

Université de Limoges

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2000

Thèse n° 161

**La maladie de Charcot-Marie-Tooth :
diagnostic rétrospectif du génotype à partir de
72 biopsies nerveuses**



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 2000

Par

Emmeline Lagrange

Née le 02 Août 1971 à Bayonne

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur J.M. Vallat
Monsieur le Professeur P.Couratier
Monsieur le Professeur A.Laguény
Monsieur le Professeur P.Pollak
Monsieur le Pr Rigaud
Monsieur le Dr F. Tabaraud

Président du jury et Directeur de thèse
Juge
Juge
Juge
Juge
Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude
Monsieur le Professeur DENIS François
Monsieur le Professeur GASTINNE Hervé

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BEDANE Christophe	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	THERAPEUTIQUE
BONNAUD François (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	PNEUMOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	DERMATOLOGIE
BOULESTEIX Jean (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOUTROS-TONI Fernand	PEDIATRIE
CATANZANO Gilbert	BIostatistique et Informatique Médicale
CHARISSOUX Jean-Louis	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	ORTHOPEDIE
COGNE Michel	RADIOTHERAPIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
DARDE Marie-Laure (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PARASITOLOGIE
DENIS François (C.S)	PEDIATRIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DUDOGNON Pierre (C.S)	ANATOMIE
DUMAS Jean-Philippe	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Michel (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel	NEUROLOGIE
DUPUY Jean-Paul (C.S)	MEDECINE DU TRAVAIL
FEISS Pierre (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
GAINANT Alain	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAROUX Roger (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GASTINNE Hervé (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
	REANIMATION MEDICALE

LABROUSSE Claude
LABROUSSE François (C.S)
LASKAR Marc (C.S)
LEGER Jean-Marie (C.S)
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)
MABIT Christian
MAUBON Antoine
MELLONI Boris
MENIER Robert (C.S)
MERLE Louis
MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique
NATHAN-DENIZOT Nathalie
PERDRISOT Rémy
PILLEGAND Bernard (C.S)
PIVA Claude (C.S)
PRALORAN Vincent (C.S)
RIGAUD Michel (C.S)
ROUSSEAU Jacques
SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)
TREVES Richard (C.S)
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S)
VERGNENEGRE Alain
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)

REEDUCATION FONCTIONNELLE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
PSYCHIATRIE D'ADULTES
NEPHROLOGIE
ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
RADIOLOGIE
PNEUMOLOGIE
PHYSIOLOGIE
PHARMACOLOGIE
NEUROCHIRURGIE
CHIRURGIE INFANTILE
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
MEDECINE LEGALE
HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
RHUMATOLOGIE
CANCEROLOGIE
NEUROLOGIE
ANATOMIE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
EPIDEMIOLOGIE- ECONOMIE DE LA SANTE PREVENTION
MEDECINE INTERNE
REANIMATION MEDICALE
CARDIOLOGIE
MALADIES INFECTIEUSES

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE A MI-TEMPS

BUCHON Daniel

MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

A Monsieur le Pr Jean-Michel Vallat
Professeur des Universités de Neurologie
Médecin des Hopitaux
Chef de service

Vous avez su rendre cet exil enrichissant et m'avez permis de profiter au mieux de l'enseignement de la Neurologie. Grâce à vous j'ai pu découvrir les Neurosciences et faire un DEA. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance et de mon estime.

A Monsieur le Pr Philippe Couratier
Professeur des Universités de Neurologie
Médecin des Hopitaux

Tu as su aider l'interne que je suis par ta gentillesse et ton sens de la pédagogie. Tes conseils ont été précieux. Merci pour tout.

A Monsieur le Pr Alain Lagueny
Professeur des Universités de Neurologie
Médecin des Hopitaux
Chef de service

Je vous dois la confirmation de mon désir d'être neurologue. Vous avez su m'encourager dans la période difficile de l'internat. Vous avez toujours pris la peine de me suivre pendant ces années depuis mon externat chez vous. Je suis touchée et émue de vous savoir membre du jury de cette thèse.

A Monsieur le Pr Pierre Pollak
Professeur des Universités de Neurologie
Médecin des Hopitaux
Chef de service

L'humanité et l'intelligence scientifique dont vous témoignez sont un exemple. C'est un honneur pour moi d'avoir travaillé pour vous et de pouvoir continuer à le faire.

A Monsieur le Pr Rigaud
Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire
Chef de service

Vous m'avez permis de travailler dans votre laboratoire et d'accomplir cette thèse. Merci.

A Monsieur le Dr Tabaraud

Vous avez su, avec beaucoup de patience m'apprendre l'électrophysiologie. J'ai apprécié pendant ces années la rigueur de votre travail et vos connaissances, dont j'espère pouvoir témoigner un jour.

A tous, merci pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Monsieur le Dr Tapie

Ce fut une joie de travailler dans votre service et d'assister à vos consultations grâce à l'humanité de votre pratique de médecin. Mille merci.

Au Pr Barat et au Pr JP Castel, qui m'ont permis de découvrir les merveilles de l'exercice de la Neurologie.

Au Pr A. Hahn qui durant son trop court séjour à Limoges a pris la peine de s'occuper de nous. Je regrette que vous ne puissiez être là.

Aux Pr Y. Agid et Pr A. Brice, à Eric Leguern qui m'ont permis d'accomplir un DEA dans leur laboratoire.

A Sandrine Tardieu, sans qui la biologie moléculaire serait restée une vaste inconnue désagréable. Je te dois mon DEA et par conséquent cette thèse. Tu restes mon meilleur souvenir dans cette année de laboratoire. Je suis très heureuse de notre amitié.

A l'équipe du Pr Vallat, Laurence, Martine, Karine et Philippe qui m'ont aidé et soutenu durant ces années.

A Corinne Magdelaine, Francis Hazard, Martine, Monique et l'équipe de Biochimie.

Nic maïté saïtut

A Christophe et à l'enfant que nous attendons
A mes parents, à mes sœurs sans qui je ne serais rien
A Aïtatxi et Amatxi qui sont toute mon enfance

A Isabelle et Caroline
A bien d'autres encore...

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

CMT: Charcot-Marie-Tooth

CX32 : connexine 32

DSS: syndrome de Déjerine-Sottas

EMG: électromyogramme

HNPP: neuropathie par hypersensibilité à la pression

Hot-spot : haut site de recombinaison de mutations ponctuelles

KO : knock-out

MAG : glycoprotéine associée de la myéline

MBP : protéine basique de la myéline

PCR : polymerase chain reaction

P0 : protéine 0

PMP22 : protéine de la myéline périphérique 22kDa

PLP/DM20 : protéine protéolipidique

ROT: réflexe ostéo-tendineux

SSCP : single strand conformation polymorphism

VCN: vitesse de conduction nerveuse

Table des matières

Abréviations	6
Introduction	9
Le support biologique de la maladie de Charcot-Marie-Tooth:	10
La myélinisation.....	10
Organisation de la myéline.....	12
Les Protéines de la myéline impliquées dans le CMT : PMP22, PO, CX32 (schéma 4).....	14
P0	14
PMP22.....	17
CX32	19
Le rôle de la perte axonale	21
La maladie de Charcot-Marie-Tooth :	23
Rappel clinique.....	23
La classification de la maladie de Charcot-Marie-Tooth	24
CMT1 ou CMT démyélinisant.....	25
LE CMT1A	25
LE CMT1B :	26
CMT1 lié au gène EGR2 ou CMTD:.....	27
CMT1C :	27
le CMT 2 : la forme neuronale.....	28
La forme grave du CMT : le syndrome de Déjerine-Sottas (DSS) ou CMT3	30
CMT X : le CMT lié à l’X	32
CMTX de transmission dominante ou CMTX1	32
Les CMT récessifs liés à l’X : CMTX2	34
Les CMT autosomiques récessifs : les CMT4	35
CMT4A :	35
CMT4B :	35
CMT4C :	36
CMT4D :	36
CMT4E :	36
CMT4F :.....	37
La neuropathie tomaculaire ou neuropathie par hypersensibilité à la pression ou HNPP*	38
La clinique du HNPP	38
La biologie moléculaire du HNPP	39
Le CMT et l’hypothèse des gènes modificateurs	40
Matériel et méthodes	41
Les patients	41
La population étudiée.....	41
Le Problème du diagnostic rétrospectif.....	43
La biologie moléculaire.....	44
L’extraction d’ADN :.....	44
La recherche de la duplication-délétion : le dosage génique et l’étude des fragments de jonction.....	44
La recherche de mutations ponctuelles sur les gènes de P0 PMP22 et CX32	45
La stratégie de diagnostic en biologie moléculaire	46
L’étude des biopsies nerveuses	47
Résultats	50
Description de la population CMT1A.....	51

Description générale.....	51
Deux cas particuliers.....	52
Mme V.	52
Enfant N.	52
Description de la population HNPP.....	54
Description de la population porteuse de la délétion en 17p11.2.....	54
Description de la population non porteuse de la délétion en 17p11.2.....	54
Description des patients porteurs de mutations ponctuelles sur le gène de P0.....	55
Mme C.....	55
Mme H.	55
L'enfant B.	56
La description des patients porteurs d'une mutation ponctuelle sur le gène de CX32.....	57
Le cas B.....	57
Le cas G.	57
Le cas J.....	57
Discussion.....	59
Conclusion.....	63
Bibliographie.....	64
Annexe.....	72

Introduction

Le travail présenté dans cette thèse concerne la caractérisation des mutations des gènes des protéines de la myéline associés à la maladie de Charcot-Marie-Tooth.

Nous avons étudié de manière rétrospective 72 cas de biopsies nerveuses de patients CMT.

Nous avons cherché à établir un diagnostic positif en biologie moléculaire de CMT en étudiant le gène de PMP22, P0 et CX32 à partir de l'ADN extrait des biopsies nerveuses.

Dans un second temps, nous avons cherché à établir une corrélation génotype-phénotype pour ces cas.

Dans ce manuscrit, je vais d'abord présenter successivement des rappels sur la myélinisation du système nerveux périphérique, sur l'organisation de cette myéline et les différentes protéines qui la composent, le rappel clinique et la classification de la maladie CMT avant de présenter les résultats obtenus et de les commenter.

Le support biologique de la maladie de Charcot-Marie-Tooth:

La myélinisation

Durant le développement du système nerveux périphérique, les précurseurs des cellules de Schwann dérivent de la crête neurale, migrent et se mettent au contact des axones en développement. Ces cellules de Schwann immatures vont se différencier en cellules myélinisantes ou non selon un processus de migration radiale. Durant cette étape appelée phase pro-myélinisante et nécessaire à l'initiation de la myélinisation, quelques cellules de Schwann établissent une association avec un axone. Ces cellules initient alors un programme d'expression génique des protéines spécifiques de la myéline. Par contraste, les cellules immatures qui n'entrent pas au contact des axones n'activent pas ce programme d'expression génique et deviennent des cellules de Schwann non myélinisantes (schémas 1 et 2). La différenciation en cellules de Schwann myélinisantes ou non, dépend aussi de la continuité avec l'axone qui produit un ou des signaux nécessaires à l'initiation du processus (Eccleston et al 1992) (Kamholz et al., 2000) (Scherer et al, 1997).

Le maintien de cette myélinisation dépend également de cette continuité axone-cellule de Schwann. Si un nerf périphérique est sectionné, séparant les axones et les cellules de Schwann du corps cellulaire neural, l'axone dégénère et la démyélinisation commence, initiant le processus de dégénérescence wallérienne. Durant cette dégénérescence wallérienne, les cellules de Schwann modifient leur pattern d'expression génique : la cellule se comporte comme une cellule de Schwann immature.

L'établissement de la relation cellule de Schwann-axone, la phase promyélinisante du développement sont un prérequis nécessaire au début de la myélinisation. Pour que la myélinisation démarre, il faut que la cellule passe d'un état de promyélinisante à un stade de cellule de Schwann myélinisante (schéma 1). Ce processus est sous contrôle d'une séquence d'événements génétiquement programmés : l'expression des gènes codant pour les protéines spécifiques de la myéline périphérique. Chez les souris n'exprimant le facteur de transcription EGR2 ou KROX20, la cellule de Schwann établit le contact avec l'axone mais la myélinisation n'apparaît pas (Topilko et al., 1996; Topilko et al., 1994): l'expression de KROX20 est donc nécessaire à cette étape. Par contraste chez les souris n'exprimant pas le facteur OCT6 (SCIP) la myélinisation apparaît, mais retardée (Jaegle et al, 1996 et 1998). OCT6 n'est pas nécessaire pour la transition vers la myélinisation mais est nécessaire à son organisation dans le temps. OCT6 et KROX20 sont tous deux des éléments importants dans le programme génétique de la maturation de la cellule de Schwann de la phase promyélinisante à la phase myélinisante. OCT6 et KROX20 sont des facteurs de transcription génique : leur rôle est d'activer la transcription des protéines spécifiques de la myéline.

