishanu Ray. « Neurogenetics of Slow Axonal Transport: From Cells to Animals ». *Journal of Neurogenetics* (27 juillet 2012): 1-7. doi:10.3109/01677063.2012.699564.
- Saito, Kuniaki, Toshinobu Fujiwara, Jun Katahira, Kunio Inoue, et Hiroshi Sakamoto. « TAP/NXF1, the primary mRNA export receptor, specifically interacts with a neuronal RNA-binding protein HuD ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321, n° 2 (20 août 2004): 291-297. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.140.
- Sakka, L, G Coll, et J Chazal. « Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid ». *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* 128, n° 6 (décembre 2011): 309-316. doi:10.1016/j.anorl.2011.03.002.
- Salegio, E A, L Samaranch, A P Kells, G Mittermeyer, W San Sebastian, S Zhou, J Beyer, J Forsayeth, et K S Bankiewicz. « Axonal Transport of Adeno-associated Viral Vectors Is Serotype-dependent ». *Gene Therapy* 20, n° 3 (mars 2013): 348-352. doi:10.1038/gt.2012.27.
- Salveti, Anna, Soizic Orève, Gilliane Chadeuf, David Favre, Yan Cherel, Patrick Champion-Arnaud, Jacques David-Ameline, et Philippe Moullier. « Factors Influencing Recombinant

- Adeno-Associated Virus Production ». *Human Gene Therapy* 9, n° 5 (20 mars 1998): 695-706. doi:10.1089/hum.1998.9.5-695.
- Samaranch, Lluís, Ernesto A Salegio, Waldy San Sebastian, Adrian P Kells, John Bringas, John Forsayeth, et Krystof Bankiewicz. « STRONG CORTICAL AND SPINAL CORD TRANSDUCTION AFTER AAV7 AND AAV9 DELIVERY INTO THE CSF OF NON-HUMAN PRIMATES ». *Human Gene Therapy* (21 mars 2013). doi:10.1089/hum.2013.005.
- Samaranch, Lluís, Ernesto A Salegio, Waldy San Sebastian, Adrian P Kells, Kevin D Foust, John R Bringas, Clementine Lamarre, John Forsayeth, Brian K Kaspar, et Krystof S Bankiewicz. « Adeno-associated Virus Serotype 9 Transduction in the Central Nervous System of Nonhuman Primates ». *Human Gene Therapy* 23, n° 4 (avril 2012): 382-389. doi:10.1089/hum.2011.200.
- Sanlioglu, Salih, Peter K. Benson, Jusan Yang, E. Morrey Atkinson, Thomas Reynolds, et John F. Engelhardt. « Endocytosis and Nuclear Trafficking of Adeno-Associated Virus Type 2 Are Controlled by Rac1 and Phosphatidylinositol-3 Kinase Activation ». *Journal of Virology* 74, n° 19 (octobre 2000): 9184-9196.
- Sareen, Dhruv, Allison D. Ebert, Brittany M. Heins, Jered V. McGivern, Loren Ornelas, et Clive N. Svendsen. « Inhibition of Apoptosis Blocks Human Motor Neuron Cell Death in a Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy ». Édité par Thomas H. Gillingwater. *PLoS ONE* 7, n° 6 (19 juin 2012): e39113. doi:10.1371/journal.pone.0039113.
- Sasongko, Teguh Haryo, Gunadi, Surini Yusoff, Amin Baig Atif, Hayati Fatemeh, Abdulqawee Rani, Marzuki Marini, et al. « Screening of the LIX1 Gene in Japanese and Malaysian Patients with SMA And/or SMA-like Disorder ». *Brain & Development* 32, n° 5 (mai 2010): 385-389. doi:10.1016/j.braindev.2009.06.008.
- Sato, Kota, Nobutoshi Morimoto, Tohru Matsuura, Yasuyuki Ohta, Masatoshi Tsunoda, Yoshio Ikeda, et Koji Abe. « CSF Flow Dynamics in Motor Neuron Disease ». *Neurological Research* 34, n° 5 (juin 2012): 512-517. doi:10.1179/1743132812Y.00000000043.
- Saugier-Veber, P, N Drouot, S Lefebvre, F Charbonnier, E Vial, A Munnich, et T Frébourg. « Detection of heterozygous SMN1 deletions in SMA families using a simple fluorescent multiplex PCR method ». *Journal of medical genetics* 38, n° 4 (avril 2001): 240-243.
- Saunders, Laura R, et Glen N Barber. « The dsRNA Binding Protein Family: Critical Roles, Diverse Cellular Functions ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, n° 9 (juin 2003): 961-983. doi:10.1096/fj.02-0958rev.

- Saunders, Norman R, C Joakim Ek, et Katarzyna M Dziegielewska. « The Neonatal Blood-brain Barrier Is Functionally Effective, and Immaturity Does Not Explain Differential Targeting of AAV9 ». *Nature Biotechnology* 27, n° 9 (septembre 2009): 804-805; author reply 805. doi:10.1038/nbt0909-804.
- Schaeffer, Véronique, Laurence Meyer, Christine Patte-Mensah, et Ayikoe Guy Mensah-Nyagan. « Progress in Dorsal Root Ganglion Neurosteroidogenic Activity: Basic Evidence and Pathophysiological Correlation ». *Progress in Neurobiology* 92, n° 1 (septembre 2010): 33-41. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.04.009.
- Schmalbruch, H, H J Jensen, M Bjaerg, Z Kamieniecka, et L Kurland. « A New Mouse Mutant with Progressive Motor Neuronopathy ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 50, n° 3 (mai 1991): 192-204.
- Schmidt, M., A. Voutetakis, S. Afione, C. Zheng, D. Mandikian, et J. A. Chiorini. « Adeno-Associated Virus Type 12 (AAV12): a Novel AAV Serotype with Sialic Acid- and Heparan Sulfate Proteoglycan-Independent Transduction Activity ». *Journal of Virology* 82, n° 3 (28 novembre 2007): 1399-1406. doi:10.1128/JVI.02012-07.
- Schmitt-John, Thomas, Carsten Drepper, Anke Mußmann, Phillip Hahn, Melanie Kuhlmann, Cora Thiel, Martin Hafner, et al. « Mutation of Vps54 Causes Motor Neuron Disease and Defective Spermiogenesis in the Wobbler Mouse ». *Nature Genetics* 37, n° 11 (11 janvier 2005): 1213-1215. doi:10.1038/ng1661.
- Schrank, Bertold, Rudolf Götz, Jennifer M. Gunnersen, Janice M. Ure, Klaus V. Toyka, Austin G. Smith, et Michael Sendtner. « Inactivation of the Survival Motor Neuron Gene, a Candidate Gene for Human Spinal Muscular Atrophy, Leads to Massive Cell Death in Early Mouse Embryos ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, n° 18 (2 septembre 1997): 9920.
- Schuettrumpf, Joerg, Jian-Hua Liu, Linda B. Couto, Kathakaly Addya, Debra G. B. Leonard, Zhu Zhen, Jürg Summer, et Valder R. Arruda. « Inadvertent Germline Transmission of AAV2 Vector: Findings in a Rabbit Model Correlate with Those in a Human Clinical Trial ». *Molecular Therapy* 13, n° 6 (2006): 1064-1073. doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.002.
- Schwartzkroin, P A. « Role of the Hippocampus in Epilepsy ». *Hippocampus* 4, n° 3 (juin 1994): 239-242. doi:10.1002/hipo.450040302.
- Sevin, C, L Verot, A Benraiss, D Van Dam, D Bonnin, G Nagels, F Fouquet, et al. « Partial Cure of Established Disease in an Animal Model of Metachromatic Leukodystrophy after Intracerebral Adeno-associated Virus-mediated Gene Transfer ». *Gene Therapy* 14, n° 5 (mars 2007): 405-414. doi:10.1038/sj.gt.3302883.

