

Efficacité de l'administration intramusculaire d'un adénovirus codant pour la neurotrophine-3 sur l'évolution d'une dégénérescence motoneuronale murine

Les maladies dégénératives des motoneurons (la sclérose latérale amyotrophique – SLA –, et les amyotrophies spinales) ont en commun la perte des alpha-motoneurons spinaux qui conduit à une atrophie et à une paralysie musculaires progressives. Ces maladies ne bénéficient aujourd'hui d'aucun traitement curatif ou préventif. Or, des facteurs neurotrophiques sont considérés depuis quelques années comme de bonnes molécules candidates pour le traitement de ces affections [1, 2] avec un triple objectif: augmenter la survie motoneuronale; améliorer la fonction des motoneurons restants; et, éventuellement, rétablir des motoneurons devenus non fonctionnels. Effectivement, la survie de motoneurons en culture, au cours du développement ou après lésion axonale, est augmentée par administration de plusieurs de ces facteurs neurotrophiques.

Malheureusement, chez les patients atteints de SLA, différents essais cliniques ont démontré la relative ou complète inefficacité, voire le danger de l'administration de ces facteurs sous forme de protéines recombinantes [3]: dans un essai clinique de phase II/III, le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) n'a démontré aucune action bénéfique mais une mortalité élevée aux plus fortes doses (*m/s* n° 12, vol. 10, p. 1324); les résultats obtenus avec l'IGF-I, *insulin-like growth factor*, semblent peu probants et, selon une étude phase III, le BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*, n'améliorerait ni la capacité respira-

toire ni la survie des patients. Les raisons de ces échecs sont probablement multiples: pour le CNTF, par exemple, on peut incriminer sa demi-vie sérique très courte, ses effets secondaires importants (fièvre, cachexie, troubles hépatiques) et son accès limité aux motoneurons; pour l'IGF-I la présence ubiquitaire de protéines de liaison et de récepteurs, et, pour le BDNF, une régulation négative des récepteurs après injection de doses massives de ce facteur. Notre pari était que le transfert de gènes par des vecteurs adénoviraux pourrait constituer une alternative intéressante pour administrer des quantités modérées mais continues de facteurs neurotrophiques et, éventuellement, mieux cibler leur action. Dans un article récemment publié dans *Nature Medicine* [4], nous avons pu démontrer que l'injection intramusculaire d'un vecteur adénoviral codant pour la neurotrophine-3 (AdNT-3) améliore la survie et les fonctions neuromusculaires de la souris *p_{mn}* (*progressive motor neuronopathy*), un modèle génétique de dégénérescence motoneuronale bien caractérisé sur le plan histopathologique [5] et électrophysiologique [6].

Les souris *p_{mn}* non traitées développent une atrophie et une paralysie musculaires neurogéniques dès l'âge de deux semaines. Le vecteur AdNT-3 a été administré à des souris *p_{mn}* nouveau-nées, par injection unilatérale dans trois groupes musculaires. Cela conduit à une synthèse élevée et stable d'ARN messagers et de pro-

téine NT-3. En outre, la surproduction de NT-3 (environ 100 fois par rapport à une souris non traitée) ne s'accompagne pas d'effets délétères. Comme cela est représenté dans la *figure 1*, la durée de vie moyenne des souris *p_{mn}* ainsi traitées est augmentée à $61,3 \pm 2,5$ jours ($n = 16$) ce qui représente un gain de 50 % par rapport à des souris non traitées ou ayant reçu en injection un vecteur adénoviral témoin ($40,4 \pm 2,4$ et $40,0 \pm 2,5$ jours, $n = 14$ et $n = 12$ respectivement, $P < 0,001$).

Pour analyser les déficits moteurs chez la souris *p_{mn}*, nous avons réalisé une étude électromyographique en utilisant différents paramètres. Nous avons, d'une part, mesuré l'amplitude de la réponse évoquée du muscle gastrocnémien (CMAP, *compound muscle action potentiel*) après stimulation électrique supramaximale du nerf sciatique. Une telle stimulation recrute de façon synchronisée toutes les unités motrices fonctionnelles innervées par ce nerf. Nous avons ainsi pu montrer chez les souris *p_{mn}* traitées âgées de 3 semaines, que l'amplitude du CMAP représente $68 \pm 9,4\%$ de celle obtenue chez les animaux témoins, alors qu'elle ne représente plus que $40,6 \pm 9\%$ chez les animaux *p_{mn}* non traités. Cette différence persiste tout au long de l'étude (*figure 2*). D'autre part, nous avons procédé à l'analyse des potentiels d'unités motrices individuelles lors de la contraction spontanée du diaphragme. L'analyse de la morphologie de ces potentiels nous a permis de mettre en évidence une