Warner et al ont décrits deux familles cliniquement porteuses de CMT de type démyélinisant lié à une mutation ponctuelle du gène de EGR2. Les mutations de EGR2 ségrègent selon un mode autosomique dominant et ont été retrouvées dans la région doigt de zinc de la protéine qui interagit avec le DNA. Une autre famille avec un phénotype d'hypomyélinisation congénitale et liée à une mutation ponctuelle de EGR2 a été identifiée par ces auteurs. Cette

mutation ségrège selon un mode autosomique récessif : la mutation siège dans la région externe au domaine de fixation du DNA, et qui interagit avec un co-répresseur NAB (Warner et al., 1998). L'identification de ces familles confirme le rôle important de EGR2 dans la régulation de la myélinisation périphérique. Plus récemment (Pareyson et al , 2000), son rôle dans la myélinisation des nerfs crâniens a été mis en évidence par l'étude d'une famille CMT1 avec atteinte multiples des nerfs crâniens (V,VI,VII,IX,X) et dont le phénotype est lié à une mutation d'EGR2 en ARG381HIS.

Organisation de la myéline

La myéline est une structure membranaire multi-lamellaire et compactée (schéma 3). Elle est synthétisée par les prolongements cytoplasmiques des cellules gliales. La membrane de la cellule de Schwann s'aplatit pour former un mince feuillet qui s'enroule plusieurs fois autour de l'axone. L'extension formée par la membrane plasmique de la cellule de Schwann initie un enroulement autour d'un axone, en respectant un espace périaxonal, puis le prolongement s'allonge, glisse sous la couche nouvellement formée et s'enroule en spirale jusqu'à atteindre un nombre de tours caractéristiques de l'axone myélinisé.

Pendant la dernière étape de la myélinisation, la compaction des différentes lamelles de myéline intervient caractérisée par l'extrusion du cytoplasme hors des enroulements de membrane.

Dans le système nerveux périphérique, une cellule de Schwann ne myélinise qu'un unique segment d'axone. Les segments de myéline ou internodes, alternent avec de courtes régions où l'axolème n'est pas myélinisé : les nœuds de Ranvier. De part et d'autre de ces nœuds de

Ranvier se trouve l'espace paranodal où la myéline est moins compactée. Dans cet espace paranodal, chaque enroulement de myéline forme une languette membranaire appelée boucle paranodale. Les incisures de Schmidt-Lantermann contiennent aussi du cytoplasme. Les boucles les plus externes des internodes adjacents s'entrecroisent et recouvrent le nœud de Ranvier.

Le diamètre des axones varie de 3 à 18 μ m, l'internode présente une longueur de 400 à 1500 μ m et la spirale de myéline peut comprendre jusqu'à 100 couches (4 μ m d'épaisseur).

En microscopie électronique, la gaine de myéline apparaît formée par l'alternance de « lignes denses majeures » correspondant à l'accolement des faces cytoplasmiques de la membrane plasmique, et de « doubles lignes intrapériodiques » correspondant à l'adhérence des faces externes de 2 couches adjacentes (schéma 4).

Cette myéline est une membrane particulière formée à 70% de lipides et à 30% de protéines, ce rapport étant inversé par rapport aux autres membranes. La composition de la myéline en protéines est caractéristique. Elle est différente dans la myéline compacte où MBP, P0, PMP22 sont majoritaires et dans la myéline non compacte où MAG et Connexine 32 prédominent (schéma 4).

**Les Protéines de la myéline impliquées dans le CMT : PMP22, PO, CX32
(schéma 4)**

Une fois que la cellule de Schwann a établi son contact avec l'axone, et que la myélinisation est initiée, les composants nécessaires à l'assemblage de cette myéline s'accumulent de façon coordonnée. Les ARNm codant pour les protéines, PO, PMP22, CX32, MBP, MAG ainsi que les ARNm des enzymes correspondant s'accumulent avec une cinétique pré-établie de manière à ce que tous les protéines structurales et les constituants de la membrane soient disponibles durant la synthèse myélinique (Garbay et al., 1995; Garbay and Bonnet, 1992), (Bruzzone and Ressot, 1997)

PO

Elle représente plus de 50% des protéines de la myéline périphérique. C'est une protéine transmembranaire de 30kDA composée d'un domaine extra-cellulaire (PO ex.) de type immunoglobuline glycosylée suivi d'un domaine transmembranaire (Pham-Dinh et al., 1993) et d'une région intracellulaire contenant un grand nombre de résidus basiques. Les monomères de PO s'autoassemblent pour former des tétramères orientés autour d'un pôle

(schéma 5). Le domaine extra-cellulaire glycosylé de P0 est impliqué dans des interactions homotypiques responsables de l'accolement des faces externes de la membrane de la cellule de Schwann qui forme la double ligne périodique de la myéline compacte.

Une quarantaine de mutations du gène de P0 ont été rapportées chez des patients atteints de neuropathies périphériques, quelles soient de type CMT1B, Déjerine-Sottas (DSS) ou hypomyélinisation congénitale (HC) (Blanquet-Grossard et al., 1995; Blanquet-Grossard et al., 1996; De Jonghe et al., 1997; Latour et al., 1995; Pareyson et al., 1999; Warner et al., 1996). Certaines mutations provoquent une non compaction de la myéline, alors que d'autres entraînent un amincissement et une hypermyélinisation locale (tomaculum), la myéline résiduelle restant compacte (Gabreels-Festen et al., 1996).

L'inactivation du gène a montré que la souris hétérozygote P0 présente histologiquement des anomalies comparables à celles retrouvées sur les biopsies de CMT1B humain, tandis que la souris homozygote P0^{-/-} a des anomalies histologiques comparables à celles retrouvées sur les biopsies de cas de Déjerine-Sottas (DSS). Chez les poulets, l'expression de P0 commence dans la crête neurale bien avant l'apparition des cellules de Schwann immatures, suggérant que P0 ait un rôle plus important que celui d'une protéine de structure. Xu (Xu et al., 2000) a étudié le rôle de P0 dans la myélinisation chez les souris KO (knock-out) de P0. L'absence de P0 conduit à la formation d'un seul type de cellule de Schwann. Les souris n'expriment pas PMP22, ont un taux de MAG et PLP/DM20 augmenté alors que celui de MBP est diminué. La répartition des protéines est différente chez ces KO de P0 : MAG est présente au niveau de la myéline non compactée qui est très abondante et est absente des nœuds de Ranvier ou les incisures de Schmidt-Lantermann, ces 2 structures étant par ailleurs mal formées. MBP est localisée uniquement dans les quelques zones bien compactées de la myéline. L'augmentation de MAG dans le nerf périphérique de ces KO de P0 est bien le résultat d'une augmentation des zones de myéline décompactées et, la conséquence ou la cause, d'une anomalie de la

morphogénèse de la myéline dans le nerf périphérique de ces animaux. Cet aspect très particulier correspond probablement à l'aspect embryonnaire de la myélinisation, alors que P0 n'est pas encore présente. L'augmentation de PLP/DM20 pourrait être le signe d'un mécanisme compensateur de la cellule de Schwann pour restaurer la compaction de la myéline en l'absence de P0 et en association avec le peu de MBP présente (Xu et al., 2000). Ceci suggère que P0 ait un rôle de régulateur de l'expression des gènes et de la morphogénèse de la myélinisation.

2 voies de régulation seraient possibles : une voie directe et une indirecte. P0 pourrait médier la myélinisation par l'expression d'un signal de type cadherine ou integrine (Gumbiner, 1996; Zhong et al., 1999). Dans ce modèle, l'adhésion médiée par P0 serait dépendante des interactions entre le cytoplasme de P0 et le cytosquelette. La modulation de ces interactions pourrait altérer l'adhésion médiée par P0 et l'expression génique des autres protéines. Des mutations dans le domaine intracytoplasmique de P0 ont montré qu'elles diminuaient l'adhésion *in vitro* des feuilletts myéliniques et donnaient des phénotypes sévères de CMT1B (Warner et al., 1999a).

La voie indirecte serait dépendante de l'expression des cadherines. Dans ce modèle, l'adhésion médiée par P0 serait nécessaire à la compaction de la myéline et à la localisation correcte des molécules d'adhésion au sein de la cellule de Schwann myélinisante. Khamholz et al ont démontré que l'expression des cadhérines est effondrée chez les KO de P0 (Kamholz et al., 2000).

En clinique, cette anomalie des voies de régulation de la myéline est illustrée par les hypomyélinisations dues à des mutations ponctuelles de P0 (mutation SER49LEU).

PMP22

C'est une glycoprotéine comportant quatre domaines transmembranaires (schéma 6) et qui constitue 2 à 5% de la myéline périphérique. La première mutation a été identifiée chez la souris Trembler : le phénotype histologique des souris hétérozygotes est comparable aux anomalies histologiques du CMT1 de l'humain tandis que la mutation à l'état homozygote engendre un phénotype histologique plus comparable à celui d'un DSS (Adlkofer et al., 1997a; Garbay et al., 1995; Garbay et al., 1999). La majorité des cas de CMT1 (70%) est associée à une duplication du gène de PMP22 inclus dans la région 17p11.2.

Un effet gène dosage (LeGuern et al., 1995; Lupski, 1992; Lupski and Garcia, 1992) est responsable du phénotype de CMT1A, les patients étant porteurs de 3 copies du gène au lieu de 2 (duplication) alors que les patients HNPP ont une copie du gène au lieu de 2 (délétion). Les études de l'expression de PMP22 ont confirmées cette hypothèse. Vallat et al (Vallat et al., 1996) ont montré chez 2 patients CMT1A et 2 patients HNPP que le taux de protéine PMP22 quantifié par immunohistochimie ultrastructurale était fonction du nombre de copies du gène.

Le mécanisme responsable de cette duplication-délétion est la conséquence en miroir d'un même événement chromosomique (schéma 7). Une recombinaison inégale survient dans les gamètes d'un ancêtre entre les 2 chromosome homologues 17, produisant une gamète porteuse d'un chromosome 17 dupliqué, et une autre gamète porteuse d'un chromosome 17 délété. Ce mécanisme est expliqué par l'existence de deux séquences homologues qui flanquent la région 17p11.2, les CMT1A-REPs proximal et distal. Leur mauvais appariement induirait la recombinaison inégale (Lopes et al., 1996; Lopes et al., 1997).

L'effet délétère de la duplication en 17p11.2 diffère de celui de la délétion. Si l'on greffe du nerf sciatique de CMT1A sur du nerf dénudé de souris, on observe en proximal une accumulation de neurofilaments et mitochondries avec une augmentation de l'aire axonale

alors qu'en distal, on note une perte axonale avec une dégénérescence et une atrophie importante. La myélinisation est, de plus, retardée. Si la greffe concerne du nerf de HNPP, ces anomalies sont moins étendues. Ces travaux montrent que la duplication de PMP22 dans la cellule de Schwann donne des anomalies de l'organisation du cytosquelette axonal avec pour conséquences une dégénérescence axonale et une perte des fibres. L'effet délétère sur le cytosquelette axonal provoqué par la délétion est moindre (Sahenk et al., 1999).

Si l'effet gène-dosage a pu être impliqué dans la pathogénie du CMT ou du HNPP, le rôle de PMP22 est encore hypothétique et controversé. PMP22 aurait pour certains auteurs un rôle double, à la fois un rôle structural (maintien de la stabilité de la myéline), et un rôle dans le développement en réglant la différenciation ou l'apoptose des cellules de Schwann (Chance et al., 1992; Garbay et al., 1995; Garbay et al., 1999). PMP22 s'accumule chez les patients porteurs de la duplication en 17p11.2 dans les gaines de myéline alors que chez les patients porteurs de mutation ponctuelle PMP22 s'accumulent dans les cellules de Schwann (Hanemann et al., 2000). PMP22 a une analogie structurale avec une protéine impliquée dans l'arrêt de la prolifération cellulaire (Manfioletti et al., 1993; Manfioletti et al., 1990). Les travaux de ces 2 auteurs s'accordent pour donner un rôle à PMP22 dans l'arrêt de l'expression génique dans la cellule de Schwann.

PMP22 interagit avec P0 dans le réticulum endoplasmique. Si le mutant PMP22 est complexé avec P0 durant sa synthèse ou son transport, alors les 2 protéines peuvent être séquestrées dans le réticulum. La baisse du taux de P0 exacerbe le phénotype dû à la perte de fonction PMP22 (Fabrizi et al., 1999; Fabrizi et al., 1998) l'expression phénotypique se rapproche de celle des CMT1B.

PMP22 interagit très certainement avec d'autres protéines, c'est le schéma des interactions multimériques (Lupski, 2000a; Lupski, 2000b) . Ce schéma est supporté par l'observation phénotypique des patients DSS porteurs de mutations récessives de PMP22. La mutation récessive se comporte comme s'il y avait un effet gain de fonction par analogie avec le CMT1A qui est du à une augmentation du nombre de copies du gène. Les interactions de PMP22 peuvent être hétéromultimériques (schéma 8) : la mutation récessive empoisonne ses partenaires potentiels, et plus le nombre de copies de l'allèle muté augmente plus le phénotype est sévère. Dans ce modèle, le phénotype normal des hétérozygotes est expliqué par la compétition remportée par la protéine saine sur celle mutante lors des interactions. Dans le schéma des interactions de type homomultimérique, les protéines mutées peuvent s'assembler entre elles : plus le nombre de protéines mutées et assemblées augmentent plus le complexe est instable et le phénotype grave (DSS). Le complexe peut être stable si ce nombre est relatif (CMT1). Le phénotype normal résulte de la stabilisation du complexe par l'association protéines mutées et protéines normales.

CX32

La Connexine-32(CX32) est une protéine de la gap-junction. Elle se situe au niveau de la myéline non compacte, retrouvée au niveau des noeuds de Ranvier et des incisures de Schmidt-Lantermann qui la sécrètent (Bergoffen et al., 1993). Son poids moléculaire est de 32

kDA et son taux est directement relié à l'intégrité des relations axone-myéline (Scherer et al., 1999; Scherer et al., 1998).