- Sevin, Caroline, Abdellatif Benraiss, Debby Van Dam, Delphine Bonnin, Guy Nagels, Lucie Verot, Ingrid Laurendeau, et al. « Intracerebral Adeno-associated Virus-mediated Gene Transfer in Rapidly Progressive Forms of Metachromatic Leukodystrophy ». *Human Molecular Genetics* 15, n° 1 (1 janvier 2006): 53-64. doi:10.1093/hmg/ddi425.
- Shababi, Monir, Javad Habibi, Lixin Ma, Jacqueline J Glascock, James R Sowers, et Christian L Lorson. « Partial Restoration of Cardio-vascular Defects in a Rescued Severe Model of Spinal Muscular Atrophy ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52, n° 5 (mai 2012): 1074-1082. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.01.005.
- Shafey, Dina, Alex E MacKenzie, et Rashmi Kothary. « Neurodevelopmental Abnormalities in Neurosphere-derived Neural Stem Cells from SMN-depleted Mice ». *Journal of Neuroscience Research* 86, n° 13 (octobre 2008): 2839-2847. doi:10.1002/jnr.21743.
- Shefner, Jeremy M. « Motor unit number estimation in human neurological diseases and animal models ». *Clinical Neurophysiology* 112, n° 6 (juin 2001): 955-964. doi:10.1016/S1388-2457(01)00520-X.
- Shen, L, J Miao, F Yuan, Y Zhao, Y Tang, Y Wang, Y Zhao, et G-Y Yang. « Overexpression of Adiponectin Promotes Focal Angiogenesis in the Mouse Brain Following Middle Cerebral Artery Occlusion ». *Gene Therapy* 20, n° 1 (janvier 2013): 93-101. doi:10.1038/gt.2012.7.
- Shen, Shen, Kelli D Bryant, Junjiang Sun, Sarah M Brown, Andrew Troupes, Nagesh Pulicherla, et Aravind Asokan. « Glycan Binding Avidity Determines the Systemic Fate of Adeno-associated Virus Type 9 ». *Journal of Virology* 86, n° 19 (octobre 2012): 10408-10417. doi:10.1128/JVI.01155-12.
- Shi, Huafang, Nathalie Chamond, Appolinaire Djikeng, Christian Tschudi, et Elisabetta Ullu. « RNA Interference in Trypanosoma Brucei: Role of the N-terminal RGG Domain and the Polyribosome Association of Argonaute ». *The Journal of Biological Chemistry* 284, n° 52 (25 décembre 2009): 36511-36520. doi:10.1074/jbc.M109.073072.
- Shpargel, Karl B, et A Gregory Matera. « Gemin Proteins Are Required for Efficient Assembly of Sm-class Ribonucleoproteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n° 48 (29 novembre 2005): 17372-17377. doi:10.1073/pnas.0508947102.
- Siddiq, Ishita, Eugene Park, Elaine Liu, S Kaye Spratt, Richard Surosky, Gary Lee, Dale Ando, et al. « Treatment of Traumatic Brain Injury Using Zinc-finger Protein Gene Therapy Targeting VEGF-A ». *Journal of Neurotrauma* 29, n° 17 (20 novembre 2012): 2647-2659. doi:10.1089/neu.2012.2444.

