

## Utilisation du fragment C-terminal de la neurotoxine tétanique pour visualiser et analyser des connexions neuronales et pour le transfert d'une activité biologique associée

par Sylvie Roux<sup>1,2</sup>, Cécile Saint Clément<sup>2</sup>, Thomas Curie<sup>2</sup>, Emmanuelle Girard<sup>1</sup>, Philippe Brûlet<sup>2</sup> & Jordi Molgó<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Unité Propre de Recherche 9040, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Fédératif de Neurobiologie Alfred Fessard, 91198 Gif-sur-Yvette, France ;

<sup>2</sup> Unité d'Embryologie Moléculaire, Institut Pasteur, Unités de Recherche Associées 2578, Centre National de la Recherche Scientifique, 25, rue du Dr Roux, 75724 Paris, France.  
E-mail : sroux@nbcn.cnrs-gif.fr

Reçu le 20 octobre 2004

### RÉSUMÉ

Tout en étant dépourvu de toxicité, le fragment C-terminal de la neurotoxine tétanique ou fragment TTC conserve les propriétés de transport rétrograde et trans-synaptique de la toxine native. L'association du fragment TTC avec un marqueur fluorescent ou avec la  $\beta$ -galactosidase facilite sa détection. Ces marqueurs ont donc logiquement été utilisés pour visualiser et étudier les connexions neuronales établies. Dans cette revue de synthèse, nous développerons les potentialités des différentes approches utilisées, à savoir l'injection de protéine purifiée, l'utilisation d'adénovirus et la transgénèse. Comme l'activité nerveuse joue un rôle essentiel dans l'internalisation du fragment TTC, la fonctionnalité des connexions ainsi visualisées peut être également appréhendée. Des modifications quantitatives du transport rétrograde neuronal peuvent être également détectées. Le frag-

ment TTC représente donc un excellent outil pour analyser la connectivité et la fonctionnalité d'un réseau neuronal. D'autre part, le fragment TTC a été très rapidement pressenti comme un vecteur particulièrement intéressant pour le transport et la libération d'activité biologique ou encore de gènes au sein d'un réseau neuronal. Dans cette optique, des constructions contenant un domaine de translocation membranaire permettant la libération cytosolique de l'activité biologique associée ont été étudiées. Enfin, nous rapporterons les premiers résultats, particulièrement encourageants, obtenus avec le fragment TTC pour cibler exclusivement vers les neurones l'action d'un facteur neurotrophique. Cette spécificité d'action permettrait alors d'éviter des effets secondaires dus à une action de ces facteurs sur d'autres cellules que les neurones.

**SUMMARY** C-terminal fragment of tetanus toxin: its use in neuronal network analysis and its potential as non-viral vector

The atoxic C-terminal fragment of tetanus neurotoxin or TTC fragment presents similar retrograde and transsynaptic properties to that of holotoxin. Detection of this fragment is easier when it is associated with a fluorescent marker or with  $\beta$ -galactosidase activity by genetic fusion or chemical conjugation. Thus, these tracers have been used to study and analyse the synaptic connections of a neural network. In this article, we shortly review the various methods used with this aim including: injection of the fusion protein, adenovirus *in vivo* expression and transgenesis. Since neural activity is essential for neuronal TTC binding and internalization, the functionality of

connections can be also evaluated. Moreover, modifications of the retrograde transport can be detected by using this fragment. Thus, TTC fragment is an excellent tracer to analyse the connectivity and functionality of a neural network. The TTC fragment was also soon proposed as potential therapeutic vector to transport and to deliver a biological activity or gene in a neural network. With this aim, the efficiency of a translocation domain to induce the cytosolic release of the associated activity has been evaluated. The use of the TTC fragment to target specifically a neurotrophic factor to neurons and thus avoid secondary effects has been tested with interesting results.

## INTRODUCTION

La neurotoxine tétanique (TeNT), produite par *Clostridium tetani*, est une des neurotoxines les plus puissantes connues. Son action au niveau des interneurons de la moelle épinière se traduit par le blocage de la libération de neuromédiateurs inhibiteurs (glycine et GABA) entraînant une paralysie musculaire spasmodique, le téanos. Le fragment C-terminal de la TeNT (ou fragment TTC), tout en étant dépourvu de toxicité, conserve les propriétés de la toxine native *i)* de liaison neuronale, *ii)* d'internalisation et de transport rétrograde (c'est-à-dire des terminaisons pré-synaptiques vers le corps cellulaire puis vers les dendrites) et *iii)* de transport trans-synaptique (c'est-à-dire qu'il a la capacité de franchir une synapse et d'être internalisé par le neurone ou l'interneurone en connexion) (Manning *et al.*, 1990). Le fait que ce fragment TTC soit capable de migrer de façon rétrograde et d'atteindre des neurones situés dans des régions en connexion laisse supposer qu'un tel fragment puisse être utilisé comme une protéine « vecteur » (Bizzi *et al.*, 1980). Dans cette synthèse, après avoir présenté la structure de la TeNT ainsi que les composants et compartiments cellulaires mis en jeu pour son internalisation et son trafic neuronal, nous développerons plus particulièrement l'utilisation du fragment TTC, couplé à diverses protéines ou fluorophores, afin d'étudier la connectivité d'un réseau neuronal ainsi que les diverses approches poursuivies pour son utilisation en tant que vecteur non-viral.

## LA TOXINE TÉTANIQUE : STRUCTURE ET MÉCANISME D'INTERNALISATION NEURONALE ET DE TRANSPORT RÉTROGRADE

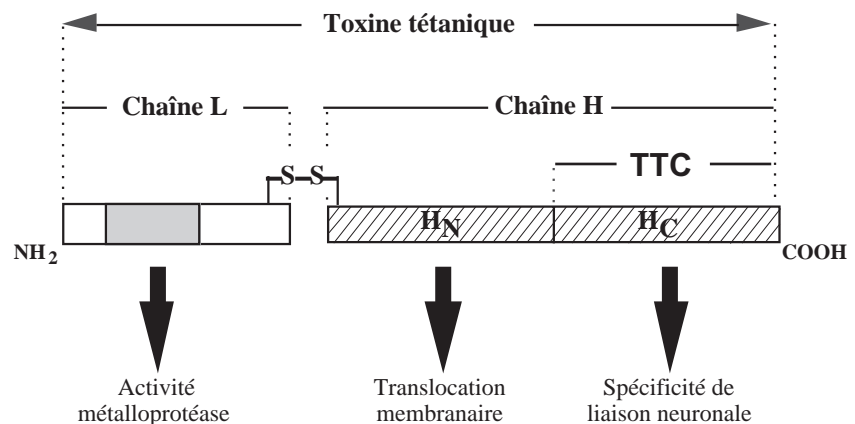
La TeNT est produite sous la forme d'une chaîne inactive de poids moléculaire élevé (environ 150 kDa). Après sa libération, probablement par lyse bactérienne, elle est clivée par des protéases endogènes pour donner la neurotoxine active, constituée de deux chaînes, une chaîne

lourde (H) et une chaîne légère (L) liées par un pont disulfure et des liaisons non covalentes (pour revue *cf.* Schiavo *et al.*, 2000). La résolution de la structure cristallographique du domaine C-terminal de la TeNT (Umland *et al.*, 1997) ainsi que de la BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998) et de la BoNT/B (Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000) a confirmé la structure modulaire des neurotoxines clostridiales en trois domaines fonctionnels distincts de 50 kDa (Fig. 1). Cette organisation structurale fonctionnelle serait en relation avec le mécanisme d'intoxication neuronale de la TeNT qui se déroule en 4 étapes, à savoir 1) liaison, 2) internalisation et transport rétrograde trans-synaptique, 3) translocation membranaire et 4) modification de sa cible cellulaire. Chacun des domaines assurerait une des principales étapes du processus d'intoxication. Le fragment N-terminal de la chaîne lourde est responsable de la translocation membranaire de la chaîne légère dans le cytosol alors que le fragment C-terminal ou fragment TTC est responsable de la spécificité de la liaison neuronale et du transport axonal rétrograde et trans-synaptique au sein d'un réseau neuronal. La chaîne légère est une métalloprotéase à Zn qui clive spécifiquement la protéine intégrale des vésicules synaptiques, la VAMP/synaptobrevine, bloquant ainsi la libération des neurotransmetteurs. Il est probable que ces différents domaines agissent en synergie au cours des différentes étapes de l'intoxication.