CX 32 est formée de 4 domaines transmembranaires (schéma 12). Les extrémités amino et carboxy terminales sont dans le cytoplasme et comportent 4 parties hydrophobes, qui ont une topologie d'hélices alpha arrangées parallèlement, reliées les unes aux autres par une boucle cytoplasmique et 2 boucles extracellulaires. Ces différentes boucles influent sur la physiologie de la molécule (Bruzzone and Giaume, 1999; Bruzzone and Ressot, 1997; Bruzzone et al., 1996). Les connexines s'assemblent entre elles par groupe de 6, pour former des structures tubulaires creuses appelées connexons (schéma 9). Quand 2 cellules entrent en contact, leurs connexons s'alignent pour établir un canal hydrophile d'une longueur de 10nm. Ce canal met en communication directe le cytoplasme de ces cellules: c'est la jonction communicante ou gap-junction. Cette communication cellulaire permet un couplage dit jonctionnel (ions, nucléotides, AMPc et protéines de PM inf.à1000D) (schéma 10: Bruzzone et al., 1996)

Plus de 130 mutations ont été décrites (Ionasescu et al., 1995). Elles engendrent soit une perte d'effet de la « gap-junction » (incapacité à s'insérer dans la membrane cytoplasmique) soit un effet dominant-négatif sur les autres protéines (Omori et al., 96). Par l'étude sur les paires d'oocytes de Xénope appariées, Ressot et al (Ressot et al., 1998; Ressot et al., 1996) ont démontré 2 types fonctionnels de mutation. Certaines mutations entraînent une perte totale de la capacité à former des canaux fonctionnels : ce sont les mutations des domaines transmembranaires ou de la 2^o boucle extracellulaire de la protéine. D'autres sont capables d'induire des courants macroscopiques du même ordre de grandeur que la Connexine 32 normale : ce sont les mutations du domaine cytoplasmique (schéma 12).

Bien qu'en rapport avec une mutation du gène d'une protéine de myéline, le CMT lié à l'X est décrit cliniquement comme une forme axonale. La justification en est une anomalie des

relations axone-myéline avec perte de l'intégrité axonale : la CX32 mutée entraînant une perte de fonction de la gap-junction, passage des nutriments axonaux (Hahn et al 1990). Le modèle animal de CMTX va à l'encontre de cette hypothèse.

Le modèle animal du CMTX, la souris délétée de CX32 à l'état homozygote ou hétérozygote, est une souris viable et fertile mais qui affiche un amaigrissement de 17% en moyenne. Les anomalies développées par l'animal sont essentiellement hépatiques : la CX32 altère la signalisation du nerf sympathique à travers le lobe hépatique et a pour conséquence une diminution de 78% de la mobilisation du glucose. Dans un 1^o temps les souris mâles ou femelles ne développent aucune anomalie neurologique. Par la suite, les souris développent des anomalies de la myéline avec l'apparition de bulbes d'oignon, d'un espace périaxonal élargi et des VCN ralenties (Anzini et al 1997).

Le rôle de la perte axonale

Bien que la démyélinisation soit la marque pathologique et physiologique du CMT, les signes cliniques et les symptômes de la maladie sont probablement dus à l'atteinte axonale. Certains enfants avec des vitesses de conduction nerveuse basses (VCN) avant même tous symptômes de la maladie gardent des valeurs similaires au cours de l'aggravation clinique de leur CMT, suggérant que la démyélinisation ne suffit pas à expliquer leurs symptômes (Garcia, 1998). De même, Krajewski et al ont montré que la faiblesse ressentie par les patients CMT1A est

corrélée aux valeurs des potentiels moteurs et non pas à celles des VCN. Les souris « Tremblers », qui ont un phénotype de CMT1A par mutation ponctuelle de la PMP22, ont des anomalies axonales sévères : altérations de la phosphorylation des neurofilaments, perte du transport axonal (Krajewski et al., 1999; Krajewski et al., 2000 ; Lupski, 2000a). Ceci repose sur la perte du contact axonal avec la cellule de Schwann : la perte de cette interaction par la démyélinisation du CMT pourrait être responsable de la dégénérescence axonale. La cellule de Schwann émettrait des signaux qui interagiraient avec l'axone pour le transport, la phosphorylation des neurofilaments (Sahenk, 1999; Sahenk and Mendell, 1999; Scherer, 1999; Scherer and Fischbeck, 1999) ;

La prévention de cette perte axonale serait une piste thérapeutique (Kamholz et al., 2000).

La maladie de Charcot-Marie-Tooth :

Rappel clinique

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) constitue un syndrome qui fait partie du cadre des neuropathies héréditaires motrices et sensitives. Le CMT est la neuropathie héréditaire la plus fréquente avec une prévalence de 1/2 500 (Skre et al., 1974). Elle est caractérisée par une atrophie musculaire et une neuropathie sensitivo-motrice progressive touchant les extrémités des membres. La maladie débute en général avant l'âge de 20 ans aux membres inférieurs. Elle se manifeste par une amyotrophie et une faiblesse musculaire de topographie distale (pieds et mollets aux membres inférieurs, mains et avant-bras aux membres supérieurs). Les troubles sensitifs de même topographie y sont associés ainsi que fréquemment des pieds creux. L'évolution est chronique et lentement progressive. La gêne fonctionnelle est très variable d'un individu à l'autre. Certaines formes sont très handicapantes et mettent en jeu le pronostic vital par atteinte diaphragmatique.

Le phénotype des patients dépend du défaut génique responsable de la maladie. Les formes cliniques varient selon le gène incriminé, selon le site de la mutation sur le gène, selon des facteurs environnementaux et selon des facteurs non encore connus comme probablement les gènes modificateurs. Ces différents phénotypes seront décrits avec la classification clinique du CMT.

La classification de la maladie de Charcot-marie-Tooth

Il est actuellement admis que l'examen électrophysiologique permet de distinguer plusieurs formes de CMT, (Birouk et al., 1997b). En effet, l'étude des vitesses de conduction motrices (VCM) différencie des CMT1 ou démyélinisants ($VCM < 30\text{m/s}$), des CMT2 ou axonaux ($VCM > 40\text{m/s}$) et des CMT intermédiaires ($30 < VCM < 40\text{m/s}$). A côté de ces formes sont ajoutées des formes graves de CMT : le syndrome de Déjerine-Sottas (DSS) et l'hypomyélinisation congénitale (HC ou CMT4B).

Au sein de chaque type, différents modes de transmission sont rencontrés : autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X. La transmission dominante est prépondérante en Europe alors que le mode autosomique récessif est fréquent dans certaines régions du monde (Maghreb) du fait d'un taux anormalement élevé de consanguinité et qui peut concerner aussi certains groupes ethniques. Il existe des cas sporadiques qui correspondent souvent à des mutations de novo qui se transmettent alors selon un mode autosomique dominant.

Par ailleurs, plus récemment la mise en évidence d'anomalies géniques détectées par les études en biologie moléculaire a apporté de nombreux éléments à prendre en compte dans le cadre d'une classification ; il en résulte une complexité évidente. Si le phénotype des CMT1A est bien individualisé ainsi que celui des neuropathies tomaculaires ou HNPP il n'en est pas de même pour les CMT liés à des mutations ponctuelles des gènes des protéines spécifiques de la myéline périphérique. En effet une même entité clinique peut être liée à des mutations différentes des gènes des protéines de la myéline et inversement les mêmes mutations ponctuelles peuvent donner des phénotypes différents (schéma 11).

CMT1 ou CMT démyélinisant

La vitesse de conduction du nerf médian (VCM) est <35 m/s. Le CMT1 est le plus fréquent des CMT.

LE CMT1A

Dans 70% des cas, le CMT1 est du à une duplication de la région 17p11.2 contenant le gène de PMP22 (Nelis et al., 1997). Le phénotype de ces CMT1 dits CMT1A est homogène. Birouk et al ont réalisé une étude clinique et électrophysiologique sur 119 patients CMT1A (Birouk et al., 1997a). La première manifestation clinique apparaît avant l'âge de 10 ans dans 50% des cas et avant l'âge de 20 ans dans 70% des cas. Le signe clinique prédominant est une faiblesse musculaire dans les membres inférieurs. Tous les patients porteurs de la duplication en 17p11.2 ont des anomalies cliniques à l'examen soit des pieds creux soit une abolition des réflexes ostéotendineux aux membres inférieurs. Les vitesses de conduction motrices sont uniformément abaissées sur tous les nerfs et sont < à 33m/s sur le médian. Les potentiels sensitifs sont anormaux dans tous les cas, même s'il n'y a pas de déficit sensitif clinique. Le ralentissement des vitesses de conduction est observé constamment chez tous les porteurs de la duplication en 17p11.2, même chez les patients cliniquement indemnes confirmant la pénétrance complète de la duplication et faisant de l'étude des vitesses du nerf médian un examen de dépistage. La gêne fonctionnelle engendrée est très variable mais peu sévère pour 96% des patients qui sont autonomes. 25% des cas sont asymptomatiques. Un âge de début précoce, des vitesses effondrées sont des éléments

prédictifs d'évolution vers une forme sévère de la maladie. Le CMT1A est une maladie chronique lentement progressive. Le phénotype est variable intra-familialement et même pour des paires de jumeaux homozygotes (Garcia et al., 1995) supportant l'hypothèse des gènes modificateurs.

L'étude anatomo-pathologique met en évidence une diminution du nombre des axones particulièrement ceux de gros calibre, une myéline d'épaisseur diminuée et des images en bulbes d'oignon dues à une prolifération des cellules de Schwann.

LE CMT1B :

Le CMT1B est une forme de la maladie de Charcot-Marie-Tooth liée au gène de la protéine P0. Sa fréquence est rare allant de 1 à 3% selon les séries. La 1^o description clinique remonte à 1970 (Bird et al 1983) avec la découverte d'une mutation ponctuelle sur le gène de P0 en position 34 (Hayasaka et al., 1993a; Hayasaka et al., 1993b; Ikegami et al., 1997) et affectant le domaine extracellulaire de la protéine. Cette famille, pour laquelle nous avons actuellement un recul de 20 ans, se caractérise par un âge de début précoce (avec un retard d'acquisition de la marche), des vitesses de conduction effondrées de l'ordre de 10m/s et par une grande hétérogénéité clinique entre les différents membres porteurs. Tous sont cependant peu invalidés avec une autonomie préservée. Depuis d'autres mutations ponctuelles de P0 ont été associées au CMT. Un haut lieu de mutation a été décrit en ARG98 (Laguëny et al., 1999; Rouger et al., 1996): sur une série de 30 patients européens CMT1 non porteurs de la duplication en 17p11.2, 5 étaient porteurs de la mutation en ARG98. Selon le type de mutation, le phénotype est plus ou moins sévère. La mutation ARG98CYS par la création d'un pont disulfure ferme la boucle du domaine immunoglobuline-like de PO, empêchant celle-ci de créer la double ligne intra-périodique: les patients ont des VCN effondrées, ont des

troubles de la marche importants et l'un d'eux est même un enfant qui n'a jamais acquis la station debout. Le phénotype se rapproche de celui d'un DSS. La mutation ARG98HIS ne donne elle qu'un phénotype peu sévère de la maladie. La mutation pourrait interrompre les interactions entre les différentes protéines P0 qui sont importantes pour la formation des tétramères.

Une autre mutation fréquente de P0 associée au CMT1B est la mutation SER49LEU. 67% des mutations de P0 liées au CMT1B ont lieu sur l'exon3 et 13% sur l'exon1 (De Jonghe et al,1999).

CMT1 lié au gène EGR2 ou CMTD:

Pareyson et al (Pareyson et al., 2000) ont décrit une famille de CMT1 avec atteinte multiples des nerfs crâniens (V,VI,VII,IX,X) et dont le phénotype est lié à une mutation d'EGR2 en A381His. ceci illustre le rôle d'EGR2 dans la myélinisation des nerfs crâniens.

CMT1C :

Le CMT1C est une forme démyélinisante de CMT pour laquelle le défaut génique n'est pas encore élucidé. On parle de CMT1C pour les CMT1 non dupliqués et non liés à des mutations ponctuelles des protéines connues de la myéline, PMP22, P0 ou du gène EGR2.

Dans la définition du CMT1C, les mutations de la Connexine 32 n'ont pas à être exclues mais aux vues des travaux récents (Tabaraud et al., 1999) ceci paraît être une évidence.

le CMT 2 : la forme neuronale

La vitesse de conduction du nerf médian est > 40 m/s. Le CMT2 représente de 20 à 30 % des CMT selon les études. Ces estimations sont difficiles à confirmer car le diagnostic du CMT2 est souvent délicat. De plus, le CMT2 est hétérogène sur le plan clinique et électrophysiologique. En effet, on distingue la forme axonale, avec atteinte motrice et sensitive, de la forme spinale sans altération des voies sensibles. Sa transmission est principalement autosomique dominante et, à l'inverse du CMT1A, sa pénétrance est âge dépendant. Il existe aussi des cas isolés. Le CMT2 est hétérogène sur le plan génétique. Différents loci ont été individualisés : 1p35-36 (CMT2A), 7p14 (CMT2A)3q13-22 (CMT2B), 9q22(CMT2B), 3q23(CMT2B). Ces familles sont caractérisées par une atteinte motrice et sensitive sévère, prédominant sur les membres inférieurs avec des ulcères cutanés de la voûte plantaire par lésion de la voie thermoalgésique (Ellsworth et al., 1999; Timmerman et al., 1999). La famille CMT2B liée au locus 3q23 est caractérisée par l'association blépharophimosis-ptosis-épicanthus : le gène SOX14 situé dans cette région n'est pas responsable ce phénotype (Hargrave et al., 2000). Une autre forme de CMT2 a été individualisée et liée au locus 7p14 (CMT2D) : les patients ont une atteinte des 4 membres avec une prédominance sur les membres supérieurs. Le CMT2C est une forme particulière de CMT avec atteinte diaphragmatique et paralysie des cordes vocales. Son locus est encore inconnu (Nagamatsu et al., 2000). Le CMT spinal est lié aux loci 12q24 et 7p1q15.