- Singer, Mike A., Jeffrey M. Statland, Gil I. Wolfe, et Richard J. Barohn. « Primary Lateral Sclerosis ». *Muscle & Nerve* 35, n° 3 (2007): 291–302. doi:10.1002/mus.20728.
- Skorupa, A F, K J Fisher, J M Wilson, M K Parente, et J H Wolfe. « Sustained Production of Beta-glucuronidase from Localized Sites after AAV Vector Gene Transfer Results in Widespread Distribution of Enzyme and Reversal of Lysosomal Storage Lesions in a Large Volume of Brain in Mucopolysaccharidosis VII Mice ». *Experimental Neurology* 160, n° 1 (novembre 1999): 17-27. doi:10.1006/exnr.1999.7176.
- Sleeman, Judith E, Laura Trinkle-Mulcahy, Alan R Prescott, Stephen C Ogg, et Angus I Lamond. « Cajal Body Proteins SMN and Coilin Show Differential Dynamic Behaviour in Vivo ». *Journal of Cell Science* 116, n° Pt 10 (15 mai 2003): 2039-2050. doi:10.1242/jcs.00400.
- Sleigh, James N, Thomas H Gillingwater, et Kevin Talbot. « The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy ». *Disease Models & Mechanisms* 4, n° 4 (août 2011): 457-467. doi:10.1242/dmm.007245.
- Snyder, Brooke R., Steven J. Gray, Eric T. Quach, Jeremiah W. Huang, Cary H. Leung, R. Jude Samulski, Nicholas M. Boulis, et Thais Federici. « Comparison of Adeno-Associated Viral Vector Serotypes for Spinal Cord and Motor Neuron Gene Delivery ». *Human Gene Therapy* 22, n° 9 (septembre 2011): 1129-1135. doi:10.1089/hum.2011.008.
- Sondell, Mariann, Göran Lundborg, et Martin Kanje. « Vascular Endothelial Growth Factor Has Neurotrophic Activity and Stimulates Axonal Outgrowth, Enhancing Cell Survival and Schwann Cell Proliferation in the Peripheral Nervous System ». *The Journal of Neuroscience* 19, n° 14 (15 juillet 1999): 5731-5740.
- Sondhi, Dolan, Neil R Hackett, Daniel A Peterson, Jamie Stratton, Michael Baad, Kelly M Travis, James M Wilson, et Ronald G Crystal. « Enhanced Survival of the LINCL Mouse Following CLN2 Gene Transfer Using the Rh.10 Rhesus Macaque-derived Adeno-associated Virus Vector ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15, n° 3 (mars 2007): 481-491. doi:10.1038/sj.mt.6300049.
- Sondhi, Dolan, Linda Johnson, Keith Purpura, Sebastien Monette, Mark M Souweidane, Michael G Kaplitt, Barry Kosofsky, et al. « Long-term Expression and Safety of Administration of AAVrh.10hCLN2 to the Brain of Rats and Nonhuman Primates for the Treatment of Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis ». *Human Gene Therapy Methods* 23, n° 5 (octobre 2012): 324-335. doi:10.1089/hgtb.2012.120.
- Sopher, Bryce L, Patrick S Thomas Jr, Michelle A LaFevre-Bernt, Ida E Holm, Scott A Wilke, Carol B Ware, Lee-Way Jin, Randell T Libby, Lisa M Ellerby, et Albert R La Spada. « Androgen Receptor YAC Transgenic Mice Recapitulate SBMA Motor Neuronopathy and

- Implicate VEGF164 in the Motor Neuron Degeneration ». *Neuron* 41, n° 5 (4 mars 2004): 687-699.
- Spada, Albert R. La, Elizabeth M. Wilson, Dennis B. Lubahn, A. E. Harding, et Kenneth H. Fischbeck. « Androgen Receptor Gene Mutations in X-linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy ». , *Published Online: 04 July 1991*; | *Doi:10.1038/352077a0* 352, n° 6330 (4 juillet 1991): 77-79. doi:10.1038/352077a0.
- Storek, Benjamin, Nina M Harder, Michaela S Banck, Cheng Wang, Douglas M McCarty, William Gm Janssen, John H Morrison, Christopher E Walsh, et Andreas S Beutler. « Intrathecal Long-term Gene Expression by Self-complementary Adeno-associated Virus Type 1 Suitable for Chronic Pain Studies in Rats ». *Molecular Pain* 2 (2006): 4. doi:10.1186/1744-8069-2-4.
- Storek, Benjamin, Matthias Reinhardt, Cheng Wang, William G M Janssen, Nina M Harder, Michaela S Banck, John H Morrison, et Andreas S Beutler. « Sensory Neuron Targeting by Self-complementary AAV8 via Lumbar Puncture for Chronic Pain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 3 (22 janvier 2008): 1055-1060. doi:10.1073/pnas.0708003105.
- Storkebaum, Erik, et Peter Carmeliet. « VEGF: a critical player in neurodegeneration ». *Journal of Clinical Investigation* 113, n° 1 (1 janvier 2004): 14-18. doi:10.1172/JCI200420682.
- Storkebaum, Erik, Diether Lambrechts, Mieke Dewerchin, Maria-Paz Moreno-Murciano, Saskia Appelmans, Hideyasu Oh, Philip Van Damme, et al. « Treatment of Motoneuron Degeneration by Intracerebroventricular Delivery of VEGF in a Rat Model of ALS ». *Nature Neuroscience* 8, n° 1 (2004): 85-92. doi:10.1038/nn1360.
- Strong, Michael J., et Paul H. Gordon. « Primary lateral sclerosis, hereditary spastic paraplegia and amyotrophic lateral sclerosis: Discrete entities or spectrum? » *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 6, n° 1 (janvier 2005): 8-16. doi:10.1080/14660820410021267.
- Suzuki, Keisuke, Masahisa Katsuno, Haruhiko Banno, Yu Takeuchi, Naoki Atsuta, Mizuki Ito, Hirohisa Watanabe, et al. « CAG Repeat Size Correlates to Electrophysiological Motor and Sensory Phenotypes in SBMA ». *Brain* 131, n° 1 (1 janvier 2008): 229-239. doi:10.1093/brain/awm289.
- Swindell, Eric C., Carsten Moeller, Christina Thaller, et Gregor Eichele. « Cloning and expression analysis of chicken Lix1, a founding member of a novel gene family ». *Mechanisms of Development* 109, n° 2 (décembre 2001): 405-408. doi:10.1016/S0925-4773(01)00535-4.
- Swoboda, Kathryn J. « Seize the day: Newborn screening for SMA ». *American journal of medical genetics. Part A* 152A, n° 7 (juillet 2010): 1605-1607. doi:10.1002/ajmg.a.33519.

Swoboda, Kathryn J, Thomas W Prior, Charles B Scott, Teresa P McNaught, Mark C Wride, Sandra P Reyna, et Mark B Bromberg. « Natural History of Denervation in SMA: Relation to Age, SMN2 Copy Number, and Function ». *Annals of Neurology* 57, n° 5 (mai 2005): 704-712. doi:10.1002/ana.20473.

T

Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131, n° 5 (30 novembre 2007): 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takano, K., T. Miki, J. Katahira, et Y. Yoneda. « NXF2 is involved in cytoplasmic mRNA dynamics through interactions with motor proteins ». *Nucleic Acids Research* 35, n° 8 (29 mars 2007): 2513-2521. doi:10.1093/nar/gkm125.

Talbot, Kevin. « Motor Neuron Disease THE BARE ESSENTIALS ». *Practical Neurology* 9, n° 5 (10 janvier 2009): 303-309. doi:10.1136/jnnp.2009.188151.