La première étape dans l'internalisation neuronale nécessite que la TeNT se lie à des récepteurs présents à la surface du motoneurone. Un modèle faisant intervenir deux types de récepteurs, lipides et protéines, a été proposé (Montecucco, 1986). La TeNT ainsi que le fragment TTC se lie avec les gangliosides GD1b et GT1b (Halpern & Neale, 1995). Récemment, une glycoprotéine de 15 kDa capable d'interagir avec le fragment TTC a été identifiée dans les cellules PC12 différenciées par le NGF ainsi que dans les cultures de motoneurons embryonnaires (Herreros *et al.*, 2000a; Herreros *et al.*, 2000b; Herreros *et al.*, 2001). La localisation préférentielle des récepteurs de la TeNT dans des microdomaines lipidiques (Herreros *et al.*, 2001; Vyas *et al.*, 2001) permet de supposer que la TeNT et le fragment TTC sont

FIG. 1. – Représentation schématique de la structure de la neurotoxine tétanique (TeNT).

La TeNT est composée de l'association de deux chaînes : une chaîne légère (L) liée par un pont disulfure à la chaîne lourde (H) qui peut être divisée en deux sous-domaines fonctionnels. Chacun des domaines intervient au cours des différentes étapes du processus d'intoxication. Le domaine C-terminal de la chaîne H, ou fragment TTC, permet la liaison neuronale de la TeNT ainsi que son transport rétrograde trans-synaptique. Le domaine N-terminal de la chaîne lourde (H<sub>N</sub>) contient le domaine transmembranaire nécessaire à la translocation cytosolique de la chaîne légère qui contient le domaine catalytique toxique.



localisés dans de tels microdomaines à la surface cellulaire. Dans des cellules de type neuronal et des motoneurones en culture, la TeNT et le fragment TTC sont en effet, associés à ces microdomaines lipidiques (Herreros *et al.*, 2001 ; Herreros & Schiavo, 2002). De plus, sur ces mêmes cellules, la liaison du fragment TTC se traduit par des marquages ponctués (Herreros *et al.*, 2001), semblables à ceux observés avec différents marqueurs des microdomaines lipidiques (Harder *et al.*, 1998). Ces microdomaines lipidiques ou radeaux lipidiques sont des régions de la membrane plasmique riches en cholestérol, en protéines à ancre GPI (glycophosphatidylinositol), en glycosphingolipides ainsi que diverses autres protéines membranaires (Anderson, 1998 ; Simons & Toomre, 2000). Ils sont utilisés par de nombreux agents pathogènes et toxines pour leur internalisation cellulaire (Shin & Abraham, 2001). *In vivo*, bien que l'internalisation du fragment TTC dépende de l'activité nerveuse pré-synaptique (Maskos *et al.*, 2002 ; Miana-Mena *et al.*, 2002), on ne le retrouve que rarement dans les vésicules synaptiques au niveau des terminaisons nerveuses des jonctions neuromusculaires (Miana-Mena *et al.*, 2002). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus sur des motoneurones embryonnaires en culture dans lesquels le fragment TTC est détecté dans des compartiments tubulo-vésiculaires (Lalli *et al.*, 2003) ainsi que dans de grandes structures vésiculaires, différentes des vésicules synaptiques claires (Bordet *et al.*, 2001a) alors que, sur culture de neurones d'hippocampe, l'internalisation de la TeNT passe par le recyclage des vésicules synaptiques (Matteoli *et al.*, 1996). Deux types de mécanismes d'internalisation pourraient donc être utilisés, l'un dépendant des microdomaines lipidiques, l'autre de l'endocytose par des vésicules à clathrine (Herreros *et al.*, 2001). Selon le type de neurones utilisés (motoneurones *vs* neurones d'hippocampe), l'un des mécanismes serait prépondérant par rapport à l'autre. L'utilisation des microdomaines lipidiques permettrait d'éviter la voie de dégradation lysosomale et d'atteindre ainsi des compartiments subcellulaires particuliers. En effet, le fragment TTC a été retrouvé au niveau des corps cellulaires des motoneurones uniquement au niveau du réticulum endoplasmique pérucléaire (Miana-Mena *et al.*, 2002).

*In vivo*, le transport rétrograde du fragment TTC est rapide et fait intervenir de grandes structures vésiculaires (Miana-Mena *et al.*, 2002) qui pourraient correspondre à des cavéosomes (Pelkmans *et al.*, 2001). *In vitro*, sur culture de motoneurones, le fragment TTC est retrouvé dans des compartiments tubulo-vésiculaires non acides présentant un mouvement rétrograde rapide et continu (Lalli & Schiavo, 2002). Le transport rétrograde rapide de ces structures dépend des microtubules, des microfilaments d'actine ainsi que de protéines motrices associées, en particulier la dynéine ainsi que la myosine Va (Lalli *et al.*, 2003). Dans les motoneurones en culture, les structures utilisées par le fragment TTC contiennent également le récepteur ubiquitaire des neurotrophines p75<sup>NTR</sup> (Lalli & Schiavo, 2002). Il existe probablement des similitudes entre les voies d'internalisation et de transport du fragment TTC et celles utilisées par les neurotrophines.

En accord avec cette hypothèse, sur culture de neurones du cortex, la TeNT ainsi que le fragment TTC activent des voies de signalisation cellulaire impliquant les récepteurs spécifiques des neurotrophines, les récepteurs tyrosine kinase Trk (Gil *et al.*, 2000 ; Gil *et al.*, 2001 ; Gil *et al.*, 2003).

## ANALYSE DE LA CONNECTIVITÉ ET DE LA FONCTIONNALITÉ D'UN RÉSEAU NEURONAL

La capacité du système nerveux à traiter des informations dépend de la formation de connexions spécifiques et complexes entre les neurones et leurs cibles. Visualiser ces connexions et comprendre quels sont les mécanismes qui interviennent durant leur fonctionnement sont des questions fondamentales qui sont loin d'être résolues. L'imagerie de réseaux neuronaux nécessite l'utilisation de marqueurs trans-synaptiques c'est-à-dire des marqueurs capables de franchir des synapses. Leur détection dans les différents neurones en connexion permet ainsi d'établir une cartographie du réseau. La plupart des données ont été obtenues par l'injection de virus neurotropes comme les virus de la famille des *Herpes viridae* ou le virus de la rage, qui donnent des marquages intenses et étendus du fait de leur capacité à se répliquer activement dans la cellule hôte (Kuypers & Ugolini, 1990 ; Ugolini, 1995). Cependant, leur utilisation est limitée par leur pathogénicité pour le neurone même si, dans certains cas, un contrôle de leur répllication et de leur propagation peut être obtenu (DeFalco *et al.*, 2001). Le fragment TTC a la capacité de transporter une activité biologique associée de façon rétrograde et trans-synaptique au sein d'un réseau neuronal. En effet, l'association du fragment TTC à diverses activités enzymatiques comme la  $\beta$ -N-acétylhexosaminidase A (Dobrenis *et al.*, 1992), la peroxydase de raifort (Fishman & Savitt, 1989) ou la glucose oxydase (Beaude *et al.*, 1990) par conjugaison chimique ou encore la superoxyde dismutase Cu/Zn par fusion génétique (Francis *et al.*, 1995) se traduit par une augmentation de l'internalisation neuronale de ces enzymes aussi bien sur culture de neurones (Dobrenis *et al.*, 1992 ; Francis *et al.*, 1995) que chez l'animal (Fishman & Savitt, 1989 ; Beaude *et al.*, 1990 ; Figueiredo *et al.*, 1997). Couplé à un gène rapporteur facilitant sa détection, le fragment TTC est un bon marqueur trans-synaptique permettant d'étudier les connexions établies au sein d'un circuit neuronal.