Des formes cliniques de CMT2 ont été liées à des mutations ponctuelles de P0 ou même de la Connexine-32 (Marrosu et al., 1998; Senderek et al., 2000). Les familles CMT2 liées à des mutations ponctuelles de P0 ont des phénotypes particuliers. Plusieurs équipes (De Jonghe et al., 1999; Senderek et al., 2000) ont noté des anomalies des nerfs crâniens à type de

surdité, d'anomalies pupillaires, et une sensibilité très perturbée. La mutation la plus fréquente est la mutation THR114MET. Elle a été retrouvée chez 7 familles et 2 patients isolés d'origine belge (De Jonghe et al., 1999). Tous ont un phénotype en commun. Leurs VCN vont de moins de 38m/s   la normale, rendant leur classification en CMT1 ou CMT2 difficile. Ces patients sont atteints d'anomalies pupillaires, d'ataxie sensitive. Ils ont la particularité d'avoir un ancêtre en commun (effet g ne fondateur). La famille allemande décrite par Senderek et al (2000) a des VCN du médian à 35m/s ce qui pourrait en faire un CMT1 mais la biopsie est en faveur de lésions axonales prépondérantes. Les patients n'ont pas d'anomalies pupillaires sauf un, qui est par ailleurs victime d'une intoxication chronique aux métaux lourds. Ce patient est sourd. Une analyse des haplotypes a permis d'éliminer chez cette famille allemande l'existence d'un ancêtre commun avec les familles belges faisant du codon THR114 un possible « hot-spot » pour le CMT2 lié à P0. Pour l'équipe de Senderek la fréquence des mutations ponctuelles de P0 est sous estimée dans le CMT2 car non recherch e en diagnostic de routine. La fréquence retrouvée par leur équipe est de l'ordre de 5%.

Il existe également des formes de CMT2 de transmission récessives (Gabreels-Festen et al., 1992; Ouvrier, 1996; Ouvrier and Nicholson, 1995; Tazir and Geronimi, 1990)

La forme grave du CMT : le syndrome de Déjerine-Sottas (DSS) ou CMT3

Il s'agit d'une forme cliniquement individualisée de CMT 1. Le syndrome décrit pour la première fois en 1891 par Déjerine et Sottas est une neuropathie hypertrophique de l'enfance à hérédité autosomique récessive. L'autonomie de cette entité est aujourd'hui discutée même si des auteurs comme Dyck et Lambert ont continué à l'individualiser : début très précoce, dès la naissance ou à l'acquisition de la marche, atteignant rapidement les quatre membres, aréflexie généralisée, ataxie proprioceptive. L'appellation a été étendue : en particulier, des formes graves de CMT démyélinisants sont désignées syndrome de Déjerine-Sottas bien que leur transmission soit autosomique dominante. Le syndrome de Déjerine-Sottas peut être dans ces cas de transmission dominante lié à une duplication en 17p11.2, à des mutations ponctuelles de PO, PMP22, EGR2.

Les formes de transmission récessive sont liées à des mutations ponctuelles de PMP22. La 1^o mutation ponctuelle décrite est celle THR118MET, mise en évidence chez un patient de 76 ans très sévèrement atteint (Roa et al., 1993a; Roa et al., 1993b). Ce patient est porteur d'une délétion en 17p11.2 sur un chromosome (mutation HNPP) et sur l'autre chromosome de la mutation THR118MET. Ses 2 fils ont hérité de la délétion 17p11.2 et ont un phénotype classique de neuropathie tomaculaire (HNPP). Le fils, hétérozygote pour la mutation THR118MET, n'a aucune anomalie des VCN et aucun signe clinique de neuropathie ; en raison de ce phénotype normal chez ce fils la mutation a été décrite comme récessive. Pour d'autres, cette mutation THR118MET est un polymorphisme soit un variant bénin sur le gène de la protéine PMP22. Certains (Roa et al., 1993b) ont rapporté le cas d'un CMT1 récessif causé par l'expression hémizygotique d'un allèle récessif de PMP22. Il s'agit

d'une femme de 57 ans de type CMT1 (VCN<22m/s) avec 6 personnes non atteintes dans la fratrie. Elle est porteuse de la délétion en 17p11.2 et d'une mutation ponctuelle sur PMP22, TRYP157ARG. Cette mutation a aussi été décrite chez dans une famille de DSS de transmission récessive avec consanguinité des parents, qui sont non atteints ; ces parents sont hétérozygotes pour la mutation TRYP157ARG . La plupart des mutations récessives sont de type perte de fonction. Ici, le phénotype est moins grave lors de l'expression hémizygote de la mutation (CMT1) que lors de l'expression homozygote (DSS). Ceci suggère un mécanisme de type gain de fonction récessif, qui va avec l'hypothèse des interactions multiples de PMP22 avec d'autres protéines.

CMT X : le CMT lié à l'X

La transmission en est autosomique dominante (absence de transmission père fils) par mutation ponctuelle sur le gène de la Connexine 32. On parle alors de CMTX1. Lorsque la transmission est récessive liée à l'X on parle de CMTX2.

CMTX de transmission dominante ou CMTX1

L'étude des vitesses de conduction est variable durant l'évolution du CMTX et selon le sexe du propositus. Les hommes sont plus sévèrement atteints que les femmes. Leur maladie débute en général avant leur 20^e année et ils présentent des vitesses de conduction entre 25 et 40m/s, vitesses de l'ordre de celles du CMT1. A l'inverse, les femmes ont des vitesses normales qui, avec l'évolution de la maladie peuvent devenir de type intermédiaire. Il existerait un mosaïcisme dans les cellules de Schwann chez les femmes qui suivant l'inactivation du X pourrait expliquer qu'elles soient moins atteintes (Scherer et al., 1997). Actuellement devant tout CMT non lié à la duplication en 17p11.2, et sans transmission père fils un diagnostic de CMTX est possible et doit être évoqué.

Il existe plus de 130 mutations de la Connexine 32 qui sont réparties tout le long du gène et même dans la partie intronique (Ionasescu et al., 1996; Ionasescu et al., 1995; Ionasescu, 1998). De 25% à 50% des patients ayant un CMTX n'ont pas de mutation dans la région codante du gène (Latour et al., 1997a; Latour et al., 1997b). D'un point de vue fonctionnel, ces mutations ont 2 types de comportement (Bruzzone and Ressot, 1997;

Bruzzone et al., 1996; Ressot and Bruzzone, 2000) (schéma 12). Certaines mutations entraînent une perte totale de la capacité à former des canaux fonctionnels : ce sont les mutations des domaines transmembranaires ou de la 2^o boucle extracellulaire de la protéine. D'autres sont capables d'induire des courants macroscopiques du même ordre de grandeur que la Connexine 32 normale : ce sont les mutations du domaine cytoplasmique.

Le CMTX est essentiellement décrit comme un CMT axonal (Hahn et al.,1990). Les anomalies pathologiques et électrophysiologiques ressemblent à celles observées dans la forme dominante du CMT2 à savoir une dégénérescence axonale avec perte des fibres périphériques myélinisées et amyéliniques. La perte axonale objectivée en histologie est plus importante que la perte myélinique : les bulbes d'oignon sont plus rares que dans le CMT1. Pour les auteurs, l'atteinte primaire dans le CMTX est une dégénérescence axonale, secondairement suivie d'une atteinte démyélinisante qui serait responsable dans certains cas de la baisse des VCN sur le nerf médian. D'autres travaux suggèrent que l'atteinte démyélinisante est beaucoup plus importante (Tabaraud et al., 1999). Le cas rapporté est celui d'une femme de 71 ans présentant des pieds creux ayant nécessité plusieurs interventions orthopédiques, des troubles de la marche évoluant depuis 2 ans. Son frère lui est très invalidé avec une marche devenue impossible dès 40 ans. Une des 2 filles de la patiente ainsi que sa petite fille ont des pieds creux. Les VCN sont démyélinisantes (= 26m/s sur le médian) avec des ralentissements non homogènes, des aspects de dispersion des réponses motrices au niveau des membres inférieurs et une absence de potentiel sensitif. La biopsie nerveuse du nerf sural montre une raréfaction des fibres myélinisées avec une prolifération schwannienne en bulbes d'oignon. Une mutation non-sens sur le gène de la Connexine-32 est retrouvée en position 367 entraînant un arrêt prématuré de la synthèse de la protéine. La mutation est retrouvée chez sa fille atteinte. La fille indemne est non-porteuse. La patiente a continué de

s'aggraver : lors de la consultation en 2000, Mme B. ne pouvait plus marcher sans déambulateur, les transferts étaient devenus impossibles.

Depuis cette première description d'autres cas de CMTX démyélinisants ont été rapportés. En effet jusque-là dans le cadre d'un diagnostic de routine, les mutations ponctuelles sur le gène de la Connexine-32 n'étaient pas recherchées. Dans la série de Silander (1999) sur 10 patients CMTX, 6 ont les caractéristiques d'un CMT axonal, 1 a les caractéristiques d'un CMT démyélinisant, 3 ont des VCN intermédiaires. Sur une étude de 4 familles CMTX, Senderek (1999) présente 1 cas de CMTX démyélinisant.

Les mutations de CX32 ne donnent pas des anomalies limitées au système nerveux périphérique : le système nerveux central peut être atteint. Marquès a décrit une famille porteuse de la mutation ALA339VAL avec atteinte démyélinisante de la substance blanche en IRM (Marquès et al., 1999). Une autre famille porteuse d'une mutation au codon 93 présente des signes pyramidaux et un tremblement cérébelleux : tous les porteurs de la mutation ont une atrophie cérébelleuse et corticale visible en IRM (Bell et al., 1996).

Les CMT récessifs liés à l'X : CMTX2

Les hommes sont seuls atteints avec des anomalies des pieds et de la marche qui commencent avant la 1^o décennie. L'atrophie prédomine sur les tibiaux antérieurs, les péroniers et les muscles intrinsèques de la main. Les troubles sensitifs sont modérés (Ionasescu et al., 1996; Ionasescu et al., 1995). Les femmes n'ont aucun signe de la maladie. Différents loci ont été retrouvés : Xq26, Xq22, Xq13.

Les CMT autosomiques récessifs : les CMT4

CMT4A :

C'est une forme sensitivomotrice de CMT avec des anomalies démyélinisantes à la biopsie nerveuse et liée au locus 8q13 : ce sont des formes essentiellement tunisiennes.

La famille décrite par Warner et al et associée à une mutation d'EGR2, est une famille consanguine avec retard intellectuel important (Warner et al., 1998).

CMT4B :

Cette affection se caractérise par un déficit moteur sévère, avec difficultés respiratoires et troubles de la déglutition responsables du décès de l'enfant. Les réflexes sont abolis, les VCN sont très ralenties de l'ordre de 5 m/s. La biopsie nerveuse porte le diagnostic d'hypomyélinisation congénitale par l'absence ou la très faible épaisseur de la myéline (Quattrone et al., 1996) (Vallat et al., 1987) et surtout par la présence des « myelin outfoldings ». Sur une famille de 10 atteints avec consanguinité, Bolino et al ont décrit une liaison avec le locus 11q22 (Bolino et al., 1996; Bolino et al., 1998) et une autre famille a été liée au locus 11p15 (Othmane et al., 1999). Ces 2 loci ont été éliminés chez une 3^e famille tunisienne, démontrant l'existence d'un 3^e locus pour le CMT4B . Les familles liées au locus 11q22 présentent des mutations du gène MTMR2 inclus dans cette région. MTMR2 est une protéine de type myotubularine (Bolino et al., 2000).

Des mutations ponctuelles de P0, PMP22, EGR2 ont été associées à des tableaux cliniques de CMT (Umehara et al., 1993) (Fabrizi et al., 1999; Fabrizi et al., 2000) avec une hypomyélinisation sur la biopsie nerveuse : leur mode de transmission est autosomique

dominant. Kiwaki a décrit une famille avec une atteinte glaucomateuse associée (Kiwaki et al., 2000).

L'hypomyélinisation congénitale n'est donc pas synonyme de CMT 4B.

CMT4C :

C'est une forme avec surdité et liée au locus 5q23. Les patients ont des anomalies démyélinisantes peu sévères avec des VCN modérément ralenties, une scoliose d'apparition précoce. Le phénotype est homogène. La BN montre une atteinte des cellules de Schwann myélinisées ou non. Ceci associé à une scoliose sévère suggère une anomalie protéine de la matrice extracellulaire et non pas sur une protéine de la myéline périphérique (Gabreels-Festen et al., 1999; Gambardella et al., 1998).