Talbot, Kevin, Christopher P. Ponting, Aspasia M. Theodosiou, Nanda R. Rodrigues, Robert Surtees, Roger Mountford, et Kay E. Davies. « Missense Mutation Clustering in the Survival Motor Neuron Gene: a Role for a Conserved Tyrosine and Glycine Rich Region of the Protein in RNA Metabolism? » *Human Molecular Genetics* 6, n° 3 (3 janvier 1997): 497-500. doi:10.1093/hmg/6.3.497.

Tarasiuk, Joanna, Alina Kułakowska, Wiesław Drozdowski, Johannes Kornhuber, et Piotr Lewczuk. « CSF markers in amyotrophic lateral sclerosis ». *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)* 119, n° 7 (juillet 2012): 747-757. doi:10.1007/s00702-012-0806-y.

Taymans, Jean-Marc, Luk H. Vandenbergh, Chris Van Den Haute, Irina Thiry, Christophe M. Deroose, Luc Mortelmans, James M. Wilson, Zeger Debyser, et Veerle Baekelandt. « Comparative Analysis of Adeno-Associated Viral Vector Serotypes 1, 2, 5, 7, And 8 in Mouse Brain ». *Human Gene Therapy* 18, n° 3 (mars 2007): 195-206. doi:10.1089/hum.2006.178.

Tenenbaum, L, A Chtarto, E Lehtonen, T Velu, J Brothi, et M Levivier. « Recombinant AAV-mediated Gene Delivery to the Central Nervous System ». *The Journal of Gene Medicine* 6 Suppl 1 (février 2004): S212-222. doi:10.1002/jgm.506.

Tenenbaum, L, F Jurysta, A Stathopoulos, Z Puschban, C Melas, W T Hermens, J Verhaagen, B Pichon, T Velu, et M Levivier. « Tropism of AAV-2 Vectors for Neurons of the Globus Pallidus ». *Neuroreport* 11, n° 10 (14 juillet 2000): 2277-2283.

- Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, et Jeffrey M. Jones. « Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts ». *Science* 282, n° 5391 (11 juin 1998): 1145-1147.
doi:10.1126/science.282.5391.1145.
- Todd, Adrian G., Robert Morse, Debra J. Shaw, Howard Stebbings, et Philip J. Young. « Analysis of SMN-neurite granules: Core Cajal body components are absent from SMN-cytoplasmic complexes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, n° 3 (2 juillet 2010): 479-485. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.139.
- Torres-Benito, Laura, Rocío Ruiz, et Lucía Tabares. « Synaptic defects in spinal muscular atrophy animal models ». *Developmental neurobiology* 72, n° 1 (janvier 2012): 126-133.
doi:10.1002/dneu.20912.
- Tortora G.J., Grabowski S.R., 2001. Principes d'anatomie et de physiologie, 9ème ed. ERPI.
- Tovar-y-Romo, Luis B, et Ricardo Tapia. « Delayed Administration of VEGF Rescues Spinal Motor Neurons from Death with a Short Effective Time Frame in Excitotoxic Experimental Models in Vivo ». *ASN Neuro* 4, n° 2 (2012). doi:10.1042/AN20110057.
- Towne, C, B L Schneider, D Kieran, D E Redmond Jr, et P Aebischer. « Efficient Transduction of Non-human Primate Motor Neurons after Intramuscular Delivery of Recombinant AAV Serotype 6 ». *Gene Therapy* 17, n° 1 (janvier 2010): 141-146. doi:10.1038/gt.2009.119.
- Towne, Chris, Marie Pertin, Ahmed T Beggah, Patrick Aebischer, et Isabelle Decosterd.
« Recombinant Adeno-associated Virus Serotype 6 (rAAV2/6)-mediated Gene Transfer to Nociceptive Neurons through Different Routes of Delivery ». *Molecular Pain* 5 (2009): 52.
doi:10.1186/1744-8069-5-52.
- Towne, Chris, Cédric Raoul, Bernard L Schneider, et Patrick Aebischer. « Systemic AAV6 Delivery Mediating RNA Interference Against SOD1: Neuromuscular Transduction Does Not Alter Disease Progression in fALS Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, n° 6 (juin 2008): 1018-1025. doi:10.1038/mt.2008.73.
- Towne, Chris, Veronica Setola, Bernard L Schneider, et Patrick Aebischer. « Neuroprotection by Gene Therapy Targeting Mutant SOD1 in Individual Pools of Motor Neurons Does Not Translate into Therapeutic Benefit in fALS Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19, n° 2 (février 2011): 274-283.
doi:10.1038/mt.2010.260.
- Troyer, D, W C Cash, J Vestweber, T Hiraga, et H W Leipold. « Review of Spinal Muscular Atrophy (SMA) in Brown Swiss Cattle ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation:*

Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 5, n° 2 (avril 1993): 303-306.

Tsai, Li-Kai, Yi-Chun Chen, Wei-Cheng Cheng, Chen-Hung Ting, James C Dodge, Wuh-Liang Hwu, Seng H Cheng, et Marco A Passini. « IGF-1 Delivery to CNS Attenuates Motor Neuron Cell Death but Does Not Improve Motor Function in Type III SMA Mice ». *Neurobiology of Disease* 45, n° 1 (janvier 2012): 272-279. doi:10.1016/j.nbd.2011.06.021.

Tsai, Ming S, Yung T Chiu, Sue H Wang, Hsiu M Hsieh-Li, Wei C Lian, et Hung Li. « Abolishing Bax-dependent Apoptosis Shows Beneficial Effects on Spinal Muscular Atrophy Model Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13, n° 6 (juin 2006): 1149-1155. doi:10.1016/j.ymthe.2006.02.008.

Tsuiji, Hitomi, Yohei Iguchi, Asako Furuya, Ayane Kataoka, Hiroyuki Hatsuta, Naoki Atsuta, Fumiaki Tanaka, et al. « Spliceosome Integrity Is Defective in the Motor Neuron Diseases ALS and SMA ». *EMBO Molecular Medicine* 5, n° 2 (février 2013): 221-234. doi:10.1002/emmm.201202303.

Turner, Martin R, Matthew C Kiernan, P Nigel Leigh, et Kevin Talbot. « Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis ». *The Lancet Neurology* 8, n° 1 (janvier 2009): 94-109. doi:10.1016/S1474-4422(08)70293-X.