### Les marqueurs utilisés (Fig. 2)

Deux gènes rapporteurs ont été génétiquement fusionnés au fragment TTC :

- d'une part le gène LacZ qui code pour l'activité  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) (Coen *et al.*, 1997). La protéine de fusion correspondante,  $\beta$ -gal-TTC, est facilement détectée par la révélation de l'activité  $\beta$ -gal par la coloration X-Gal sur coupes ou *in toto* ;

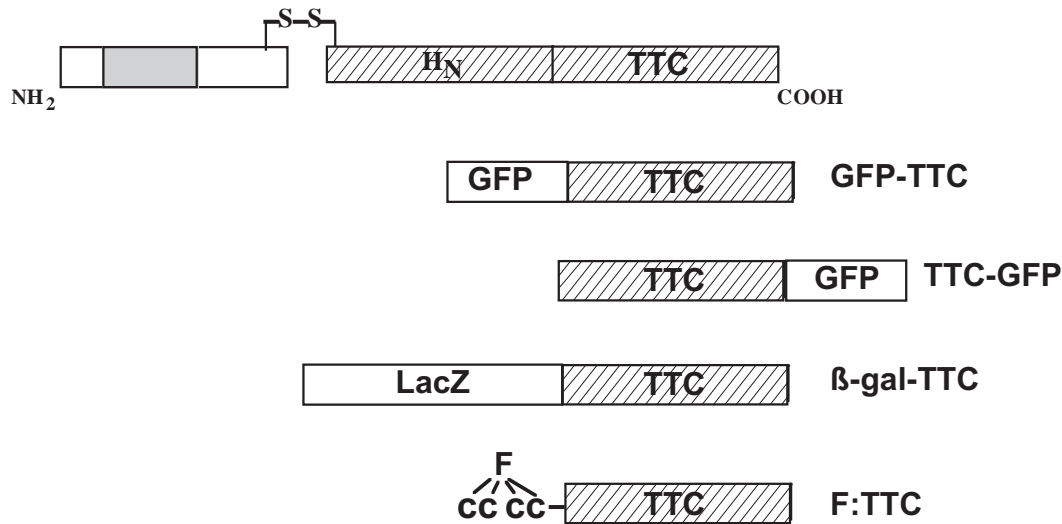


FIG. 2. – Représentation schématique des diverses protéines de fusion utilisées pour étudier la connectivité et la fonctionnalité d'un réseau neuronal.

L'ADN codant pour le fragment C-terminal de la TeNT est fusionné en position N-terminale à l'ADN codant pour différents gènes rapporteurs, comme la GFP ou LacZ, permettant la synthèse des protéines de fusion correspondantes GFP-TTC ou  $\beta$ -gal-TTC. La fusion peut être également réalisée au niveau C-terminal du fragment TTC, comme pour la protéine TTC-GFP, sans modification de la spécificité de liaison neuronale. Pour l'obtention du fragment TTC associé à un composé fluorescent (F), une séquence d'ADN codant pour 4 cystéines a été ajoutée en position N-terminale de l'ADN codant pour le fragment TTC, permettant par la suite le couplage chimique du fragment TTC correspondant avec différents réactifs fluorescents.

– d'autre part, le gène de la Green Fluorescent Protein (GFP). La protéine de fusion correspondante, GFP-TTC ou TTC-GFP (Bordet *et al.*, 2001a; Kissa *et al.*, 2002; Sapir *et al.*, 2004), peut être détectée directement par la fluorescence verte de la GFP.

L'obtention de protéines de fusion en position C-terminale ou N-terminale du fragment TTC ne modifie pas ses propriétés. On observe toutefois moins de dégradation protéique lors de la production par synthèse bactérienne des fusions N-terminales (Coen *et al.*, 1997; Bordet *et al.*, 2001b).

Un fragment TTC fluorescent a été obtenu en ajoutant une séquence codant pour 4 cystéines en position N-terminale de l'ADN codant pour le fragment TTC. Le fragment TTC synthétisé peut alors être conjugué à des réactifs fluorescents spécifiques pour donner un fragment TTC fluorescent (F:TTC) (Lalli & Schiavo, 2002).

### Analyse de la connectivité

Les avantages de telles protéines de fusion pour l'étude et la visualisation de neurones en connexion ont été démontrés lors d'une première approche par injection de la protéine de fusion  $\beta$ -gal-TTC dans la langue. L'internalisation neuronale et le transport rétrograde spécifique de la protéine de fusion jusqu'aux corps cellulaires des motoneurones correspondants ont pu être observés (Coen *et al.*; 1997, Miana-Mena *et al.*, 2003). Ce transport est rapide puisque l'activité  $\beta$ -gal est facilement détectée au niveau des noyaux de l'hypoglosse deux heures après l'injection dans la langue (Miana-

Mena *et al.*, 2002). L'activité  $\beta$ -gal est détectée, 18 à 24 heures après l'injection, dans des neurones émettant des projections axonales sur les noyaux de l'hypoglosse comme les neurones de la formation réticulée latérale ou du noyau solitaire, montrant ainsi un transfert trans-synaptique de la protéine de fusion (Coen *et al.*, 1997; Miana-Mena *et al.*, 2003). En utilisant cette protéine de fusion,  $\beta$ -gal-TTC, on visualise très facilement l'activité  $\beta$ -gal par la coloration X-gal avec une très bonne sensibilité, comparativement à la détection à l'aide d'un anticorps spécifique anti-TTC. Cependant, avec cette approche, les quantités de protéines de fusion que l'on peut injecter sont limitées. Le réseau neuronal visualisé est limité aux neurones de deuxième ou troisième ordre, c'est-à-dire à un ou deux passages synaptiques car, au delà, le marquage disparaît du fait de l'épuisement de la protéine de fusion au cours des passages synaptiques successifs (Coen *et al.*, 1997; Kissa *et al.*, 2002). Pour pallier cet inconvénient, des injections intramusculaires d'ADN codant la protéine de fusion  $\beta$ -gal-TTC ont été réalisées. La protéine de fusion  $\beta$ -gal-TTC est rapidement synthétisée *in vivo* dans les fibres transfectées et l'expression se maintient un mois après l'injection d'ADN aussi bien chez la larve de xénope (Coen *et al.*, 1999) que chez le rat (Miana-Mena *et al.*, 2004). Cependant, on constate une différence dans la cinétique de transport rétrograde entre les deux modèles. Alors que, chez le rat, la protéine peut être détectée au niveau des noyaux hypoglossaux 4 jours après l'injection d'ADN dans la langue (Miana-Mena *et al.*, 2004), il faut attendre un mois pour observer un marquage des corps cellulaires

chez le têtard après l'injection d'ADN dans le muscle dorsal ou le muscle caudal de la queue (Coen *et al.*, 1999). Chez le rat, l'activité  $\beta$ -gal est également détectée dans le cortex, 4 à 7 jours après l'injection intramusculaire d'ADN. Il y a donc eu passage trans-synaptique de la protéine de fusion (Miana-Mena *et al.*, 2004). Bien qu'aucune séquence spécifique de sécrétion ne soit retrouvée sur le fragment TTC, les cellules musculaires sécrètent le marqueur synthétisé *in vivo* (Coen *et al.*, 1999; Miana-Mena *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que, comme la protéine TAT du virus HIV, la protéine VP22 ou l'homéoprotéine *engrailed* (Prochiantz, 2000), le fragment TTC est sécrété par un mécanisme indépendant du système classique de sécrétion. La susceptibilité différente des deux modèles à la toxine tétanique ainsi qu'une activité musculaire moindre chez le têtard pourraient expliquer les différences observées entre les deux modèles. Comparativement à l'injection intramusculaire de la protéine de fusion, l'approche par injection d'ADN permet la production de la protéine par la fibre musculaire sur une longue période de temps. On peut donc étudier les connexions établies par les motoneurones innervant ces fibres sur des durées plus importantes. Cependant, il faut noter qu'un faible nombre de fibres musculaires sont effectivement transfectées par l'injection directe d'ADN et donc peu de fibres expriment le transgène.