CMT4D :

Encore appelée neuropathie de LOM, la maladie est liée au locus 8q24 et touche les ethnies gitanes, bulgares et slovènes. Récemment (Kalaydjieva et al., 2000) une mutation ponctuelle sur le gène NDGR1 a été associée à la maladie. NDGR1 aurait un rôle dans l'arrêt de la différenciation cellulaire et serait une protéine de signalisation entre le cytoplasme et le noyau cellulaire. NDGR1 pourrait être un messenger nécessaire à la survie de l'axone.

CMT4E :

Ce sont les hypomyélinisations congénitales liées à des mutations ponctuelles sur EGR2, P0, ou aux loci 8q23,10q21.

CMT4F :

Ce sont des neuropathies démyélinisantes libanaises pour lesquelles les gènes connus n'ont pu être incriminés avec même l'exclusion du gène de MAG et qui sont liées au locus 19q13 (Delague et al., 2000).

La neuropathie tomaculaire ou neuropathie par hypersensibilité à la pression ou HNPP*

*HNPP: hereditary neuropathy pressure palsy

La clinique du HNPP

La neuropathie tomaculaire se révèle entre 10 et 30 ans, le plus souvent avec cependant des extrêmes possibles de la période néonatale à l'âge de 60 ans. Il s'agit de l'atteinte d'un tronc nerveux favorisée par le maintien prolongé d'une position, et qui atteint les nerfs exposés aux syndromes canaux (sciatique poplité externe au col du péroné, cubital au coude). Les circonstances de survenue sont le sommeil (appui sur le radial ou paralysie des amoureux), position accroupie ou jambes croisées, anesthésie locale ou générale. L'absence de facteurs déclenchants est possible (Mouton et al., 1999). La paralysie est indolore, s'installe rapidement, régresse en quelques jours ou quelques semaines. Par la répétition des épisodes, peut s'installer un déficit séquellaire et une amyotrophie. L'examen constate une abolition des ROT, une diminution de la pallesthésie aux membres inférieurs, des pieds creux. C'est un examen électrophysiologique (EMG) soigné et rigoureux qui affirme le diagnostic de la maladie : devant tout syndrome du canal carpien isolé, il convient de pratiquer un examen bilatéral et symétrique du nerf médian mais aussi d'au moins 2 nerfs exposés à un syndrome canalaire. Sur une série de 119 patients porteurs de la délétion en 17p11.2, Mouton et al ont pu établir des critères électrophysiologiques de la maladie : ralentissement bilatéral de la VCN motrice et sensitive du nerf médian au canal carpien, et présence d'au moins un

paramètre anormal de la conduction motrice du SPE. La BN des patients porteurs de HNPP montre un aspect démyélinisant avec de nombreuses tomacula.

La biologie moléculaire du HNPP

Le HNPP se transmet selon un mode autosomique dominant. La pénétrance clinique est complète : si 20% des porteurs obligatoires n'ont jamais eu d'épisodes déficitaires, tous ont des anomalies électrophysiologiques. De rares cas sporadiques sont rencontrés.

Dans 80% des cas la délétion en 17p11.2 est retrouvée (Pareyson and Taroni, 1996). Il y a une monosomie du gène de la PMP22 par délétion de la région dupliquée dans le CMT1A.

Des mutations ponctuelles dans le gène de PMP22 ont été identifiées chez des patients HNPP (Adlkofer et al., 1997b; Bort et al., 1997; Chance and Reilly, 1994; Roa et al., 1993b; Sahenk et al., 1998). Ces mutations correspondent à un allèle nul. La mutation à l'état homozygote (absence totale de protéine) n'a jamais été observée. Mariman et al rapportent que dans certaines familles, le phénotype HNPP ne ségrège pas avec la région 17p11.2, démontrant l'hétérogénéité génétique de la maladie (Mariman et al., 1994).

Le CMT et l'hypothèse des gènes modificateurs

La variabilité phénotypique de la maladie de Charcot-Marie-Tooth est connue depuis très longtemps. Elle peut être inter et/ou intra familiale. Par exemple, les patients porteurs de la duplication en 17p11.2 ont un début de la maladie plus ou moins précoce et un handicap moteur plus ou moins sévère.

Les mécanismes à l'origine de cette variabilité phénotypique sont inconnus, mais l'hypothèse la plus communément admise est celle des gènes modificateurs. Un gène modificateur est un gène qui par ses allèles peut modifier le phénotype de la maladie sans être responsable de la maladie elle-même. Deux indices sont utilisés pour étudier cette variabilité phénotypique : la pénétrance et l'expressivité. La pénétrance est la probabilité qu'un sujet ait le phénotype malade sachant qu'il est porteur du génotype délétère. L'expressivité du phénotype est dite variable si ce dernier peut être différent d'un sujet atteint à l'autre. Des gènes modificateurs ont été décrits dans certaines pathologies (maladie de Gaucher, rétinite pigmentaire..) mais restent inconnus dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth.

Matériel et méthodes

Les patients

La population étudiée

Le centre de Limoges recense plus de 220 biopsies de nerf (BN) de patients suspects de CMT depuis 1977. Nous avons repris tous les dossiers cliniques de ces patients que nous avons confrontés aux résultats de leur biopsie nerveuse. Parmi ces 220 dossiers, le diagnostic de CMT nous paraissait certain pour 72 d'entre d'eux, avec une excellente corrélation entre les conclusions cliniques et histologiques. La plupart de ces patients n'ont jamais eu de diagnostic en biologie moléculaire : 9 d'entre eux avaient eu une recherche en génétique. Ces 9 patients, 1CMTX, 4 patients CMT1A, 3 patients HNPP porteurs de la délétion en 17p11.2 et 2 patientes porteuses d'une mutation ponctuelle sur P0 ont servi de témoins pour valider notre technique de diagnostic à partir des BN.

Parmi ces 72 cas on retrouve :

34 CMT1 dont 9 formes graves DSS

23 CMT2

2CMT intermédiaire

2CMT4B

11 HNPP

Les caractéristiques générales de ces patients sont résumées dans le tableau suivant

	Age de début (ans)	Age date BN (ans)	VCN médian (m/s)	Délai maladie et BN (ans)
CMT1	30+/-2.5	42+/-22	20+/-9	12+/-12
CMT2	40+/-16	50+/-18	46+/-5.6	10+/-37
CMTintermédiaire	50+/-20	50+/-20	38+/-1	1+/-1
CMT4	14	30	16	16
HNPP	30	44.5+/-10	Normale sauf si canal carpien	15+/-7

BN: biopsie nerveuse

VCN : vitesse de conduction motrice

Le Problème du diagnostic rétrospectif

La plupart de nos patients sont décédés. D'autres sont vivants ou ont une descendance pouvant être concernée par le diagnostic génétique de leur ancêtre atteint d'une neuropathie. Lors de la consultation de Neurologie ayant motivée la biopsie nerveuse, le diagnostic de maladie de Charcot-Marie-Tooth avait été annoncé aux patients avec la notion de transmission familiale possible. Deux cas éthiques se sont posés. Le 1° concerne les patients CMT toujours vivants et ayant eu une biopsie nerveuse.

Ces patients ont été contactés et revus en consultation. Lors de cette 1° consultation, la possibilité d'un diagnostic génétique a été proposée. Si le patient émettait le souhait de connaître son statut génétique par rapport à la maladie de CMT un prélèvement sanguin a été effectué, avec consentement éclairé. Ceci nous a permis de confirmer les résultats obtenus à partir de l'ADN extrait des BN. Le souhait de ne pas connaître le statut génétique a toujours été respecté.

Le 2° cas concerne les apparentés de l'ancêtre atteint et décédé et pour lesquels un diagnostic de CMT avait été porté soit à la consultation, soit sur les dires du patient au moment d'établir l'arbre généalogique. Après avoir vérifié l'atteinte clinique de type CMT de ses apparentés, nous avons procédé de la même façon que précédemment mais sans jamais annoncer le statut génétique de l'ancêtre.

La maladie de CMT est une pathologie qui ouvre la voie au diagnostic pré-symptomatique. Grâce à la biologie moléculaire, chaque patient peut savoir son statut génétique réel par rapport à l'affection qui touche d'autres membres de sa famille même s'il est indemne de tout signe clinique.

La maladie de CMT est une maladie pour laquelle la gravité est variable et pour laquelle il n'existe pas encore de possibilités thérapeutiques. Un diagnostic pré symptomatique n'a

aucune conséquence thérapeutique pour les patients. Dans le cas des apparentés de patients porteurs de CMT un EMG a été proposé avant tout prélèvement. Lorsque l'EMG présentait des signes de CMT un diagnostic génétique a été proposé aux patients majeurs selon les principes du consentement éclairé et de l'autonomie. Lorsque l'examen clinique était normal ainsi que l'EMG les patients ont pu être rassurés sur leur non atteinte.

Le projet de cette thèse a été approuvé par le comité local d'éthique et par le CCPRB local.

La biologie moléculaire

L'extraction d'ADN :

L'ADN des patients a été extrait à partir des biopsies nerveuses. Ces biopsies pouvaient être soit du nerf congelé, soit du nerf fixé dans le formol et inclus dans la paraffine pour les procédures de lecture en histopathologie, soit du nerf préparé dans l'Epon, soit du nerf préparé pour le teasing (Senderek et al 1999,2000). Nous avons utilisé le kit d'extraction Quiagen (Senderek et al 1999). Nous n'avons pas réussi à amplifier l'ADN extrait à partir de l'Epon.

La recherche de la duplication-délétion : le dosage génique et l'étude des fragments de jonction

Quatre marqueurs de type « répétitions de CA » ont été choisis dans la région de 1.5Mbase, impliquée dans le CMT1A et le HNPP. Ces marqueurs sont détaillés en Annexe ainsi que leur position par rapport au gène de PMP22. L'ADN des patients est amplifié dans 4 réactions

distinctes par PCR quantitative où, pour chaque marqueur est couplée une amorce en 5' fluorescente. Le produit amplifié puis dénaturé est déposé sur un gel d'électrophorèse qui permet par sa haute résolution de séparer des allèles à 1 base près. La sensibilité de l'électrophorèse permet une approche quantitative des résultats et dans ce contexte de dosage génique de détecter la présence d'1, 2, ou 3 allèles et de doser ces allèles en cas de biallélisme. Les résultats sont collectés et analysés à l'aide du logiciel GENESCAN2.0.2. Pour les patients suspects d'être porteurs de la délétion en 17p11.2, ce dosage génique peut être complété par l'étude des fragments de jonction. Le fragment de jonction est spécifique de la délétion. Il est du à la recombinaison inégale entre les CMT-REP (schéma 7). La délétion fait disparaître le site de digestion enzymatique ECOR1 et Nsi (Annexe).

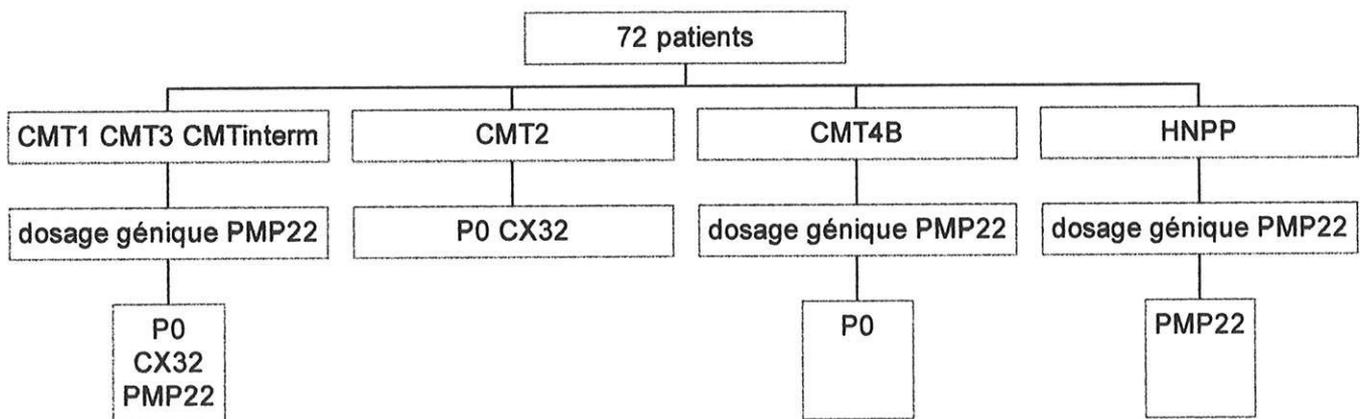
La recherche de mutations ponctuelles sur les gènes de P0 PMP22 et CX32

Les 6 exons de P0 les 2 exons de CX32 ont été amplifiés par les « primers » décrits en Annexe. Les 4 exons de PMP22 utilisés sont ceux décrits par Roa (Roa and al 1993). Le protocole est détaillé en Annexe. L'amplification a été faite dans l'appareil Perkin Elmer 9600.

Une PCR digestion par CFO1 a été réalisée selon le protocole décrit par Rouger (Rouger and al 1998) afin de dépister des mutations ponctuelles au codon 98 de l'exon 3 de P0. Tous les échantillons amplifiés ont séquencés selon le protocole détaillé en Annexe (kit d'extraction Quiagen, kit de séquence Big Dye Terminator). Les séquences ont été amplifiées à partir des amorces utilisés pour la PCR. Chaque di-déoxy-nucléotide est marqué avec un fluorochrome de couleur différente. Les brins d'ADN ainsi marqués sont séparés sur gel d'acrylamide. Le laser placé en fin de gel détecte les fragments marqués par les fluochromes. Les séquences

sont ensuite lues et analysées par les logiciels « Sequence Analysis » et « Sequence Navigator ».