U

Uchida, Azusa, Hiroki Sasaguri, Nobuyuki Kimura, Mio Tajiri, Takuya Ohkubo, Fumiko Ono, Fumika Sakaue, et al. « Non-human Primate Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis with Cytoplasmic Mislocalization of TDP-43 ». *Brain: a Journal of Neurology* 135, n° Pt 3 (mars 2012): 833-846. doi:10.1093/brain/awr348.

V

Valori, Chiara F., Ke Ning, Matthew Wyles, Richard J. Mead, Andrew J. Grierson, Pamela J. Shaw, et Mimoun Azzouz. « Systemic Delivery of scAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy ». *Science Translational Medicine* 2, n° 35 (6 septembre 2010): 35ra42-35ra42. doi:10.1126/scitranslmed.3000830.

Van Blitterswijk, Marka, Mariely DeJesus-Hernandez, et Rosa Rademakers. « How do C9ORF72 repeat expansions cause amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia ». *Current Opinion in Neurology* 25, n° 6 (décembre 2012): 689-700. doi:10.1097/WCO.0b013e32835a3efb.

- Van Blitterswijk, Marka, Lotte Vlam, Michael A. van Es, W-Ludo van der Pol, Eric A. M. Hennekam, Dennis Dooijes, Helenius J. Schelhaas, et al. « Genetic Overlap between Apparently Sporadic Motor Neuron Diseases ». Édité par Udai Pandey. *PLoS ONE* 7, n° 11 (14 novembre 2012): e48983. doi:10.1371/journal.pone.0048983.
- Van Den Bosch, L. « Genetic Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011 (2011): 348765. doi:10.1155/2011/348765.
- Van Den Bosch, L, P Van Damme, E Bogaert, et W Robberecht. « The Role of Excitotoxicity in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, n° 11-12 (décembre 2006): 1068-1082. doi:10.1016/j.bbadis.2006.05.002.
- Vance, Caroline, Boris Rogelj, Tibor Hortobágyi, Kurt J. De Vos, Agnes Lumi Nishimura, Jemeen Sreedharan, Xun Hu, et al. « Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6 ». *Science* 323, n° 5918 (27 février 2009): 1208-1211. doi:10.1126/science.1165942.
- Vannucci, Laura, Michele Lai, Flavia Chiuppesi, Luca Ceccherini-Nelli, et Mauro Pistello. « Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology ». *The new microbiologica* 36, n° 1 (janvier 2013): 1-22.
- Visser, J., J. M.B.V. de Jong, et M. d. Visser. « The history of progressive muscular atrophy: Syndrome or disease? » *Neurology* 70, n° 9 (26 février 2008): 723-727. doi:10.1212/01.wnl.0000302187.20239.93.
- Vite, Charles H., Marco A. Passini, Mark E. Haskins, et John H. Wolfe. « Adeno-associated Virus Vector-mediated Transduction in the Cat Brain ». *Gene Therapy* 10, n° 22 (2003): 1874-1881. doi:10.1038/sj.gt.3302087.
- Vitte, Jérémie M, Bénédicte Davoult, Natacha Roblot, Michèle Mayer, Vandana Joshi, Sabrina Courageot, François Tronche, et al. « Deletion of Murine Smn Exon 7 Directed to Liver Leads to Severe Defect of Liver Development Associated with Iron Overload ». *The American Journal of Pathology* 165, n° 5 (novembre 2004): 1731-1741. doi:10.1016/S0002-9440(10)63428-1.
- Vulchanova, Lucy, Daniel J Schuster, Lalitha R Belur, Maureen S Riedl, Kelly M Podetz-Pedersen, Kelley F Kitto, George L Wilcox, R Scott McIvor, et Carolyn A Fairbanks. « Differential Adeno-associated Virus Mediated Gene Transfer to Sensory Neurons Following Intrathecal Delivery by Direct Lumbar Puncture ». *Molecular Pain* 6 (2010): 31. doi:10.1186/1744-8069-6-31.

W

- Wakeling, Erin N, et John C Fyfe. « Lix1 knockout mouse does not exhibit spinal muscular atrophy phenotype ». *The Journal of Heredity* 102 Suppl 1 (octobre 2011): S32-39. doi:10.1093/jhered/esr031.
- Wakeling, Erin N, Béatrice Joussemet, Patrick Costiou, Dominique Fanuel, Philippe Moullier, Martine Barkats, et John C Fyfe. « Failure of lower motor neuron radial outgrowth precedes retrograde degeneration in a feline model of SMA ». *The Journal of Comparative Neurology* (25 novembre 2011). doi:10.1002/cne.23010.
- Wallis, Nicole, Chrissandra J Zagami, Philip M Beart, et Ross D O'Shea. « Combined Excitotoxic-oxidative Stress and the Concept of Non-cell Autonomous Pathology of ALS: Insights into Motoneuron Axonopathy and Astrogliosis ». *Neurochemistry International* 61, n° 4 (septembre 2012): 523-530. doi:10.1016/j.neuint.2012.02.026.
- Wang. « Neuroimaging in Amyotrophic Lateral Sclerosis - Springer ». Consulté le 22 novembre 2012. <http://link.springer.com/article/10.1007/s13311-010-0011-3/fulltext.html>.
- Wang, B, J Li, et X Xiao. « Adeno-associated Virus Vector Carrying Human Minidystrophin Genes Effectively Ameliorates Muscular Dystrophy in Mdx Mouse Model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n° 25 (5 décembre 2000): 13714-13719. doi:10.1073/pnas.240335297.
- Wang, C, C-M Wang, K R Clark, et T J Sferra. « Recombinant AAV Serotype 1 Transduction Efficiency and Tropism in the Murine Brain ». *Gene Therapy* 10, n° 17 (août 2003): 1528-1534. doi:10.1038/sj.gt.3302011.
- Wang, C Y, H Y Guo, T M Lim, Y K Ng, H P Neo, P Y K Hwang, W-C Yee, et S Wang. « Improved Neuronal Transgene Expression from an AAV-2 Vector with a Hybrid CMV enhancer/PDGF-beta Promoter ». *The Journal of Gene Medicine* 7, n° 7 (juillet 2005): 945-955. doi:10.1002/jgm.742.
- Wang, David B, Robert D Dayton, Phillip P Henning, Cooper D Cain, Li Ru Zhao, Lisa M Schrott, Elysse A Orchard, David S Knight, et Ronald L Klein. « Expansive Gene Transfer in the Rat CNS Rapidly Produces Amyotrophic Lateral Sclerosis Relevant Sequelae When TDP-43 Is Overexpressed ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 12 (décembre 2010): 2064-2074. doi:10.1038/mt.2010.191.
- Wang, Ji-Wu, Jonathan R. Brent, Andrew Tomlinson, Neil A. Shneider, et Brian D. McCabe. « The ALS-associated proteins FUS and TDP-43 function together to affect Drosophila