Bien que le mécanisme d'intoxication par la toxine tétanique passe essentiellement par une internalisation par les motoneurones, l'utilisation des marqueurs contenant le fragment TTC est possible également au niveau des neurones centraux. Ainsi, après l'injection stéréotaxique de la protéine de fusion GFP-TTC au niveau du cortex cérébelleux, la protéine a pu être détectée par la fluorescence directe de la GFP au niveau des noyaux du pont, correspondant aux corps cellulaires de neurones projetant leurs axones dans la zone d'injection (Kissa *et al.*, 2002). Cependant, comme après l'injection intramusculaire, la détection dépend de l'intensité du marquage et donc de la quantité et de la stabilité de la protéine transportée à travers la synapse. Pour exprimer la protéine de fusion *in vivo* dans les neurones et ainsi compenser les problèmes liés à la quantité de protéine injectée, un adénovirus canin (Kremer *et al.*, 2000) contenant la séquence codant pour la protéine GFP-TTC a été obtenu (Kissa *et al.*, 2002). Le marqueur GFP-TTC est rapidement synthétisé dans les neurones ayant intégré l'adénovirus correspondant. La protéine de fusion GFP-TTC est alors sécrétée et conserve ses propriétés de transfert rétrograde trans-synaptique (Kissa *et al.*, 2002).

Que ce soit par injection de protéine de fusion purifiée, d'ADN ou d'adénovirus, on cible un groupe de neurones localisés dans une région particulière mais il est difficile d'étudier ainsi des neurones spécifiques. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de ces réseaux spécifiques ne peuvent être appréhendés. De plus, ces méthodes sont difficilement applicables à l'étude des changements dynamiques des réseaux neuronaux se produisant au cours du développement. Grâce à la précision des techniques de transgénèse, on peut

cibler l'expression de ces marqueurs dans une population déterminée de neurones. Différentes lignées de souris transgéniques exprimant le marqueur trans-synaptique GFP-TTC sous le contrôle du promoteur de la calbindine ont été obtenues (Maskos *et al.*, 2002). Une forte expression du marqueur GFP-TTC a pu ainsi être observée au niveau des cellules de Purkinje ou des cellules CA1 de l'hippocampe. Le transfert trans-synaptique du marqueur a été mis en évidence aussi bien au niveau du cervelet que de l'hippocampe. Il faut noter que ce transfert n'est effectif qu'après la mise en place des connexions neuronales montrant ainsi la fonctionnalité d'un tel marqueur pour les études de connectivité au cours du développement. Enfin, au niveau de l'hippocampe, des passages trans-synaptiques dans des neurones de troisième ordre ont pu être détectés (Maskos *et al.*, 2002). Grâce à cette approche, on peut identifier avec une plus grande précision et une meilleure reproductibilité les structures neuronales impliquées. L'utilisation d'un système bicistronique, permettant l'identification aisée du neurone dans lequel la transcription a lieu (LacZ) par rapport aux neurones connectés (GFP-TTC), facilite l'étude des connexions (Maskos *et al.*, 2002).

#### Analyse de la fonctionnalité des synapses

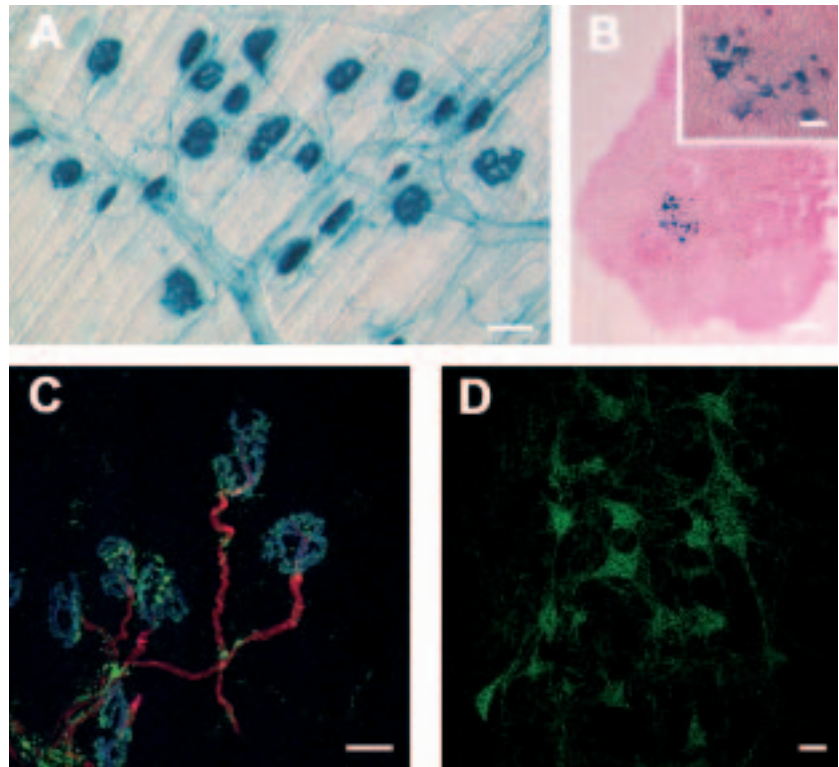
Après l'injection intramusculaire des protéines de fusion  $\beta$ -gal-TTC ou GFP-TTC, on observe très rapidement une concentration de ces marqueurs au niveau des jonctions neuromusculaires (Fig. 3) dépendant de l'activité nerveuse pré-synaptique (Miana-Mena *et al.*, 2002). Cette propriété ouvre des perspectives attrayantes d'utilisation de ces marqueurs pour la caractérisation fonctionnelle des jonctions neuromusculaires au cours des pathologies neurodégénératives du motoneurone. Différentes études *in vitro* ou *in vivo* ont mis en évidence une corrélation étroite entre internalisation, transfert trans-synaptique et activité nerveuse (Matteoli *et al.*, 1996; Coen *et al.*, 1997; Coco *et al.*, 1999; Maskos *et al.*, 2002). Les marqueurs dérivés de la TeNT permettent donc de visualiser une synapse active. Cette propriété a été utilisée dans le cadre de l'étude de certains facteurs transcriptionnels sur le développement des cellules de Renshaw, une cellule inhibitrice des motoneurones (Schneider & Fyffe, 1992). Ainsi, si la mutation du facteur *engrailed* se traduit par une diminution significative des synapses entre cellule de Renshaw et motoneurones, l'injection intramusculaire du marqueur GFP-TTC a permis de montrer la fonctionnalité des synapses restantes (Sapir *et al.*, 2004).