La stratégie de diagnostic en biologie moléculaire



L'étude des biopsies nerveuses

Les protocoles utilisés dans le service ont été précédemment décrits (Vallat, 1996; Vallat and Vallat-Decouvelaere, 2000). Nous détaillerons ici l'étude quantitative.

Etude quantitative en microscopie laser confocale

Les études immunohistochimiques en microscopie optique des sérums sur coupes de nerf humain normal, quelles soient issues de méthodes directes ou indirectes, pourront être analysées en fluorescence à l'aide d'un microscope laser confocal. Des renseignements quantitatifs et qualitatifs pourront être ainsi obtenus.

- protocole expérimental:

Des coupes en congélation de nerfs normaux (de 5 microns d'épaisseur effectuées au cryostat)

sont incubées en présence du sérum de malades. Les anticorps utilisés dans cette étude sont révélés par un anticorps secondaire couplé à la FITC. Les lames sont observées sous un microscope confocal (CompAdd 333, TRACOR NOORAN INSTRUMENTS) équipé d'un laser crypon-argon couplé à un microscope NIKON.

- quantification automatique:

L'immunofluorescence est obtenue lors de l'excitation des fluorochromes par un faisceau de 488 nm. L'acquisition de l'image se fait sous le contrôle d'un logiciel utilisant le système ODYSSEY qui permet de scanner la préparation en coupes sériées de 1 μm . Les images sont ensuite sommées grâce au logiciel IMAGE 1. Sur chaque image ainsi obtenue l'utilisateur définit une zone de comptage à l'intérieur de laquelle l'analyseur détermine

l'intensité de fluorescence de chaque pixel, en fait la moyenne et donne une valeur arbitraire comprise entre 0 et 255 (0 pour les niveaux de fluorescence nuls et 255 pour les plus élevés). Les valeurs sont ensuite stockées dans un tableur (EXCEL) et analysées statistiquement.

Méthode quantitative (paragraphe électronique)

Cette méthode automatique fait appel à un scanner couleur (MUSTEK MFS-12000SP) couplé à un analyseur (PC GATEWAY 2000 pentium P5-133 MHZ) utilisant le logiciel IMAGE PAL pour l'acquisition de l'image à partir de négatifs ou de positifs, le logiciel COMPTEX (développé par la société KLEIN INDUSTRIE) pour le comptage des grains d'or sur l'échantillon photographique et le logiciel INSPECTOR pour l'étude des paramètres morphologiques (surface tissulaire, grand axe, petit axe, moyenne ...).

L'acquisition de l'image se fait soit à partir d'un négatif (scanné avec une résolution de 900dpi) soit d'un positif (scanné avec une résolution de 600 dpi) à l'aide du scanner à haute résolution. L'image ainsi acquise peut être affinée, si besoin, sous IMAGE PAL puis enregistrée dans INSPECTOR et COMPTEX.

Sous INSPECTOR l'utilisateur pourra sélectionner des grains d'or et leur environnement immédiat afin de définir des modèles qui seront stockés dans une banque de données et réutilisés lors du comptage des particules. Il pourra également calculer les surfaces tissulaires après calibrage de l'appareil (en fonction du grossissement électronique, de la taille des négatifs ou des positifs). Il devra également sélectionner les différentes zones de comptage correspondant aux régions dans lesquelles sera estimé le bruit de fond et les zones d' "intérêt" (soit la myéline soit l'axone selon le cas).

Le comptage des grains d'or se fera sous COMPTEX . Ce logiciel, développé en collaboration avec la société KLEIN INDUSTRIE, est basé sur la reconnaissance des grains

de par leur intensité en terme de niveaux de gris (contraste entre le niveau de gris moyen des particules et celui de leur environnement proche), leur taille et de leur forme ("paramètres de forme"). A la suite du comptage, l'image de l'échantillon apparaîtra sur l'écran avec un repérage des grains par un marqueur, ceci pour permettre de vérifier la bonne corrélation entre le choix des modèles et leur reconnaissance par l'analyseur. (Cette étape ne sera utile qu'au début de l'étude pour confectionner une banque de données complète et définitive). Cette opération de comptage s'effectuera sur les zones correspondant au bruit de fond et sur la zone d' "intérêt" . Les résultats (en nombre de grains) apparaîtront sur une feuille de calcul à partir de laquelle nous soustrairons les valeurs du bruit de fond à celles données pour le marquage myélinique (ou axonal). Ces valeurs seront rapportées à la surface du tissu (en μm^2) obtenue lors de l'analyse sous INSPECTOR.

L'intérêt d'un tel système est multiple :

- Il permettra à la fois un gain de temps et de précision :

En effet, de par l'hétérogénéité du marquage au sein des tissus étudiés, cette méthode nous permettra d'effectuer un comptage systématique de tous les grains d'or, ce qui n'est pas le cas avec la méthode manuelle utilisant la grille de comptage des "cercles de 50 % de probabilité". De ce fait, cette méthode peut se révéler beaucoup plus précise notamment lors du comptage des particules pour des échantillons de faible intensité d'immunomarquage.

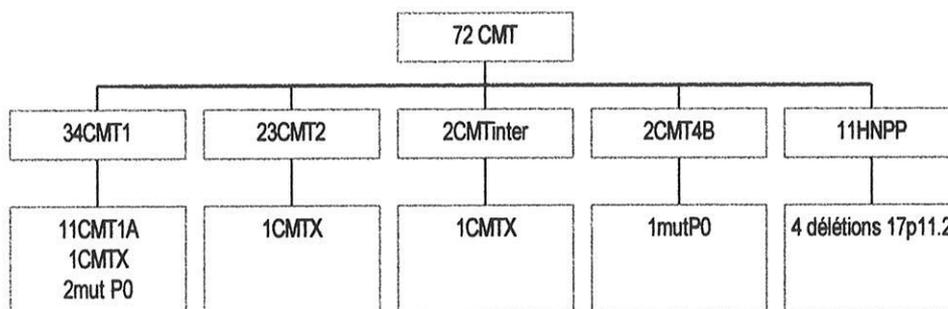
- Il nous permettra également d'étudier de nombreux paramètres morphologiques sur différents types d'échantillons.

Résultats

Parmi les 72 patients nous avons pu poser un diagnostic positif de CMT en biologie moléculaire pour 21 d'entre eux.

Nous avons diagnostiqué 11 patients porteurs de la duplication en 17p11.2 soit 11 CMT1A (7 nouveaux cas), 4 patients porteurs de la délétion en 17p11.2 (1 nouveau cas), 3 CMTX (2 nouveaux cas), 3 patients porteurs d'une mutation ponctuelle sur le gène de P0 (1 nouveau cas). Aucune mutation ponctuelle sur le gène de PMP22 n'a été trouvée.

Leur répartition en fonction du phénotype est la suivante :



Description de la population CMT1A

Description générale

Nos 11 patients porteurs de la duplication en 17p11.2 remplissent les caractéristiques cliniques du CMT1A décrits par Birouk et al (Birouk et al., 1997a).

La 1^o manifestation clinique apparaît avant l'âge de 20 ans pour tous nos patients. Tous ont des pieds creux et une abolition des réflexes ostéotendineux (ROT) aux membres inférieurs.

Pour 10 patients une notion de maladie familiale est retrouvée, même si une patiente a refusé que nous examinions ses proches. Un seul cas est sporadique : les parents du propositus non consanguins, examinés, sont indemnes de tout signe clinique ou électrophysiologique.

Les caractéristiques électrophysiologiques de ces patients sont résumées dans le tableau suivant:

médian	VCN motrice	Amplitude pot moteur	Latence motrice distale	VCN sensitive	Amplitude pot sensitif
CMT1A	23 +/-2 m/s	6.2 +/-0.5 mV	8.7+/-0.5 ms	20+/-2 m/s	3mV

Deux patients ont un phénotype particulier que nous allons développer.

Deux cas particuliers

Mme V.

La patiente a 60 ans lorsqu'elle se présente à la consultation pour une gêne à la marche avec une perte d'autonomie importante et des anomalies pupillaires notées par son ophtalmologiste. Les troubles de la marche existent depuis son adolescence et Mme V. présente des pieds creux qui ont « toujours été » et ont nécessité le port de chaussures adaptées. Son père et ses frères ont des pieds creux. La marche est de plus en plus difficile et la patiente se plaint de malaises lipothymiques sans syncopes. La dysautonomie est objectivée avec une hypotension orthostatique qui passe 12 à 8 de systolique. On note de plus un signe d'Argyll-Robertson. Tous les frères ayant des pieds creux ont la même anomalie pupillaire. Les enfants de la patiente sont indemnes. La BN montre un aspect typique de CMT1A avec une prolifération schwannienne en bulbes d'oignons. La biologie moléculaire confirme le diagnostic de CMT1A.

Enfant N.

Il s'agit d'un enfant de 15 mois pour qui la station debout est impossible, la marche n'a jamais été acquise. La BN a été réalisée à l'occasion d'une intervention orthopédique sur des pieds creux. Les parents n'ont aucun déficit clinique mais dans la famille du père on note des pieds creux. L'atteinte clinique de l'enfant est sévère avec amyotrophie distale péronière, une aréflexie ostéo-tendineuse diffuse, une hypoesthésie au tact et à la piqûre, la sensibilité au diapason est abolie aux membres inférieurs. La cyphose dorsale est importante. Les VCN sur le nerf médian sont inf. à 10m/s. La BN montre une raréfaction très sévère des fibres myélinisées avec un certain nombre de fibres dont le diamètre axonal est anormalement large par rapport à l'épaisseur de la gaine de myéline. Il existe de fréquents enroulements en bulbe

d'oignons. L'ensemble témoigne de lésions démyélinisantes chroniques sévères. Le diagnostic de CMT1A est confirmé en biologie moléculaire. Le père n'a pas été prélevé.

Description de la population HNPP

Description de la population porteuse de la délétion en 17p11.2

Nous avons retrouvé 4 patients porteurs de la délétion en 17p11.2. Une histoire familiale de neuropathie est retrouvée dans tous les cas. Les 4 patients présentent des pieds creux et une abolition des ROT aux membres inférieurs. Pour 3 patients sur 4, l'EMG objective la présence d'un bloc de conduction sur le nerf médian associée à un bloc de conduction sur le SPE. Dans 1 cas l'EMG ne montre pas d'anomalies sur les membres supérieurs mais des blocs de conduction sur les SPE. Nos 4 patients porteurs de la délétion en 17p11.2 ne remplissent pas les critères de diagnostic clinique établis par Mouton (1999).

Description de la population non porteuse de la délétion en 17p11.2

Les 7 patients non porteurs de la délétion en 17p11.2 ont un phénotype clinique et histologique typique de neuropathie tomaculaire. L'EMG montre pour 4 d'entre eux la présence de blocs de conduction sur les 2 médians et un SPE. Pour 3 d'entre eux, les blocs de conduction sont présents aux membres inférieurs, sur les 2 SPE. Notre population HNPP porteuse de la délétion en 17p11.2 ne diffère pas de façon significative de celle non porteuse de la délétion.

Description des patients porteurs de mutations ponctuelles sur le gène de P0

Mme C

Il s'agit d'une femme de 60 ans avec une longue histoire de difficultés à la marche, qui vient à la consultation pour des difficultés à la station debout. Depuis 5 ans la maladie s'est aggravée avec une déambulation impossible sans cannes. L'examen montre une amyotrophie importante, une abolition des ROT et des pieds creux. Il existe une notion de transmission familiale.

L'EMG objective des VCN basses de façon homogène (VCN du médian= 15m/s), avec des lésions démyélinisantes prépondérantes. La BN montre une perte des fibres myélinisées avec une diminution de leur la densité au mm². Une perte des fibres myélinisées est constatée sur la BN avec une prolifération en bulbes d'oignons autour des axones démyélinisés ou partiellement remyélinisés. Le pourcentage de tomacula est de 9.5%.

La biologie moléculaire montre une mutation ponctuelle de P0 sur l'exon2, **SER78LEU**.

Mme H.

La patiente a 53 ans lors du diagnostic mais se plaint depuis ses 44 ans de troubles de l'équilibre. L'examen clinique montre une perte de l'équilibre sans troubles sensitifs, un déficit modéré des 4 membres prédominant en distal. Les ROT sont abolis. Il n'y a pas de pieds creux. L'EMG montre une atteinte démyélinisante sévère avec des VCN <20m/s.

Une perte des fibres myélinisées est constatée sur la BN avec une prolifération en bulbes d'oignons autour des axones démyélinisés ou partiellement remyélinisés. La densité des fibres est réduite. Le taux de tomacula est de 3%.

Les 3 enfants de la patiente ne présentent aucun signe clinique ou électrophysiologique d'atteinte. Un des enfants décédé plusieurs années auparavant aurait eu des troubles similaires à ceux de sa mère mais nous n'avons aucune trace de son examen clinique. Une mutation sur l'exon3 de P0, ASN122LEU a été trouvée chez la malade.

L'enfant B.

L'enfant a 22 mois lorsque ses parents l'amènent à la consultation pour des troubles de la marche à type d'hypotonie: un appareillage est nécessaire pour permettre la verticalisation. L'examen montre un genu recurvatum bilatéral, une hypotonie des 4 membres, des ROT abolis, des pieds creux, une scoliose importante. Les VCN sur le médian sont à 7m/s. Il n'y a aucun antécédent familial, l'examen clinique des parents est normal.