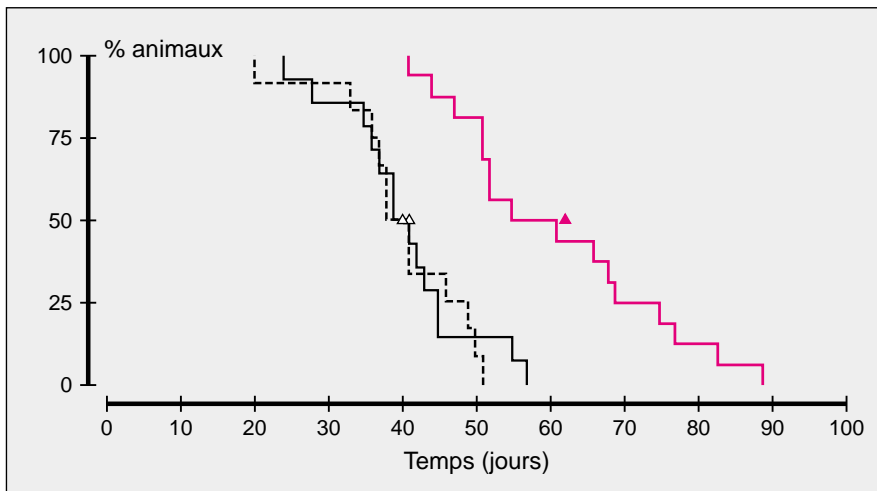


Figure 1. **Survie des souris pmn après traitement par l'AdNT-3.** La survie des souris pmn est exprimée en pourcentage du nombre de souris analysées (AdNT-3, $n = 16$, en gras, non traité: $n = 14$, en continu, AdlacZ: $n = 12$, en pointillé): la survie moyenne (triangles) des souris pmn traitées est augmentée de 50% par rapport à celle des souris pmn témoins (non traitées).

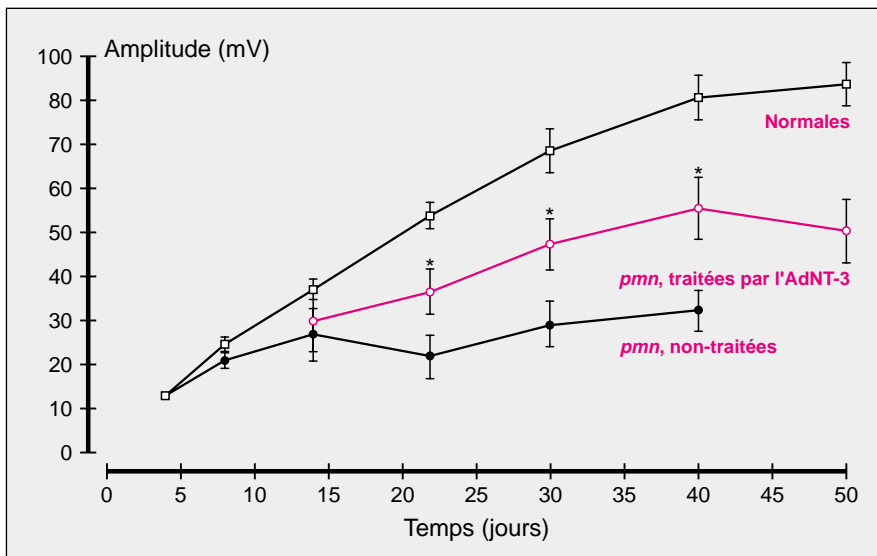


Figure 2. **Analyse électromyographique après stimulation électrique chez les souris pmn traitées par l'AdNT-3.** L'amplitude de la réponse évoquée du muscle gastrocnémien après stimulation électrique du nerf sciatique (CMAP) est représentée en fonction de l'âge. Les souris pmn traitées ($n = 5$) sont comparées à un groupe témoin ($n = 10$) et à un groupe non traité ($n = 5$ jusqu'à J22, 4 jusqu'à J30, 3 jusqu'à J40). Barres verticales : erreur standard; *: $P < 0,05$.