#### Analyse des modifications du transport axonal rétrograde

L'existence de très longues projections axonales des neurones moteurs de la moelle épinière implique l'existence d'un transport axonal actif. Ce transport concerne aussi bien le transport antérograde d'organites à la synapse que leur transport rétrograde ainsi que celui de divers facteurs trophiques (Goldstein & Yang, 2000;

FIG. 3. – Localisation des marqueurs  $\beta$ -gal-TTC et GFP-TTC au niveau des jonctions neuromusculaires et transport rétrograde dans le corps cellulaire des motoneurones.

Après son injection sous-cutanée à proximité du muscle élévateur de l'oreille (*Levator auris longus*), le marqueur  $\beta$ -gal-TTC (A) se localise très rapidement au niveau des jonctions neuromusculaires (observation 30 minutes après l'injection). L'activité  $\beta$ -galactosidase est détectée facilement *in toto* par la coloration X-gal. (C) Des résultats identiques sont obtenus après l'injection de la protéine GFP-TTC, qui est détectée en microscopie confocale directement par la fluorescence verte de la GFP. La protéine GFP-TTC est concentrée au niveau des jonctions neuromusculaires, identifiées en bleu par la liaison d'AlexaFluor 647- $\alpha$ -bungarotoxine, un ligand spécifique des récepteurs musculaires à l'acétylcholine. Les terminaisons axonales sont visualisées en rouge à l'aide d'un anticorps anti-neurofilament 200. Vingt-quatre heures après l'injection intramusculaire dans le *gastrocnemius* des marqueurs  $\beta$ -gal-TTC (B) ou GFP-TTC (D), les deux marqueurs ont été internalisés et transportés de façon rétrograde dans le corps cellulaire des motoneurones correspondants. Que ce soit avec la protéine  $\beta$ -gal-TTC, révélée par la coloration X-gal sur coupes transversales de la moelle épinière (B), ou avec la protéine GFP-TTC, visualisée par microscopie confocale sur coupes longitudinales de la moelle épinière par la fluorescence verte de la GFP (D), le marquage est localisé au niveau du soma mais également au niveau



Échelle : A : 0,05 mm ; B : 0,2 mm ; insert : 0,05 mm ; C et D : 20  $\mu$ m.

Brown, 2003). Différents modèles murins ont permis de démontrer l'importance du transport axonal dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives (Williamson & Cleveland, 1999 ; Murakami *et al.*, 2001 ; LaMonte *et al.*, 2002). En utilisant le fragment TTC couplé à un marqueur fluorescent (Fig. 1 ; F:TTC), un système expérimental sur des cultures de motoneurones a été développé permettant de visualiser et d'étudier quantitativement le transport axonal rétrograde de ce fragment (Lalli & Schiavo, 2002). Une modification significative de ce transport a pu être ainsi détectée chez une souris présentant une mutation de la chaîne légère de la dynéine (Hafezparast *et al.*, 2003). Ce système présente une bonne sensibilité puisque aucune modification significative du transport axonal n'avait été détectée chez l'adulte (Hafezparast *et al.*, 2003). Il sera intéressant d'étendre ce système d'étude à divers modèles murins de maladies neurodégénératives du motoneurone.

## LE FRAGMENT TTC COMME VECTEUR NON-VIRAL

Le traitement de pathologies neurologiques par une pharmacothérapie classique est limité par l'inaccessibilité du système nerveux du fait de la présence de la bar-

rière hémato-encéphalique. Très rapidement, il a été proposé d'utiliser les propriétés de transport rétrograde trans-synaptique du fragment TTC pour faciliter l'internalisation neuronale de molécules à visée thérapeutique (Bizzini *et al.*, 1980). Le transport trans-synaptique par le fragment TTC d'une activité biologique associée permettrait d'atteindre les neurones d'un réseau et ainsi d'éviter les effets secondaires dus à une action biologique sur d'autres tissus lors de l'administration par voie systémique.

## Utilisation du fragment TTC pour le transport et la libération d'activités biologiques associées

### Association avec la SOD-1

Les espèces oxygénées réactives (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl) sont impliquées dans la physiopathologie de nombreuses pathologies neurologiques. La superoxyde dismutase à Cu/Zn (SOD-1) intervient dans la dégradation de ces radicaux, jouant ainsi un rôle protecteur dans le cas d'ischémie cérébrale. Diverses mutations de la SOD-1 ont été décrites dans des cas de sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Orrell, 2000). Une fusion génétique a été réalisée entre la forme humaine de la SOD-1 et le fragment TTC (Francis *et al.*, 1995). La protéine de fusion correspondante conserve

l'activité de la SOD-1 ainsi que la spécificité de liaison neuronale, que ce soit *in vitro* sur cultures de cellules neuronales (Francis *et al.*, 1995) ou *in vivo* (Figueiredo *et al.*, 1997), et de transport rétrograde trans-synaptique de la toxine native après son injection intramusculaire (Figueiredo *et al.*, 1997). D'autre part, au niveau central, on observe, comparativement à l'injection témoin de SOD-1 seule, une rétention plus importante ainsi qu'une distribution plus étendue de la SOD-1 après l'injection intracérébrale de la protéine-fusion SOD-1-TTC (Francis *et al.*, 2004a). L'effet d'une telle protéine de fusion a été testé dans un modèle d'ischémie transitoire chez le rat (Francis *et al.*, 1997). Dans ce cas, la protéine de fusion SOD-1-TTC est perfusée en continu dans la circulation sanguine. Chez les animaux traités par SOD1-TTC, une diminution du volume de la zone d'infarctus du cerveau a été observée mais cet effet n'est pas significatif comparativement à celui obtenu par perfusion de la SOD-1 seule. Cette faible différence pourrait s'expliquer par une rupture temporaire de la barrière hémato-méningée lors de l'ischémie, facilitant ainsi la pénétration cérébrale de la SOD-1.

#### *Protéines de fusion à translocation cytosolique facilitée*

Le fragment TTC ne contient pas le domaine responsable de la translocation membranaire. De ce fait, après son internalisation dans des neurones, l'activité biologique présente dans la fusion reste dans les compartiments d'internalisation et ne peut atteindre les compartiments cellulaires où elle doit exercer son activité (Figueiredo *et al.*, 2000). Pour faciliter la libération cytosolique des protéines associées au fragment TTC, un domaine de translocation transmembranaire a été ajouté. Une fusion génétique a donc été réalisée entre le fragment TTC et les 386 premiers acides aminés de la toxine diphtérique (DAB<sub>389</sub>) correspondant au domaine catalytique toxique et au domaine de translocation membranaire de la toxine diphtérique (London, 1992 ; Ariansen *et al.*, 1993 ; vanderSpek *et al.*, 1993). Ce domaine de translocation membranaire est bien caractérisé et a été utilisé pour faciliter la libération de diverses activités dans le cytosol cellulaire (Stenmark *et al.*, 1991 ; Madsen *et al.*, 1992 ; vanderSpek *et al.*, 1993 ; Klingenberg & Olsnes, 1996). L'activité ADP-ribosyltransférase du domaine catalytique toxique permet de déterminer, par l'inhibition de la synthèse protéique, l'efficacité de la libération cytosolique du compartiment d'internalisation. Les expériences conduites sur diverses lignées cellulaires ont montré une spécificité pour les cellules de type neuronal due à l'ajout du fragment TTC ainsi qu'à la fonctionnalité du domaine de translocation membranaire de la toxine diphtérique (Francis *et al.*, 2000). Ce type d'approche a été utilisé pour faciliter la libération cytosolique de la protéine SMN. L'atrophie musculaire spinale (AMS) est une pathologie dégénérative des motoneurons due à des mutations du gène SMN1 (Survival Motor Neuron). Les observations cliniques et expérimentales ont montré que la sévérité de la maladie était corrélée à une diminution des taux cellulaires de la pro-