- locomotion and life span ». *Journal of Clinical Investigation* 121, n° 10 (3 octobre 2011): 4118-4126. doi:10.1172/JCI57883.
- Wang, Li-Jun, Yan-Yan Lu, Shin-ichi Muramatsu, Kunihiro Ikeguchi, Ken-ichi Fujimoto, Takashi Okada, Hiroaki Mizukami, et al. « Neuroprotective Effects of Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Mediated by an Adeno-associated Virus Vector in a Transgenic Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, n° 16 (15 août 2002): 6920-6928. doi:20026668.
- Wang, Lixin, Eric Dobrzynski, Alexander Schlachterman, Ou Cao, et Roland W Herzog. « Systemic Protein Delivery by Muscle-gene Transfer Is Limited by a Local Immune Response ». *Blood* 105, n° 11 (1 juin 2005): 4226-4234. doi:10.1182/blood-2004-03-0848.
- Wang, Xiaojun, Huadong Fan, Zheng Ying, Bin Li, Hongfeng Wang, et Guanghui Wang. « Degradation of TDP-43 and Its Pathogenic Form by Autophagy and the Ubiquitin-proteasome System ». *Neuroscience Letters* 469, n° 1 (18 janvier 2010): 112-116. doi:10.1016/j.neulet.2009.11.055.
- Wang, Yaoming, Ertugrul Kilic, Ulkan Kilic, Bruno Weber, Claudio L Bassetti, Hugo H Marti, et Dirk M Hermann. « VEGF Overexpression Induces Post-ischaemic Neuroprotection, but Facilitates Haemodynamic Steal Phenomena ». *Brain: a Journal of Neurology* 128, n° Pt 1 (janvier 2005): 52-63. doi:10.1093/brain/awh325.
- Wang, Z, H-I Ma, J Li, L Sun, J Zhang, et X Xiao. « Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo ». *Gene Therapy* 10, n° 26 (décembre 2003): 2105-2111. doi:10.1038/sj.gt.3302133.
- Watson, G, J Bastacky, P Belichenko, M Buddhikot, S Jungles, M Vellard, W C Mobley, et E Kakkis. « Intrathecal Administration of AAV Vectors for the Treatment of Lysosomal Storage in the Brains of MPS I Mice ». *Gene Therapy* 13, n° 11 (juin 2006): 917-925. doi:10.1038/sj.gt.3302735.
- Watson, M. R., R. D. Lagow, K. Xu, B. Zhang, et N. M. Bonini. « A Drosophila Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Motor Neuron Damage by Human SOD1 ». *Journal of Biological Chemistry* 283, n° 36 (2 juillet 2008): 24972-24981. doi:10.1074/jbc.M804817200.
- Weber, Michel, Joseph Rabinowitz, Nathalie Provost, Hervé Conrath, Sébastien Folliot, Delphine Briot, Yan Chérel, et al. « Recombinant Adeno-associated Virus Serotype 4 Mediates Unique and Exclusive Long-Term Transduction of Retinal Pigmented Epithelium in Rat, Dog, and Nonhuman Primate After Subretinal Delivery ». *Molecular Therapy* 7, n° 6 (2003): 774-781. doi:10.1016/S1525-0016(03)00098-4.

- Wee, Claribel D, Lingling Kong, et Charlotte J Sumner. « The genetics of spinal muscular atrophies ». *Current Opinion in Neurology* 23, n° 5 (octobre 2010): 450-458.
doi:10.1097/WCO.0b013e32833e1765.
- Wei, Hua, Joshuel A. Pahang, et Suzie H. Pun. « Optimization of Brush-Like Cationic Copolymers for Nonviral Gene Delivery ». *Biomacromolecules* 14, n° 1 (14 janvier 2013): 275-284.
doi:10.1021/bm301747r.
- Weinstein, David A, Catherine E Correia, Thomas Conlon, Andrew Specht, John Verstegen, Karine Onclin-Verstegen, Martha Campbell-Thompson, et al. « Adeno-associated Virus-mediated Correction of a Canine Model of Glycogen Storage Disease Type Ia ». *Human Gene Therapy* 21, n° 7 (juillet 2010): 903-910. doi:10.1089/hum.2009.157.
- Wen, Hsin-Lan, Yuan-Ta Lin, Chen-Hung Ting, Sue Lin-Chao, Hung Li, et Hsiu Mei Hsieh-Li. « Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy ». *Human Molecular Genetics* (25 février 2010). doi:10.1093/hmg/ddq058.
- Winhammar, Jennica MC, Dominic B Rowe, Robert D Henderson, et Matthew C Kiernan. « Assessment of disease progression in motor neuron disease ». *The Lancet Neurology* 4, n° 4 (avril 2005): 229-238. doi:10.1016/S1474-4422(05)70042-9.
- Winkler, C. « Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy ». *Genes & Development* 19, n° 19 (1 octobre 2005): 2320-2330.
doi:10.1101/gad.342005.
- Wirth, Brunhilde, Lars Brichta, et Eric Hahnen. « Spinal Muscular Atrophy: From Gene to Therapy ». *Seminars in Pediatric Neurology* 13, n° 2 (juin 2006): 121-131.
doi:10.1016/j.spen.2006.06.008.
- Wohlsein, Peter, Michael Brüggmann, Ina Pfeiffer, Hermann Ammer, Petra Wolf, Wolfgang Baumgartner, et Martin Peters. « Spontaneous Degenerative Polioencephalomyelopathy in Feeder Pigs--a New Motor Neuron Disease? ». *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 125, n° 11-12 (décembre 2012): 520-528.
- Wong, Margaret, et Lee J Martin. « Skeletal Muscle-restricted Expression of Human SOD1 Causes Motor Neuron Degeneration in Transgenic Mice ». *Human Molecular Genetics* 19, n° 11 (1 juin 2010): 2284-2302. doi:10.1093/hmg/ddq106.
- Worgall, Stefan, Dolan Sondhi, Neil R Hackett, Barry Kosofsky, Minal V Kekatpure, Nurunisa Neyzi, Jonathan P Dyke, et al. « Treatment of Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis by CNS Administration of a Serotype 2 Adeno-associated Virus Expressing CLN2 cDNA ». *Human Gene Therapy* 19, n° 5 (mai 2008): 463-474. doi:10.1089/hum.2008.022.