augmentation de la taille moyenne des unités motrices survivantes chez les souris pmn traitées par l'AdNT-3. Ce phénomène, presque inexistant chez les animaux pmn non traités, traduit la mise en place de compensation massive par réinnervation collatérale des fibres musculaires orphelines à partir des axones moteurs survivants. Chez la souris pmn, la dégénérescence des motoneurons débute aux terminaisons nerveuses et aboutit à la perte massive d'axones myélinisés. Nous avons analysé la perte axonale dans le nerf phrénique assurant l'innervation du diaphragme et constitué en majorité d'axones moteurs (figure 3 A-C). A l'âge de 25 jours, le nombre d'axones myélinisés dans le nerf phrénique de souris pmn non traitées s'élève à 122 ± 13 ($n = 6$) par rapport à 263 ± 8 ($n = 4$) chez les souris normales. En revanche, chez les souris pmn traitées, une réduction de 30% dans la dégénérescence axonale a été constatée (nombre d'axones myélinisés: 164 ± 15 , $n = 8$, $P < 0,05$). Enfin, nous avons analysé l'innervation terminale au niveau de muscles de souris normales, pmn traitées et non traitées (figure 3 D-F). En comparaison avec les souris pmn non traitées, le traitement par l'AdNT-3 augmente la repousse de branches collatérales à partir d'axones moteurs persistants favorisant ainsi la réinnervation des plaques motrices probablement déshabitées à la suite de la dégénérescence des axones qui les innervent initialement.

Jusqu'à présent, seul le CNTF a montré des effets thérapeutiques dans le modèle pmn (*m/s n°7, vol. 8, p. 744*), après implantation intra-abdominale [7] ou sous-cutanée [8] de cellules génétiquement modifiées. Le GDNF, en revanche, est sans effet sur la survie ou la dégénérescence axonale, bien qu'une partie des motoneurons du noyau facial semble être protégée [9]. La NT-3 n'était pas considérée jusqu'à présent comme l'un des facteurs neurotrophiques les plus efficaces sur la survie des motoneurons. Ses effets sur le nombre de motoneurons isolés en culture [10] et après lésion du nerf facial chez le rat nouveau-né [11] étaient inférieurs à ceux du BDNF et du GDNF. En outre, les souris dont les allèles du gène NT-3 sont invalidés par recombinaison homologue ne mon-