téine SMN (Lefevre *et al.*, 1997 ; Monani *et al.*, 2000). Des fusions génétiques ont donc été générées entre le gène SMN humain et le fragment TTC mais également avec le domaine de translocation membranaire de la toxine diphtérique lui-même fusionné au fragment TTC. Une forme mutante du domaine catalytique de la toxine diphtérique a été utilisée pour éviter l'action inhibitrice de la synthèse protéique toxique (vanderSpek *et al.*, 1996). En effet, sur culture de neurones, comparativement à la protéine de fusion non mutée DAB<sub>389</sub>-TTC, la protéine de fusion avec la forme mutée DA(E149S)B<sub>389</sub> est 1 000 fois moins active (Francis *et al.*, 2000). Les expériences conduites avec les différentes protéines de fusion purifiées sur culture de neurones embryonnaires ont mis en évidence un problème majeur d'internalisation des protéines de fusion contenant la protéine SMN (Francis *et al.*, 2004b). Cet effet serait probablement lié à la protéine SMN puisque, bien que la liaison aux neurones soit conservée, cette absence d'internalisation neuronale est observée aussi bien pour la fusion simple de SMN avec le fragment TTC qu'avec le fragment TTC fusionné au fragment normal ou muté de la toxine diphtérique. Cette étude n'a donc pas permis de mettre en évidence de façon significative les potentialités de ce type de construction pour libérer une protéine associée dans le cytoplasme d'un neurone. La réalisation d'études avec d'autres protéines associées devra être réalisée pour définir réellement l'efficacité de ce type de construction.

#### **Utilisation du fragment TTC pour le transfert de gène**

La thérapie génique représente un espoir dans le cas de cancers ou de pathologies neurologiques pour lesquels peu de stratégies thérapeutiques curatives existent. La plupart des approches actuelles se basent sur l'utilisation et l'injection de vecteurs viraux. La possibilité d'utiliser le fragment TTC pour délivrer un gène d'intérêt à des neurones est également explorée. Ainsi, le fragment TTC couplé à un fragment de 27 kDa de poly-(L)-lysine [poly(K)] permet le transfert spécifique d'un plasmide dans des cellules de type neuronal (Knight *et al.*, 1999). Bien que l'efficacité de transfection soit plus faible que celle observée avec un système classique de transfection (LipofectAMINE), le système TTC : poly(K) est plus performant sur des temps de contact courts avec les cellules. Lorsque de grandes quantités d'ADN sont nécessaires, on observe la formation d'agrégats, ce qui empêche l'utilisation d'un tel système pour la réalisation d'études *in vivo* (Schneider *et al.*, 2000). La protéine de fusion entre le fragment TTC et le domaine de translocation membranaire de la toxine diphtérique (DTT<sub>195-388</sub>) permet également la transfection d'ADN dans des cellules PC12 différenciées par le NGF lorsqu'on ajoute un polycation (P-L-1) (Barati *et al.*, 2002). Le fragment TTC permet de cibler spécifiquement les cellules neuronales, le domaine de translocation membranaire facilite la libération de l'ADN du compartiment d'internalisation. L'ajout d'un peptide codant pour un signal de localisation nucléaire au complexe DTT-TTC/P-L-1/ADN,

facilite le transfert de l'ADN au noyau (Barati *et al.*, 2002). Avec ce système pourtant, l'efficacité du transfert d'ADN dans la cellule est faible. Une optimisation de ce type d'approche permettrait d'envisager son utilisation future *in vivo*.

### Utilisation du fragment TTC pour cibler spécifiquement les neurones

En plus de ses propriétés de transport rétrograde trans-synaptique, le fragment TTC peut être utilisé pour sa spécificité de liaison neuronale. Différents facteurs neurotrophiques améliorent la survie des neurones (Siegel & Chauhan, 2000). Ils ont donc logiquement été préconisés comme traitement dans le cas de pathologies neurologiques, et ont été testés dans différents modèles murins de pathologies neurodégénératives. Un effet neuroprotecteur significatif de la cardiotrophine-1 (CT1), une cytokine appartenant à la famille de l'IL6, a pu être mis en évidence chez des modèles murins d'atrophie musculaire spinale (Bordet *et al.*, 1999; Lesbordes *et al.*, 2003) ou de sclérose latérale amyotrophique (Bordet *et al.*, 2001b). Cependant, ces cytokines peuvent agir sur d'autres cellules que les neurones, en particulier sur les cardiomyocytes entraînant une hypertrophie cardiaque chez l'adulte (Bordet *et al.*, 1999). Les protéines de fusion correspondant à la fusion génétique entre le fragment TTC et le gène codant pour CT-1 (CT1-TTC et TTC-CT1) ont été générées pour cibler l'action de la CT1 spécifiquement aux neurones. Les études réalisées sur culture de cellules ont confirmé l'activation par les fusions CT1-TTC du récepteur de la CT-1 uniquement pour les cellules neuronales et ce, à un degré semblable à celui de la CT1 seule, avec en particulier une augmentation de la survie neuronale (Bordet *et al.*, 2001a). Le fragment TTC a donc bien permis une redistribution spécifique de l'effet de la CT1. L'action de la CT1 nécessite l'activation de récepteurs présents à la surface du motoneurone (LIFR $\beta$ /gp130). De ce fait, elle n'a pas besoin d'être libérée au niveau cytoplasmique pour être active. Il est intéressant de noter que le fragment TTC est présent dans des compartiments vésiculaires de motoneurones embryonnaires en culture qui contiennent également le récepteur ubiquitaire des neurotrophines p75<sup>NTR</sup> (Lalli & Schiavo, 2002). On peut donc supposer que le fragment TTC utilise des voies d'internalisation et de trafic rétrograde neuronal utilisées également par différents facteurs neurotrophiques. Si l'efficacité d'une telle protéine de fusion chez des modèles murins de pathologies neurodégénératives du motoneurone est démontrée, de nouvelles perspectives d'utilisation de ce fragment TTC en tant que vecteur thérapeutique, en particulier associé à d'autres facteurs neurotrophiques, pourront être explorées.

Le fragment TTC a été également utilisé pour modifier le tropisme d'un vecteur adénoviral. Ainsi, la conjugaison au fragment TTC d'un fragment Fab d'un anticorps neutralisant (anti-knob) permet d'associer le vecteur adénoviral au fragment TTC, et on observe dans ce cas une infection par l'adénovirus essentiellement de

cellules de type neuronal (Schneider *et al.*, 2000). Ce ciblage spécifique des neurones est conservé *in vivo* puisque, après injection intramusculaire dans la langue d'un adénovirus permettant l'expression de la  $\beta$ -gal (AdvRSV $\beta$ gal) associé au fragment TTC, on observe une diminution significative du nombre de cellules musculaires et de cellules du tissu conjonctif infectées comparativement à l'injection de AdvRSV $\beta$ gal seul. En revanche, on retrouve dans les deux cas le même nombre de motoneurones contenant de la  $\beta$ -gal dans les noyaux hypoglossaux (Schneider *et al.*, 2000). Une réaction inflammatoire importante, pouvant être due à l'adénovirus non internalisé, est cependant observée.