- Workman, Eileen, Stephen J Kolb, et Daniel J Battle. « Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein biogenesis defects and motor neuron selectivity in spinal muscular atrophy ». *Brain Research* (28 février 2012). doi:10.1016/j.brainres.2012.02.051.
- Wu, Zhijian, Aravind Asokan, Joshua C Grieger, Lakshmanan Govindasamy, Mavis Agbandje-McKenna, et R Jude Samulski. « Single Amino Acid Changes Can Influence Titer, Heparin Binding, and Tissue Tropism in Different Adeno-associated Virus Serotypes ». *Journal of Virology* 80, n° 22 (novembre 2006): 11393-11397. doi:10.1128/JVI.01288-06.
- Wu, Zhijian, Hongyan Yang, et Peter Colosi. « Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, n° 1 (janvier 2010): 80-86. doi:10.1038/mt.2009.255.
- Wylie, D R, R G Glover, et K L Lau. « Projections from the Accessory Optic System and Pretectum to the Dorsolateral Thalamus in the Pigeon (Columbia Livia): a Study Using Both Anteretrograde and Retrograde Tracers ». *The Journal of Comparative Neurology* 391, n° 4 (22 février 1998): 456-469.

X

- Xiao, X, J Li, et R J Samulski. « Efficient Long-term Gene Transfer into Muscle Tissue of Immunocompetent Mice by Adeno-associated Virus Vector ». *Journal of Virology* 70, n° 11 (novembre 1996): 8098-8108.
- Xu, Lingfei, Manxue Mei, Mark E Haskins, Timothy C Nichols, Patricia O'donnell, Karyn Cullen, Aaron Dillow, Dwight Bellinger, et Katherine P Ponder. « Immune Response after Neonatal Transfer of a Human Factor IX-expressing Retroviral Vector in Dogs, Cats, and Mice ». *Thrombosis Research* 120, n° 2 (2007): 269-280. doi:10.1016/j.thromres.2006.09.010.
- Xu, Qinghao, Beverly Chou, Bethany Fitzsimmons, Atsushi Miyahara, Veronica Shubayev, Camila Santucci, Michael Hefferan, Martin Marsala, et Xiao-Ying Hua. « In Vivo Gene Knockdown in Rat Dorsal Root Ganglia Mediated by Self-complementary Adeno-associated Virus Serotype 5 Following Intrathecal Delivery ». *PloS One* 7, n° 3 (2012): e32581. doi:10.1371/journal.pone.0032581.
- Xu, Wei, et Thomas C Südhof. « A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization ». *Science (New York, N.Y.)* 339, n° 6125 (15 mars 2013): 1290-1295. doi:10.1126/science.1229534.
- Xu, Ya, Yanping Gu, Ping Wu, Guang-Wen Li, et Li-Yen Mae Huang. « Efficiencies of Transgene Expression in Nociceptive Neurons through Different Routes of Delivery of Adeno-associated

Viral Vectors ». *Human Gene Therapy* 14, n° 9 (10 juin 2003): 897-906.

doi:10.1089/104303403765701187.

Xu, Zuoshang. « Does a loss of TDP-43 function cause neurodegeneration? » *Molecular Neurodegeneration* 7, n° 1 (2012): 27. doi:10.1186/1750-1326-7-27.

Xue, Y-Q, B-F Ma, L-R Zhao, J B Tatom, B Li, L-X Jiang, R L Klein, et W-M Duan. « AAV9-mediated Erythropoietin Gene Delivery into the Brain Protects Nigral Dopaminergic Neurons in a Rat Model of Parkinson's Disease ». *Gene Therapy* 17, n° 1 (janvier 2010): 83-94. doi:10.1038/gt.2009.113.

Y

Yamakawa. « Two cases of dementias with motor neuron disease evaluated by Pittsburgh compound B-positron emission tomography - Springer ». Consulté le 22 novembre 2012. <http://link.springer.com.gate2.inist.fr/article/10.1007/s10072-011-0479-6/fulltext.html>.

Yamazaki, Tomohiro, Shi Chen, Yong Yu, Biao Yan, Tyler C. Haertlein, Monica A. Carrasco, Juan C. Tapia, et al. « FUS-SMN protein interactions link the motor neuron diseases ALS and SMA ». *Cell reports* 2, n° 4 (25 octobre 2012): 799-806. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.025.

Ye, G.-J., M. M. Scotti, J. Liu, L. Wang, D. R. Knop, et G. Veres. « Clearance and Characterization of Residual HSV DNA in Recombinant Adeno-associated Virus Produced by an HSV Complementation System ». *Gene Therapy* 18, n° 2 (2011): 135-144. doi:10.1038/gt.2010.102.

Yue, Yongping, Arkasubhra Ghosh, Chun Long, Brian Bostick, Bruce F Smith, Joe N Kornegay, et Dongsheng Duan. « A Single Intravenous Injection of Adeno-associated Virus Serotype-9 Leads to Whole Body Skeletal Muscle Transduction in Dogs ». *Molecular Therapy* 16, n° 12 (30 septembre 2008): 1944-1952. doi:10.1038/mt.2008.207.

Z

Zerres, K, S Rudnik-Schöneborn, E Forrest, A Lusakowska, J Borkowska, et I Hausmanowa-Petrusewicz. « A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients ». *Journal of the neurological sciences* 146, n° 1 (27 février 1997): 67-72.

Zhang, Zhenxi, Francesco Lotti, Kimberly Dittmar, Ihab Younis, Lili Wan, Mumtaz Kasim, et Gideon Dreyfuss. « SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing ». *Cell* 133, n° 4 (16 mai 2008): 585-600. doi:10.1016/j.cell.2008.03.031.