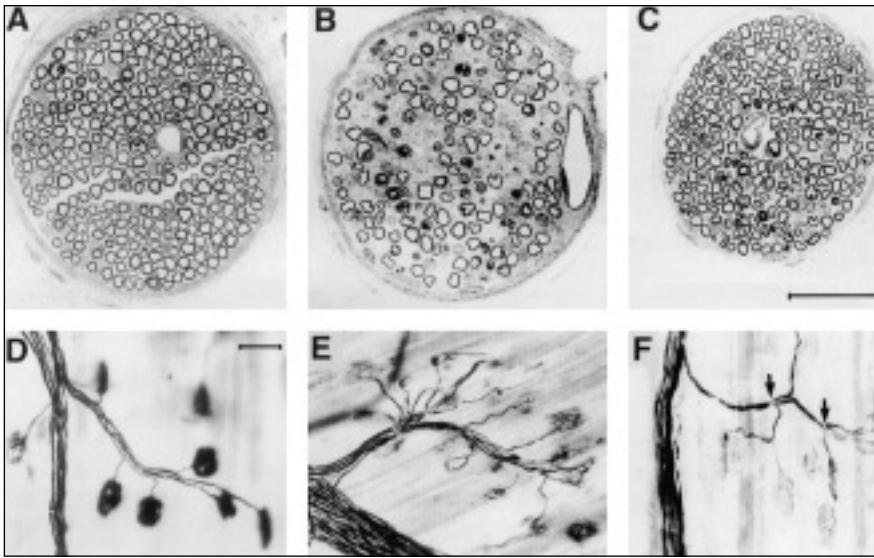


Figure 3. Analyse histopathologique de nerfs de souris pmn traitées par l'AdNT-3. **A-C.** Analyse en microscopie électronique de nerfs phréniques de souris normales (A), pmn non traitées (B) et traitées par l'AdNT-3 (C) à l'âge de 25 jours. À noter le nombre augmenté d'axones myélinisés chez la souris pmn traitée (C) AdNT-3 par rapport à la souris non traitée (B). La surface cross-sectionnelle plus large chez la souris non traitée est le reflet de la prolifération des cellules de Schwann. Barre: 50 µm. **D-E.** Analyse de l'innervation terminale du muscle gastrocnémien superficiel par coloration acétylcholinestérase/argent chez des souris âgées de 4 semaines. D: souris normale, E: souris pmn non-traitées et F: après traitement AdNT-3. Chez la souris pmn non traitée de nombreuses plaques motrices ont perdu leur innervation (E), les axones terminaux sont réduits en nombre et montrent des signes de dégénérescence. Les plaques motrices toujours connecté à un axone gardent une relation 1:1 entre axone et plaque motrice. Après traitement par l'AdNT-3 (F) les axones terminaux sont plus nombreux, branchent de manière répétée aux nœuds de Ranvier (flèches) et assurent l'innervation de plusieurs plaques motrices. Barre: 25 µm.

trent pas de réduction du nombre de leurs motoneurones [12]. En revanche, la NT-3 est connue pour son action sur la croissance des terminaisons nerveuses des motoneurones cortico-spinaux et pour ses actions sur la synaptogenèse [13] et l'efficacité synaptique [14] dans des co-cultures de motoneurones et de myofibrilles. Il se pourrait donc que les facteurs neurotrophiques agissent à différents niveaux (corps cellulaire, axone, terminaison) du motoneurone, voire sur la myofibrille ou la cellule de Schwann. Ainsi, l'amélioration de la survie et des fonctions neuromusculaires des souris pmn obtenue après administration intramusculaire du vecteur AdNT-3 pourrait, plus spécifiquement, reposer sur une protection axonale et une réin-

nervation musculaire alors que d'autres facteurs pourraient agir plutôt sur les corps cellulaires. Ces données nous ont incité à tester la synergie éventuelle entre le vecteur AdNT-3 et un vecteur adéno-viral codant pour une forme sécrétée de CNTF: une potentialisation significative des effets thérapeutiques a pu ainsi être notée.

Les effets thérapeutiques observés chez les souris pmn traitées par l'AdNT-3 sont bilatéraux (retrouvés dans les muscles injectés et non injectés) et présents à distance des sites d'injection (nerfs phréniques). Le bénéfice thérapeutique traduirait donc la production du facteur dans les muscles injectés et la libération de celui-ci dans la circulation générale. Ce résultat semble

encourageant car l'infection d'un nombre limité de cellules musculaires est possible avec plusieurs vecteurs de thérapie génique actuels. Néanmoins, avant de pouvoir envisager une éventuelle application à l'homme, il faudra réduire l'immunogénicité des vecteurs adéno-viraux, étudier les données toxicologiques et pharmacologiques et tester cette stratégie sur d'autres modèles animaux.

En conclusion, les résultats de cette étude constituent la première démonstration d'une amélioration de la survie dans une maladie neurodégénérative par thérapie génique adéno-virale. Ils soulignent l'intérêt thérapeutique de la neurotrophine-3 et de combinaisons de facteurs neurotrophiques dans les maladies dégénératives des motoneurones et mettent en évidence de nouveaux mécanismes de neuroprotection et de réparation ■

Georg Haase

Inserm U.129, ICGM, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

Philippe Kennel

Rhône-Poulenc Rorer GenCell, 13, quai Jules-Guesde, 94403 Vitry-sur-Seine, France.

Henning Schmalbruch

Institute of Medical Physiology, Panum Institute, University of Copenhagen, 2200 Copenhagen N, Danemark.

1. Thoenen H, Hughes RA, Sendtner M. Trophic support of motoneurons: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications. *Exp Neurol* 1993; 124: 47-55.
2. Henderson C. L'avenir thérapeutique des facteurs neurotrophiques dans les maladies neurodégénératives. *Med Sci* 1995; 11: 1067-9.
3. Glaser V. ALS claims another victim. *Nature Biotech* 1997; 15: 212-3.
4. Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Aklis S, Revah F, Schmalbruch H, Kahn A. Gene therapy of a murine motor neuron disease using adeno-viral vectors for neurotrophic factors. *Nature Med* 1997; 3: 429-36.