### CONCLUSION

L'utilisation de protéines de fusion entre le fragment TTC et une protéine rapporteur comme la GFP ou la  $\beta$ -galactosidase facilite et améliore la détection de ce fragment au sein d'un réseau neuronal. Les différentes approches poursuivies par injection des protéines de fusion ou par transgénèse montrent l'intérêt de tels marqueurs pour étudier la connectivité d'un circuit neuronal mais également sa fonctionnalité. Couplés à la spécificité des techniques de recombinaison homologue, ces marqueurs permettront d'intégrer aux données anatomiques des données moléculaires et cellulaires. On devrait ainsi pouvoir appréhender beaucoup plus facilement les conséquences de la mutation d'un gène sur la connectivité et la fonctionnalité d'un réseau ainsi que les conséquences de cette mutation dans la physiopathologie de maladies neurologiques. En ce qui concerne l'utilisation du fragment TTC comme vecteur thérapeutique, de nombreux problèmes restent à résoudre avant d'envisager son utilisation pour la libération neuronale d'une protéine d'intérêt dans un compartiment subcellulaire particulier. Les résultats obtenus en ce qui concernent son utilisation pour cibler spécifiquement aux neurones l'internalisation d'un adénovirus ou l'action d'un facteur neurotrophique sont très encourageants pour une utilisation future. La réalisation de fusions génétiques entre le fragment TTC et divers facteurs neurotrophiques et leurs essais chez des modèles murins de pathologies neurodégénératives du motoneurone devraient confirmer les potentialités du fragment TTC à ce niveau.

**Remerciements.** – Les auteurs tiennent à remercier l'Association Française contre les Myopathies pour leur soutien financier (bourse post-doctorale accordée à S.R.).

### BIBLIOGRAPHIE

- Anderson R. G. W., The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67, 199-225.
- Ariansen S., Afanasiev B. N., Moskaug J. O., Stenmark H., Madhus I. H. & Olsnes S., Membrane translocation of diphtheria toxin A-fragment: role of carboxy-terminal region. *Biochemistry*, 1993, 32, 83-90.
- Barati S., Chegini F., Hurtado P. & Rush R. A., Hybrid tetanus



- toxin C fragment-diphtheria toxin translocation domain allows specific gene transfer into PC12 cells. *Exp. Neurol.*, 2002, 177, 75-87.
- Beaude P., Delacour A., Bizzini B., Domuado D. & Remy M.-H., Retrograde axonal transport of an exogenous enzyme covalently linked to B-IIb fragment of tetanus toxin. *Biochem. J.*, 1990, 271, 87-91.
- Bizzini B., Grob P., Glicksman M. A. & Akert K., Use of the B-IIb tetanus toxin derived fragment as a specific neuropharmacological transport agent. *Brain Res.*, 1980, 193, 221-227.
- Bordet T., Castelnau-Ptakhine L., Fauchereau F., Friocourt G., Kahn A. & Haase G., Neuronal targeting of cardiotoxin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2001a, 17, 842-854.
- Bordet T., Lesbordes J. C., Rouhani S., Castelnau-Ptakhine L., Schmalbruch H., Haase G. & Kahn A., Protective effects of cardiotoxin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice. *Hum. Mol. Genet.*, 2001b, 10, 1925-1933.
- Bordet T., Schmalbruch H., Pettman B., Hagege A., Castelnau-Ptakhine L., Kahn A. & Haase G., Adenoviral cardiotoxin-1 gene transfer protects pmn mice from progressive motor neuronopathy. *J. Clin. Invest.*, 1999, 104, 1077-1085.
- Brown A., Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. *J. Cell Biol.*, 2003, 160, 817-821.
- Coco S., Raposo G., Martinez S., Fontaine J.-J., Takamori S., Zahraoui A., Jahn R., Matteoli M., Louvard D. & Galli T., Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: evidence for a novel membrane compartment. *J. Neurosci.*, 1999, 19, 9803-9812.
- Coen L., Kissa K., Le Mevel S., Brûlet P. & Demeneix B. A., A somatic gene transfer approach using recombinant fusion proteins to map muscle-motoneuron projections in *Xenopus* spinal cord. *Int. J. Dev. Biol.*, 1999, 43, 823-830.
- Coen L., Osta R., Maury M. & Brûlet P., Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 9400-9405.
- DeFalco J., Tomishima M., Liu H., Zhao C., Cai X., Marth J. D., Enquist L. & Friedman J. M., Virus-assisted mapping of neuronal inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science*, 2001, 291, 2608-2613.
- Dobrenis K., Joseph A. & Rattazzi M. C., Neuronal lysosomal enzyme replacement using fragment C of tetanus toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 2297-2301.
- Figueiredo D. M., Hallewell R. A., Chen L. L., Fairweather N. F., Dougan G., Savitt J. M., Parks D. A. & Fishman P. S., Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase to central nervous system neurons by retrograde axonal transport. *Exp. Neurol.*, 1997, 145, 546-554.
- Figueiredo D. M., Matthews C. C., Parks D. A., Fairweather N. F., Dougan G., Wilt S. G. & Fishman P. S., Interaction of tetanus toxin derived hybrid proteins with neuronal cells. *J. Nat. Toxins*, 2000, 9, 363-379.
- Fishman P. S. & Savitt J. M., Transsynaptic transfer of retrogradely transported tetanus protein-peroxidase conjugates. *Exp. Neurol.*, 1989, 106, 197-203.
- Francis J. W., Bastia E., Matthews C. C., Parks D. A., Schwarzschild M. A., Brown Jr R. H. & Fishman P. H., Tetanus toxin fragment C as a vector to enhance delivery of proteins to the CNS. *Brain Res.*, 2004a, 1011, 7-13.
- Francis J. W., Brown R. H., Figueiredo D., Remington M. P., Castillo O., Schwarzschild M. A., Fishman P. S., Murphy J. R. & van der Spek J. C., Enhancement of Diphtheria toxin potency by replacement of receptor binding domain with tetanus toxin C-fragment: a potential vector for delivering heterologous proteins to neurons. *J. Neurochem.*, 2000, 74, 2528-2536.
- Francis J. W., Figueiredo D., vanderSpek J. C., Ayala L. M., Kim Y. S., Remington M. P., Young P. J., Lorson C. L., Ikebe S., Fishman P. S. & Brown Jr R. H., A survival motor neuron:tetanus toxin fragment C fusion protein for the targeted delivery of SMN protein to neuron. *Brain Res.*, 2004b, 995, 84-96.
- Francis J. W., Hosler B. A., Brown R. H. & Fishman P. S., CuZn superoxide dismutase (SOD-1): tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 15434-15442.
- Francis J. W., Ren J. M., Warren L., Brown Jr R. H. & Finklestein S. P., Postischemic infusion of Cu/Zn superoxide dismutase or SOD:Tet451 reduces cerebral infarction following focal ischemia/reperfusion in rats. *Exp. Neurol.*, 1997, 146, 435-433.
- Gil C., Chaib I., Blasi J. & Aguilera J., Hc fragment of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem. J.*, 2001, 356, 97-103.
- Gil C., Chaib I., Pellicioni P. & Aguilera J., Activation of signal transduction pathways involving TrkA, PLCg, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS*, 2000, 481, 177-182.
- Gil C., Chaib-Oukadour I. & Aguilera J., C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signaling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem. J.*, 2003, 373, 613-620.
- Goldstein L. S. B. & Yang Z., Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2000, 23, 39-71.
- Hafezparast M., Klocke R., Ruhrberg C., Marquardt A., Ahmad-Annar A., Bowen S., Lalli G., Witherden A. S., Hummerich H., Nicholson S., Morgan P. J., Oozageer R., Priestley J. V., Averill S., King V. R., Ball S., Peters J., Toda T., Yamamoto A., Hiraoka Y., Augustin M., Korthaus D., Watter S., Wabnitz P., Dickneite C., Lampel S., Boehme F., Peraus G., Popp A., Rudelius M., Schlegel J., Fuchs H., Hrabe de Angelis M., Schiavo G., Shima D. T., Russ A. P., Stumm G., Martin J. E. & Fisher E. M. C., Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, 2003, 300, 808-812.
- Halpern J. L. & Neale E. A., Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1995, 195, 221-241.
- Harder T., Scheffele P., Verkade P. & Simons K., Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.*, 1998, 141, 929-942.
- Herreros J., Lalli G., Montecucco C. & Schiavo G., Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J. Neurochem.*, 2000a, 74, 1941-1950.
- Herreros J., Lalli G. & Schiavo G., C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem. J.*, 2000b, 347, 199-204.
- Herreros J., Ng T. & Schiavo G., Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12, 2947-2960.
- Herreros J. & Schiavo G., Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2002, 291, 447-453.
- Kissa K., Mordelet E., Soudais C., Kremer E., Demeneix B. A., Brûlet P. & Coen L., *In vivo* neuronal tracing with GFP<sub>TTTC</sub> gene delivery. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2002, 20, 627-637.
- Klingenberg O. & Olsnes S., Ability of methotrexate to inhibit translocation to the cytosol of dihydrofolate reductase fused to diphtheria toxin. *Biochem. J.*, 1996, 313, 647-653.