- Zhao, X, S K Onteru, K E Dittmer, K Parton, H T Blair, M F Rothschild, et D J Garrick. « A Missense Mutation in AGTPBP1 Was Identified in Sheep with a Lower Motor Neuron Disease ». *Heredity* 109, n° 3 (septembre 2012): 156-162. doi:10.1038/hdy.2012.23.
- Zheng, Chengyun, Inger Nennesmo, Bengt Fadeel, et Jan-Inge Henter. « Vascular Endothelial Growth Factor Prolongs Survival in a Transgenic Mouse Model of ALS ». *Annals of Neurology* 56, n° 4 (octobre 2004): 564-567. doi:10.1002/ana.20223.
- Zheng, Chengyun, Mattias K Sköld, Jian Li, Inger Nennesmo, Bengt Fadeel, et Jan-Inge Henter. « VEGF Reduces Astrogliosis and Preserves Neuromuscular Junctions in ALS Transgenic Mice ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363, n° 4 (30 novembre 2007): 989-993. doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.088.
- Zhou, Haiyan, Narinder Janghra, Chalermchai Mitrpant, Rachel L Dickinson, Karen Anthony, Loren Price, Ian C Eperon, Stephen D Wilton, Jennifer Morgan, et Francesco Muntoni. « A Novel Morpholino Oligomer Targeting ISS-N1 Improves Rescue of Severe Spinal Muscular Atrophy Transgenic Mice ». *Human Gene Therapy* 24, n° 3 (mars 2013): 331-342. doi:10.1089/hum.2012.211.
- Zhou, Hongxia, Cao Huang, Han Chen, Dian Wang, Carlisle P Landel, Pedro Yuxing Xia, Robert Bowser, Yong-Jian Liu, et Xu Gang Xia. « Transgenic Rat Model of Neurodegeneration Caused by Mutation in the TDP Gene ». *PLoS Genetics* 6, n° 3 (mars 2010): e1000887. doi:10.1371/journal.pgen.1000887.
- Zhu, Shan, Irina G Stavrovskaya, Martin Drozda, Betty Y S Kim, Victor Ona, Mingwei Li, Satinder Sarang, et al. « Minocycline Inhibits Cytochrome c Release and Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice ». *Nature* 417, n° 6884 (2 mai 2002): 74-78. doi:10.1038/417074a.
- Zincarelli, Carmela, Stephen Soltys, Giuseppe Rengo, et Joseph E Rabinowitz. « Analysis of AAV Serotypes 1-9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice after Systemic Injection ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16, n° 6 (juin 2008): 1073-1080. doi:10.1038/mt.2008.76.

Résumé

L'amyotrophie spinale (SMA) et la sclérose latérale amyotrophique sont les maladies du motoneurone (MN) les plus communes, caractérisées par une dégénérescence des MN de la moelle épinière, responsable d'une amyotrophie progressive souvent létale, et pour laquelle aucun traitement curatif n'est actuellement disponible. Parmi les pistes thérapeutiques les plus prometteuses, la thérapie génique permet de faire exprimer de façon durable un facteur neuroprotecteur ou de ré-introduire un gène manquant dans les MN. En effet, plusieurs études ont montré une amélioration sans précédent de l'espérance de vie de modèles murins sévères de SMA après administrations intraveineuses de vecteur dérivé du virus adéno-associé de sérotype 9 (AAV9). Toutefois, avant d'envisager une application clinique, l'efficacité et l'innocuité d'une telle stratégie de transfert de gènes doivent être évaluées dans des modèles gros animaux, plus proches de l'homme anatomiquement et physiologiquement. L'objectif de ce travail a été de tester différentes stratégies de transfert de gènes dans la moelle épinière d'un modèle félin atteint d'une pathologie du MN proche de la SMA humaine de type III, causée par la délétion du gène *limb-expression 1* (LIX1). Pour identifier une stratégie efficace de thérapie génique dans la moelle des chats LIX1, nous avons testé parallèlement à l'administration intraveineuse de vecteur AAV9, deux voies d'administration d'AAV restreintes au système nerveux central : les injections intracérébrale et intracisternale (dans le liquide cérébro-spinal), avec deux transgènes potentiellement thérapeutiques, le facteur neuroprotecteur VEGF et le gène LIX1. Nos résultats ont montré qu'une injection intracisternale d'AAV9 mène à une expression des transgènes dans de nombreux MN tout le long de la moelle, chez les chats adultes comme chez les chats nouveau-nés, avec une transduction périphérique limitée. Cette étude pourrait valider l'utilisation de vecteurs AAV9 par voie intracisternale dans le cadre d'une stratégie thérapeutique des maladies du MN chez l'homme.

Abstract

Spinal muscular atrophy (SMA) and amyotrophic lateral sclerosis are the most common motor neuron (MN) diseases characterized by the degeneration of the spinal cord MN, leading to often lethal progressive muscular atrophy, for which no cure is currently available. Among the most promising therapeutic approaches, a neuroprotective factor or a missing gene can be expressed or re-introduced in MN in a sustainable manner by gene therapy. Indeed, several studies have shown an unprecedented improvement of the lifespan of severe SMA mouse models after intravenous administrations of vector derived from adeno-associated virus serotype 9 (AAV9). However, before considering clinical application, efficiency and safety of such a strategy should be evaluated in large animal models, anatomically and physiologically more closely related to humans than rodents. The objective of this study was to test different strategies for gene transfer into the spinal cord of cats with a MN disease close to human type III SMA caused by the deletion of the LIX1 gene (limb expression 1). To identify an effective strategy for gene therapy in LIX1 cats spinal cord, we tested parallel to the intravenous administration of AAV9 vector, two AAV administration routes restricted to the central nervous system: intracerebral and intracisternal (in the cerebrospinal fluid) injections with two therapeutic transgenes candidates: the neuroprotective factor VEGF and the LIX1 gene. Our results showed that intracisternal injections of AAV9 lead to transgene expression in many MN throughout the spinal cord in both adult and newborn cats with limited peripheral transduction. This study could validate the use of intracisternal administration of AAV9 vectors in a therapeutic strategy for MN diseases in humans.