(suite des références, p. 756)

5. Schmalbruch H, Jensen HS, Bjaerg M, Kamieniecka Z, Kurlan L. A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50: 192-204.
6. Kennel PF, Fonteneau P, Martin E, Schmidt JM, Azzouz M, Borg J, Guénet JL, Schmalbruch H, Warter JM, Poindron P. Electromyographical and motor performance studies in the *pmn* mouse model of neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 1996; 3: 137-47.
7. Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 1992; 358: 502-4.
8. Sagot Y, Tan SA, Baetge E, Schmalbruch H, Kato AC, Aebischer P. Polymer encapsulated cell lines genetically engineered to release ciliary neurotrophic factor can slow down progressive motor neuronopathy in the mouse. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 1313-22.
9. Sagot Y, Tan SA, Hammang JP, Aebischer P, Kato AC. GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice. *J Neurosci* 1996; 16: 2335-41.
10. Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, *et al.* Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 1993; 363: 266-70.
11. Yan Q, Elliott JL, Matheson C, Sun J, Zhang L, Mu X, Rex KL, Snider WD. Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons *in vivo*. *J Neurobiol* 1993; 24: 1555-77.
12. Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7: 148-55.
13. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. *J Neurol Sci* 1996; 136: 17-23.
14. Lohof AM, Ip NY, Poo MM. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 1993; 363: 350-3.



SOCIÉTÉ FRANÇAISE DES MICROSCOPIES - SF μ

2^e colloque de la Société Française des Microscopies
Nancy, 3 juin - 4 juillet 1997

École d'Architecture de Nancy et École Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux

■ Lundi 30 juin et mardi 1 juillet : Journées de Formation

- | | |
|--|---|
| ① Imagerie et diffraction filtrées (2 jours) | ④ Spectroscopie en infrarouge (1 jour) |
| ② Défauts cristallins en MET (2 jours) | |
| ③ Microscopie à champ proche (2 jours) | ⑤ Microscopie Confocale Laser (2 jours) |

■ Mercredi 2, jeudi 3, vendredi 4 juillet : Colloque

Symposium commun : Les biomatériaux : méthodes physiques et biologiques d'études comparées

Physique-Chimie, Champ Proche, Microanalyse, Géologie

- P1 Nouveaux développements dans l'étude des matériaux métalliques et des défauts de structure
 P2 Matériaux carbonés et nitrurés
 P3 Microscopies à Champ Proche
 P4 Symposium du Cercle Français de Microanalyse
 P5 Symposium de Géologie : microspectroscopies : développements récents en science de la terre

Sciences de la Vie, Pathologie, Pédologie

- B1 La cryo-microscopie : mythe ou réalité ? Ses applications à la biologie et à la chimie
 B2 Hybridation *in situ* au niveau ultrastructural : différentes stratégies
 B3 Détermination de structures 3D en microscopies
 B4 La microscopie du Golgi a bientôt 100 ans : approches contemporaines
 B5 Symposium du Cercle Français de Pathologie Ultrastructurale : Molécules et jonctions cellulaires : nouvelles perspectives et applications en dermatologie
 B6 : Biologie de l'environnement - Pédologie : Matières organiques des sols, liaisons organominérales

■ **Conférence plénière** : La symétrie dans la matière et en architecture

■ **Table ronde** : L'avenir des jeunes en microscopies

■ **Communications libres orales et sur panneaux**

■ **Réunion associée du Groupe n° 8 de l'ANRT** : Spectrométrie des rayons X mous

■ **Prix Pierre Favard 1997** (physique)

■ **Prix de la meilleure photographie sur le thème** « Architecture dans la matière organique et inorganique »

■ **Exposition de matériel scientifique et communications des exposants**

Dates limites	Résumés de communications	10 mai 1997
	Inscriptions, hébergement en Cité U.	10 juin 1997

Programme détaillé, inscriptions et renseignements à : Stés Françaises des Microscopies - Bât. C - Courrier case 243
 9, quai Saint-Bernard - 75252 PARIS cedex 05 - Tél. : 01.44.27.26.21 - Fax : 01.44.27.26.22
 e-mail : sfme@snv.jussieu.fr - Serveur : http://www.glvf-cnrs.fr/sfm/