- Knight A., Carvajal J., Schneider H., Coutelle C., Chamberlain S. & Fairweather N., Non-viral neuronal gene delivery mediated by the Hc fragment of tetanus toxin. *Eur. J. Biochem.*, 1999, 259, 762-769.
- Kremer E., Boutin S., Chillon M. & Danos O., Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J. Virol.*, 2000, 74, 505-512.
- Kuypers H. G. J. M. & Ugolini G., Viruses as transneuronal tracers. *Trends Neurosci.*, 1990, 13, 71-75.
- Lacy D. B., Tepp W., Cohen A. C., DasGupta B. R. & Stevens R. C., Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.*, 1998, 5, 898-902.
- Lalli G., Gschmeissner S. & Schiavo G., Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons. *J. Cell Science*, 2003, 116, 4639-4650.
- Lalli G. & Schiavo G., Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup>. *J. Cell Biol.*, 2002, 156, 233-239.
- LaMonte B. H., Wallace K. E., Holloway B. A., Shelly S. S., Ascano J., Tokito M., Van Winkle T., Howland D. S. & Holzbaur E. L. F., Disruption of Dynein/Dynactin inhibits axonal transport in motor neurones causing late-onset progressive degeneration. *Neuron*, 2002, 34, 715-727.
- Lefevre S., Burlet Q., Liu S., Bertrand O., Clermont A., Munnich G., Dreyfuss G. & Melki J., Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*, 1997, 16, 265-269.
- Lesbordes J. C., Cifuentes-Diaz C., Miroglio A., Joshi V., Bordet T., Kahn A. & Melki J., Therapeutic benefits of cardioprotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 2003, 12, 1233-1239.
- London E., Diphtheria toxin: membrane interaction and membrane translocation. *Biochem. Biophys. Acta*, 1992, 1113, 25-51.
- Madshus I. H., Olsnes S. & Stenmark H., Membrane translocation of diphtheria toxin carrying passenger protein domains. *Infect. Immun.*, 1992, 60, 3296-3302.
- Manning K. A., Erichsen J. T. & Evinger C., Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin. *Neuroscience*, 1990, 34, 251-263.
- Maskos U., Kissa K., Saint Clément C. & Brûlet P., Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 10120-10125.
- Matteoli M., Verderio C., Rossetto O., Iezzi N., Coco S., Schiavo G. & Montecucco C., Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 13310-13315.
- Miana-Mena F. J., Muñoz M. J., Ciriza J., Soria J., Brûlet P., Zaragoza P. & Osta R., Fragment C tetanus toxin: a putative activity-dependent neuroanatomical tracer. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2003, 63, 211-218.
- Miana-Mena F. J., Muñoz M. J., Roux S., Ciriza J., Zaragoza P., Brûlet P. & Osta R., A non-viral vector for targeting gene therapy to motoneurons in the CNS. *Neurodegenerative Dis.*, 2004, 1, sous presse.
- Miana-Mena F. J., Roux S., Bénichou J.-C., Osta R. & Brûlet P., Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 3234-3239.
- Monani U., Sendtner M., Coover D. D., Parsons D. W., Andreassi C., Le T. T., Jablonka S., Schrank B., Rossol W., Prior T. W., Morris G. E. & Burghes A. H. M., The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*<sup>-/-</sup> mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9, 333-339.
- Montecucco C., How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.*, 1986, 11, 314-317.
- Murakami T., Nagano I., Hayashi T., Manabe Y., Shoji M., Setoguchi Y. & Abe K., Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated *E. Coli LacZ* gene in mice carrying mutant SOD1 gene. *Neurosci. Lett.*, 2001, 308, 149-152.
- Orrell R. W., Amyotrophic lateral sclerosis: copper/zinc superoxide dismutase (SOD-1) gene mutations. *Neuromusc. Disord.*, 2000, 10, 63-68.
- Pelkmans L., Kartenbeck J. & Helenius A., Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, 473-483.
- Prochiantz A., Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000, 12, 400-406.
- Sapir T., Geiman E. J., Wang Z., Velasquez T., Mitsui S., Yoshihara Y., Frank E., Alvarez F. J. & Goulding M., *Pax6* and *Engrailed1* regulate two distinct aspects of Renshaw cell development. *J. Neurosci.*, 2004, 24, 1255-1264.
- Schiavo G., Matteoli M. & Montecucco C., Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.*, 2000, 80, 717-766.
- Schneider H., Groves M., Mühle C., Reynolds P. N., Knight A., Themis M., Carvajal J., Scaravilli F., Curiel D. T., Fairweather N. F. & Coutelle C., Retargeting of adenoviral vectors to neurons using the Hc fragment of tetanus toxin. *Gene Ther.*, 2000, 7, 1584-1592.
- Schneider S. P. & Fyffe R. E. W., Involvement of GABA and glycine in recurrent inhibition of spinal motor neurons. *J. Neurophysiol.*, 1992, 68, 397-406.
- Shin J. S. & Abraham S. N., Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. *Immunology*, 2001, 102, 2-7.
- Siegel G. J. & Chauhan N. B., Neurotrophic factor in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res. Rev.*, 2000, 33, 199-227.
- Simons K. & Toomre D., Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, 1, 31-40.
- Stenmark H., Moskaug J. O., Madshus I. H., Sandvig K. & Olsnes S., Peptides fused to the amino-terminal end of diphtheria toxin are translocated to the cytosol. *J. Cell Biol.*, 1991, 113, 1025-1032.
- Swaminathan S. & Eswaramoorthy S., Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7, 693-699.
- Ugolini G., Transneuronal tracing with  $\alpha$ -herpesviruses: a review of the methodology. In viral vectors. Gene therapy and Neuroscience Applications. Academic Press, 1995, 293-317.
- Umland T. C., Wingert L. M., Swaminathan S., Furey W. F., Schmidt J. J. & Sax M., Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat. Struct. Biol.*, 1997, 4, 788-792.
- vanderSpek J. C., Mindell J. A., Finkelstein R. & Murphy J. R., Structure/function analysis of the transmembrane domain of DAB<sub>389</sub>-interleukin-2, an interleukin-2 receptor-targeted fusion toxin. The amphipathic helical region of the transmembrane domain is essential for the efficient delivery of the catalytic domain to the cytosol of target cells. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 12077-12082.
- vanderSpek J. C., Sutherland J. A., Ratnarathorn M., Howland K., Ciardelli T. L. & Murphy J. R., DAB<sub>389</sub> interleukin-2 receptor binding domain mutations. Cytotoxic probes for studies of ligand-receptor interactions. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 12145-12149.
- Vyas K. A., Patel H. V., Vyas A. A. & Schnaar R. L., Segregation of gangliosides GM1 and GD3 on cell membranes, isolated membrane rafts, and defined supported lipid monolayers. *Biol. Chem.*, 2001, 382, 241-250.
- Williamson T. L. & Cleveland D. W., Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci.*, 1999, 2, 50-56.