La BN montre des lésions démyélinisantes sévères avec un aspect de remyélinisation à type de « myelin outfoldings » ; le diagnostic d'hypomyélinisation congénitale ou CMT4B est posé.

Une mutation sur l'exon3 de P0 est trouvée LYS13OARG.

La description des patients porteurs d'une mutation ponctuelle sur le gène de CX32

Le cas B.

La patiente est porteuse d'une mutation au codon 367 et son phénotype a été décrit dans le chap. CMTX démyélinisant. Le cas publié par Tabaraud and al, nous a servi de témoin pour valider notre technique de diagnostic à partir des BN (Tabaraud et al., 1999).

Le cas G.

Le motif de consultation de cette patiente de 52 ans est une faiblesse des membres inférieurs avec paresthésies. Aucun antécédents familial n'est connu. Les ROT sont abolis aux membres inférieurs avec une diminution de la pallesthésie. La patiente a des pieds creux. L'EMG montre une neuropathie axonale modérée avec des VCN sur le médian normales. La BN trouve une association de lésions démyélinisantes et de bouquets de régénérescence. Une mutation au codon 22 de CX32 est trouvée. Les filles, la mère et la sœur de la patiente qui présentent les mêmes anomalies en EMG sont porteuses de la mutation **ARG22PRO**. Avec ce cas, il convient d'indiquer que les lésions histologiques sus mentionnées avaient conduit à rechercher une mutation de la CX32.

Le cas J.

Le cas index est un enfant W. de 12 ans. Il présente un retard d'acquisition à la marche, des pieds creux déjà opérés, une scoliose nécessitant le port d'un corset. Les ROT sont abolis ainsi que la pallesthésie. Sa mère et sa sœur ont un examen clinique normal. L'EMG montre

une neuropathie axonale sévère chez W., très modérée chez sa mère. L'EMG de sa sœur est normal. La BN de W. montre des lésions révélant un processus mixte avec des lésions axonales et démyélinisantes. La biologie moléculaire affirme une mutation ponctuelle **ARG83CYS** sur la CX32 des 3 patients, présente à l'état homozygote pour le fils, et à l'état hétérozygote pour la mère et la sœur.

Discussion

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la neuropathie héréditaire la plus fréquente avec une prévalence de 1/2500. La consultation de Neurologie de Limoges recense plus de 220 cas de patients CMT ayant eu une biopsie nerveuse (BN). La plupart des ces patients n'ont pas eu de diagnostic en biologie moléculaire. Cette banque de BN est donc une ressource inestimable pour un diagnostic génétique rétrospectif, adapté aux récentes découvertes en biologie moléculaire sur le CMT. Sur ces 220 patients, nous avons sélectionné 72 cas de CMT dont le diagnostic clinique et histologique était parfaitement corrélé. Neuf patients sur ces 72 avaient eu un diagnostic positif de CMT en biologie moléculaire. Nous les avons utilisés comme témoins positifs pour valider notre technique de diagnostic à partir des BN, associés à 20 cas témoins de patients non CMT (29 témoins). Le nerf périphérique utilisé est soit du nerf congelé, soit du nerf inclus en paraffine, soit du nerf préparé pour le « teasing ». Nous n'avons pas réussi à extraire de l'ADN à partir du nerf inclus dans l'Epon. Nous avons retrouvé une excellente corrélation, pour l'ensemble de nos 29 témoins, entre les résultats obtenus à partir de l'ADN extrait du sang et celui extrait du nerf périphérique, validant ainsi notre technique.

Nous avons pu porter un diagnostic positif de CMT pour 21 patients sur 72. L'anomalie génétique la plus fréquemment rencontrée est la duplication en 17p11.2 avec une fréquence de 18% (11 patients sur 61 CMT). La délétion en 17p11.2 a été diagnostiquée pour 4 patients sur 11, soit une fréquence de 36%. Les mutations ponctuelles des protéines sont plus rares: 3 CMTX (fréquence de 4.9%) et 3 mutations ponctuelles sur le gène de P0 (fréquence de 4.9%) ont été diagnostiquées. Aucune mutation ponctuelle sur le gène de PMP22 n'a été trouvée, mais ce dépistage est actuellement en cours pour certain cas. Ces résultats sont en accord avec

les précédentes études (tableau 1) même si l'on pouvait penser qu'en cernant au mieux le phénotype de la population étudiée nous augmenterions le taux de mutations ponctuelles diagnostiquées (Silander et al., 1998; Sorour and Upadhyaya, 1998) (De Jonghe et al., 1997).

Comment expliquer que nous n'ayons pas pu porter de diagnostic génétique pour 51 de nos patients CMT ? La méthode diagnostique que nous avons choisie n'est pas incriminable. La séquence est une technique dont la sensibilité est de 100%, contrairement à la technique de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) qui est utilisée dans d'autres laboratoires. Sa limite vient du fait qu'il est impossible pour le dépistage de mutations ponctuelles de la CX32 de séquencer l'ensemble de la partie non codante du gène. En effet, la partie codante est déjà étendue (>800pb) et les amorces utilisées ne peuvent couvrir l'ensemble de la séquence intronique. Or de 25% à 50% des patients CMTX n'ont pas de mutations dans la partie codante du gène (Ionasescu et al., 1995; Latour et al., 1997a). On peut donc légitimement penser que certains de nos patients sont porteurs d'un CMTX que nous n'avons pas su dépister. Ce n'est pas le cas pour les mutations de P0 et PMP22, puisqu'il n'a jamais été décrit de mutations dans la partie non codante de ces protéines (De Jonghe et al., 1999).

D'autres gènes que CX32, P0 et PMP22 ont été incriminés dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth comme EGR2 et SCIP. Ces 2 gènes ne sont pas encore étudiés en routine dans notre laboratoire. Cependant peu de nos patients (environ 4), ont un phénotype compatible avec celui connu, des CMT liés au gène EGR2. De plus, dans les séries publiées (De Jonghe et al., 1999; Pareyson et al., 2000; Warner et al., 1998; Warner et al., 1999b) ces mutations sur EGR2 sont beaucoup plus rares que celles de P0 ou PMP22. Il existe très certainement des gènes incriminables dans le CMT et qui ne sont pas encore connus. Cette hypothèse est renforcée par le fait que nous n'avons pas pu poser de diagnostic génétique positif pour 7 patients porteurs cliniquement de HNPP. La fréquence de ces cas HNPP négatifs en biologie moléculaire est plus élevée que celle de Marimann (Marimann et al., 1994).

Le phénotype de notre population CMT1A correspond parfaitement à celui précédemment publié (Birouk and al 1997). Dans cette population CMT1A, la plupart de nos patients sont peu invalidés. L'un d'eux a cependant un phénotype de DSS. Le même défaut génétique ne donne pas la même expression phénotypique. Notre population HNPP porteuse de la délétion en 17p11.2 présente un phénotype typique, même si elle ne remplit stricto sensu les critères établis par Mouton (Mouton et al., 1999). Ces critères significatifs de la présence de la délétion, nous paraissent trop stricts pour orienter la recherche en biologie moléculaire et doivent être assouplis en fonction de la conviction du praticien.

Aucun signe clinique ne permet au sein de notre population de CMT de dépister les cas liés à des mutations ponctuelles de P0. Le phénotype de nos patients va du CMT1 au CMT4B.

Les 2 patientes porteuses de CMT1B ont des phénotypes très différents par leur gravité. La patiente porteuse d'une mutation sur l'exon2 de P0 est beaucoup plus invalidée que celle porteuse d'une mutation sur l'exon3. Le handicap n'est pas corrélé avec les valeurs des VCN, puisque les 2 patientes ont des valeurs similaires (VCN du médian respectivement à 15m/s et à 20m/s). Le handicap n'est pas non plus corrélé à l'expression locale de P0. Un dosage immunologique de P0 sur la BN de ces 2 patientes (Sindou et al., 1999) révèle en effet que l'expression in situ de P0 est réduite de moitié par rapport à un témoin normal (la mutation est exprimée à l'état hétérozygote), mais les valeurs sont similaires entre les 2 cas.

La différence phénotypique peut s'expliquer par le site de la mutation. La mutation SER78LEU donne une perte de fonction allélique de type dominant-négatif : la patiente, porteuse d'une mutation hétérozygote exprime à la fois la protéine mutée et la protéine normale. La protéine mutée forme un agrégat avec la protéine normale qui altère les fonctions de P0. La formation du tétramère de P0 qui est impliqué dans la compaction de la myéline n'est plus possible. La BN ne montre pas d'anomalies de la compaction de la myéline mais on trouve en nombre significatif des tomacula comme décrit par Gabrëels –Festen sur des BN de

patients avec anomalies de la compaction (Gabreels-Festen et al., 1996). La mutation sur l'exon3 de P0, ASN122LEU induit des anomalies sur le site immunoglobuline-like de la protéine. L'effet est similaire aux mutations sur le codon 98 (cf p21). Le remplacement par une Leucine a moins de conséquences que la mutation par une Cystéine: le domaine glycosylé n'est pas fermé et la compaction reste partiellement possible permettant la formation de la double ligne intrapériodique. L'enfant B. est porteur d'une mutation sur le codon 130, soit sur l'exon 3 de P0. Sa BN montre des hypermyélinisations locales, ou « myelin outfoldings ». Les mutations de l'exon 3 sont habituellement responsables de décompaction de la myéline et non pas d'hypermyélinisation locale comme c'est le cas ici. Gabreels-Festen and al (1991) émettent l'hypothèse que certaines mutations de P0 (ILE62PHE, SER49LEU...) altèrent une fonction putative de la protéine, qui serait responsable d'informer le noyau de la cellule de Schwann de l'état de la myélinisation. La protéine mutée perdrait son pouvoir de rétrocontrôle et la myélinisation s'«emballerait» d'où les hypermyélinisations locales.

Nos patients CMTX ont un phénotype classique hormis Mme B. déjà présentée (p.27). Les mutations ARG22PRO et ARG83CYS de la CX32 sont connues et étudiées en électrophysiologie (Bruzzone et al., 1996): elles entraînent une perte de fonction partielle de la « gap-junction ».

Conclusion

La maladie de Charcot-Marie-Tooth est une neuropathie chronique évolutive sensitivo-motrice qui constitue la pathologie héréditaire la plus fréquente du système nerveux périphérique. Cette pathologie est complexe, non par son diagnostic clinique et électrophysiologique qui est simple, mais par la multiplicité des anomalies géniques qui lui sont rattachées. Les apports de la biologie moléculaire sont venus, en effet, complexifier la classification de la maladie. Nous avons entrepris un travail de diagnostic génétique rétrospectif pour 72 patients CMT à partir de l'ADN extrait de leur biopsie nerveuse. Nous avons pu établir un diagnostic génique positif pour 21 d'entre eux ainsi qu'une excellente corrélation clinique, électrophysiologique et histologique. Le phénotype même cerné au mieux par la BN ne permet pas d'orienter le génotypage. Sur notre population de patients CMT nous avons pu constater la grande variabilité phénotypique pour un même défaut génétique. Cette variabilité porte sur l'expressivité des mutations ponctuelles des protéines de la myéline, la maladie CMT pouvant être plus ou moins grave. Cette gravité clinique pourrait être corrélée à la dégénérescence axonale. L'expressivité des mutations ponctuelles des protéines de la myéline est-elle modulée par un ou des gènes modificateurs ? Ces gènes modificateurs ont-ils un rôle dans la protection axonale ? La caractérisation et la compréhension de ces gènes modificateurs pourrait en être une piste thérapeutique dans le traitement du CMT. Cette maladie considérée le plus souvent comme bénigne peut en effet avoir un impact fonctionnel important pour les patients et en particulier pour les enfants.

Bibliographie

- Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* 1997a; 17: 4662-71.
- Adlkofer K, Naef R, Suter U. Analysis of compound heterozygous mice reveals that the Trembler mutation can behave as a gain-of-function allele. *J Neurosci Res* 1997b; 49: 671-80.
- Anzini P, Neuberg DHH, Schachner M, Nelles E. Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap-junction protein Connexin 32. *J. Neurosci.* 1997; 17:4545-4551
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 1997a; 120: 813-23.
- Birouk N, Maisonobe T, Le Forestier N, Gouider R, Leger JM, Bouche P. [Charcot-Marie-Tooth disease: electromyography is still useful in diagnosis and classification]. *Rev Neurol (Paris)* 1997b; 153: 727-36.
- Blanquet-Grossard F, Pham-Dinh D, Dautigny A, Latour P, Bonnebouche C, Corbillon E, et al. Charcot-Marie-Tooth type 1B neuropathy: third mutation of serine 63 codon in the major peripheral myelin glycoprotein PO gene. *Clin Genet* 1995; 48: 281-3.
- Blanquet-Grossard F, Pham-Dinh D, Dautigny A, Latour P, Bonnebouche C, Diraison P, et al. Charcot-Marie-Tooth type 1B neuropathy: a mutation at the single glycosylation site in the major peripheral myelin glycoprotein Po. *Hum Mutat* 1996; 8: 185-6.
- Bolino A, Brancolini V, Bono F, Bruni A, Gambardella A, Romeo G, et al. Localization of a gene responsible for autosomal recessive demyelinating neuropathy with focally folded myelin sheaths to chromosome 11q23 by homozygosity mapping and haplotype sharing. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1051-4.
- Bolino A, Seri M, Caroli F, Eubanks J, Srinivasan J, Mandich P, et al. Exclusion of the SCN2B gene as candidate for CMT4B. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 629-34.
- Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martinez A, Martinez F, et al. Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 1997; 99: 746-54.
- Bruzzone R, Giaume C. Connexins and information transfer through glia. *Adv Exp Med Biol* 1999; 468: 321-37.
- Bruzzone R, Ressot C. Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1-6.

Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* 1996; 18: 709-18.

Chance PF, Bird TD, Matsunami N, Lensch MW, Brothman AR, Feldman GM. Trisomy 17p associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A phenotype: evidence for gene dosage as a mechanism in CMT1A. *Neurology* 1992; 42: 2295-9.

Chance PF, Reilly M. Inherited neuropathies [see comments]. *Curr Opin Neurol* 1994; 7: 372-80.

De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, Nelis E, De Vriendt E, Lofgren A, et al. The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 1999; 122: 281-90.

De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 1997; 2: 370-87.

Delague V, Bareil C, Tuffery S, Bouvagnet P, Chouery E, Koussa S, et al. Mapping of a new locus for autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to 19q13.1-13.3 in a large consanguineous Lebanese family: exclusion of MAG as a candidate gene. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 236-43.

Eccleston PA. Regulation of Schwann cell proliferation: mechanisms involved in peripheral nerve development. *Experimental Cell Research* 1991 1-9

Fabrizi GM, Cavallaro T, Taioli F, Orrico D, Morbin M, Simonati A, et al. Myelin uncompaction in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A with a point mutation of peripheral myelin protein-22. *Neurology* 1999; 53: 846-51.

Fabrizi GM, Simonati A, Morbin M, Cavallaro T, Taioli F, Benedetti MD, et al. Clinical and pathological correlations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A with the 17p11.2p12 duplication: a cross-sectional morphometric and immunohistochemical study in twenty cases. *Muscle Nerve* 1998; 21: 869-77.

Fabrizi GM, Taioli F, Cavallaro T, Rigatelli F, Simonati A, Mariani G, et al. Focally folded myelin in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B with Ser49Leu in the myelin protein zero [In Process Citation]. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000; 100: 299-304.

Gabreels-Festen A, van Beersum S, Eshuis L, LeGuern E, Gabreels F, van Engelen B, et al. Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33 [see comments]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 569-74.

Gabreels-Festen AA, Gabreels FJ, Jennekens FG, Joosten EM, Janssen-van Kempen TW. Autosomal recessive form of hereditary motor and sensory neuropathy type I. *Neurology* 1992; 42: 1755-61.

Gabreels-Festen AA, Hoogendijk JE, Meijerink PH, Gabreels FJ, Bolhuis PA, van Beersum S, et al. Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 1996; 47: 761-5.

Gambardella A, Bolino A, Muglia M, Valentino P, Bono F, Oliveri RL, et al. Genetic heterogeneity in autosomal recessive hereditary motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths (CMT4B). *Neurology* 1998; 50: 799-801.

Garbay B, Boiron-Sargueil F, Cassagne C. Expression of the exon 1A-containing PMP22 transcript is altered in the trembler mouse. *Neurosci Lett* 1995; 198: 157-60.

Garbay B, Bonnet J. P0 protein in normal, trembler heterozygous/homozygous mice during active PNS myelination. *Neuroreport* 1992; 3: 594-6.

Garbay B, Salles J, Knoll A, Boiron-Sargueil F, Heape AM, Bonnet J, et al. Trembler as a mouse model of CMT1A? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 262-72.

Garcia CA, Malamut RE, England JD, Parry GS, Liu P, Lupski JR. Clinical variability in two pairs of identical twins with the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Neurology* 1995; 45: 2090-3.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84: 345-57.

Hahn AF, Brown WF, Koopman WJ and Feasty TE. X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *Brain* (1990) 113;1511-1525

Hanemann CO, D'Urso D, Gabreels-Festen AA, Muller HW. Mutation-dependent alteration in cellular distribution of peripheral myelin protein 22 in nerve biopsies from Charcot-Marie-Tooth type 1A. *Brain* 2000; 123: 1001-6.

Hargrave M, James K, Nield K, Toomes C, Georgas K, Sullivan T, et al. Fine mapping of the neurally expressed gene SOX14 to human 3q23, relative to three congenital diseases. *Hum Genet* 2000; 106: 432-9.

Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene [see comments]. *Nat Genet* 1993a; 5: 31-4.

Hayasaka K, Takada G, Ionasescu VV. Mutation of the myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B. *Hum Mol Genet* 1993b; 2: 1369-72.

Ikegami T, Ikeda H, Mitsui T, Hayasaka K, Ishii S. Novel mutation of the myelin P0 gene in a pedigree with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B [letter]. *Am J Med Genet* 1997; 71: 246-8.

Ionasescu V, Ionasescu R, Searby C. Correlation between connexin 32 gene mutations and clinical phenotype in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Am J Med Genet* 1996; 63: 486-91.

Ionasescu V, Searby C, Ionasescu R, Meschino W. New point mutations and deletions of the connexin 32 gene in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 297-9.

Ionasescu VV. X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease and Connexin32. *Cell Biol Int* 1998; 22: 807-813.

Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, Savoy A. Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nature Genetics* 1996 14:214-217

Kamholz J, Menichella D, Jani A, Garbern J, Lewis RA, Krajewski KM, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1: molecular pathogenesis to gene therapy. *Brain* 2000; 123: 222-33.

Kiwaki T, Umehara F, Takashima H, Nakagawa M, Kamimura K, Kashio N, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with myelin folding and juvenile onset glaucoma. *Neurology* 2000; 55: 392-7.

Latour P, Blanquet F, Nelis E, Bonnebouche C, Chapon F, Diraison P, et al. Mutations in the myelin protein zero gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Hum Mutat* 1995; 6: 50-4.

Latour P, Fabreguette A, Ressot C, Blanquet-Grossard F, Antoine JC, Calvas P, et al. New mutations in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur Neurol* 1997a; 37: 38-42.

Latour P, Levy N, Paret M, Chapon F, Chazot G, Clavelou P, et al. Mutations in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease in the French population. *Neurogenetics* 1997b; 1: 117-23.

LeGuern E, Gouider R, Lopes J, Abbas N, Gugenheim M, Tardieu S, et al. Constant rearrangement of the CMT1A-REP sequences in HNPP patients with a deletion in chromosome 17p11.2: a study of 30 unrelated cases. The French CMT Collaborative Research Group. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1673-4.

Lopes J, LeGuern E, Gouider R, Tardieu S, Abbas N, Birouk N, et al. Recombination hot spot in a 3.2-kb region of the Charcot-Marie-Tooth type 1A repeat sequences: new tools for molecular diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and of Charcot-Marie-Tooth type 1A. French CMT Collaborative Research Group. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1223-30.

Lopes J, Vandenberghe A, Tardieu S, Ionasescu V, Levy N, Wood N, et al. Sex-dependent rearrangements resulting in CMT1A and HNPP [letter]. *Nat Genet* 1997; 17: 136-7.

Lupski JR. An inherited DNA rearrangement and gene dosage effect are responsible for the most common autosomal dominant peripheral neuropathy: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Clin Res* 1992; 40: 645-52.

Lupski JR, Garcia CA. Molecular genetics and neuropathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain Pathol* 1992; 2: 337-49.

Lupski J/R.

Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4976-85.
Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C. A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 2924-30.

Mariman EC, Gabreels-Festen AA, van Beersum SE, Valentijn LJ, Baas F, Bolhuis PA, et al. Prevalence of the 1.5-Mb 17p deletion in families with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Ann Neurol* 1994; 36: 650-5.

Marquès W Jr, Sweeney JG, Wood NW, Marquès W. Central nervous involvement in a novel connexin 32 mutation in identical twins. *JNNP* 1999; jun;66(6):803-4

Marrosu MG, Vaccargiu S, Marrosu G, Vannelli A, Cianchetti C, Muntoni F. Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene [see comments]. *Neurology* 1998; 50: 1397-401.

Mouton P, Tardieu S, Gouider R, Birouk N, Maisonobe T, Dubourg O, et al. Spectrum of clinical and electrophysiologic features in HNPP patients with the 17p11.2 deletion. *Neurology* 1999; 52: 1440-6.

Nagamatsu M, Jenkins RB, Schaid DJ, Klein DM, Dyck PJ. Hereditary motor and sensory neuropathy type 2C is genetically distinct from types 2B and 2D [see comments]. *Arch Neurol* 2000; 57: 669-72.

Nelis E, Holmberg B, Adolfsson R, Holmgren G, van Broeckhoven C. PMP22 Thr(118)Met: recessive CMT1 mutation or polymorphism? [letter]. *Nat Genet* 1997; 15: 13-4.

Omori Y, Mesnil M and Yamasaki H. connexin 32 Mutations from X-linked CMT Disease patients: functional defects and dominant negative effects. *Mol. Biol.Cell* 1996 7:907-916

Othmane KB, Johnson E, Menold M, Graham FL, Hamida MB, Hasegawa O, et al. Identification of a new locus for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease with focally folded myelin on chromosome 11p15. *Genomics* 1999; 62: 344-9.

Ouvrier R. Correlation between the histopathologic, genotypic, and phenotypic features of hereditary peripheral neuropathies in childhood. *J Child Neurol* 1996; 11: 133-46.

Ouvrier RA, Nicholson GA. Advances in the genetics of hereditary hypertrophic neuropathy in childhood. *Brain Dev* 1995; 17: 31-8.

Pareyson D, Menichella D, Botti S, Sghirlanzoni A, Fallica E, Mora M, et al. Heterozygous null mutation in the P0 gene associated with mild Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 477-80.

Pareyson D, Taroni F. Deletion of the PMP22 gene and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Curr Opin Neurol* 1996; 9: 348-54.

Pareyson D, Taroni F, Botti S, Morbin M, Baratta S, Lauria G, et al. Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology* 2000; 54: 1696-8.

Pham-Dinh D, Fourbil Y, Blanquet F, Mattei MG, Roeckel N, Latour P, et al. The major peripheral myelin protein zero gene: structure and localization in the cluster of Fc gamma receptor genes on human chromosome 1q21.3-q23. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2051-4.

Quattrone A, Gambardella A, Bono F, Aguglia U, Bolino A, Bruni AC, et al. Autosomal recessive hereditary motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths: clinical, electrophysiologic, and genetic aspects of a large family. *Neurology* 1996; 46: 1318-24.

Ressot C, Bruzzone R. Connexin channels in Schwann cells and the development of the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32: 192-202.

Ressot C, Gomes D, Dautigny A, Pham-Dinh D, Bruzzone R. Connexin32 mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease show two distinct behaviors: loss of function and altered gating properties. *J Neurosci* 1998; 18: 4063-75.

Ressot C, Latour P, Blanquet-Grossard F, Sturtz F, Duthel S, Battin J, et al. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMTX): new mutations in the connexin32 gene. *Hum Genet* 1996; 98: 172-5.

Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR. Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet* 1993a; 5: 269-73.

Roa BB, Garcia CA, Pentao L, Killian JM, Trask BJ, Suter U, et al. Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1993b; 5: 189-94.

Sahenk Z. Abnormal Schwann cell-axon interactions in CMT neuropathies. The effects of mutant Schwann cells on the axonal cytoskeleton and regeneration-associated myelination. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 415-26.

Sahenk Z, Chen L, Freimer M. A novel PMP22 point mutation causing HNPP phenotype: studies on nerve xenografts [see comments]. *Neurology* 1998; 51: 702-7.

Sahenk Z, Chen L, Mendell JR. Effects of PMP22 duplication and deletions on the axonal cytoskeleton [see comments]. *Ann Neurol* 1999; 45: 16-24.

Sahenk Z, Mendell JR. Alterations in nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures in Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 508-12.

Scherer S. Axonal pathology in demyelinating diseases [editorial; comment]. *Ann Neurol* 1999; 45: 6-7.

Scherer SS. Molecular genetics of demyelination: new wrinkles on an old membrane. *Neuron* 1997; 18: 13-6.

Scherer SS, Bone LJ, Deschenes SM, Abel A, Balice-Gordon RJ, Fischbeck KH. The role of the gap junction protein connexin32 in the pathogenesis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Novartis Found Symp* 1999; 219: 175-85.

Scherer SS, Fischbeck KH. Is CMTX an axonopathy? [letter; comment]. *Neurology* 1999; 52: 432-3.

Scherer SS, Xu YT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ. Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 1998; 24: 8-20.

Senderek J, Hermanns B, Lehmann U, Bergmann C, Marx G, Kabus C, et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2 and P0 point mutations: two novel amino acid substitutions (Asp61Gly; Tyr119Cys) and a possible "hotspot" on Thr124Met. *Brain Pathol* 2000; 10: 235-48.

Sindou P, Vallat JM, Chapon F, Archelos JJ, Tabaraud F, Anani T, et al. Ultrastructural protein zero expression in Charcot-Marie-Tooth type 1B disease. *Muscle Nerve* 1999; 22: 99-104.

Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin. Genet* 1974 6: 98-118

Tabaraud F, Lagrange E, Sindou P, Vandenberghe A, Levy N, Vallat JM. Demyelinating X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: unusual electrophysiological findings. *Muscle Nerve* 1999; 22: 1442-7.

Tazir M, Geronimi C. Chronic childhood spinal muscular atrophies in Algeria. A genetic study. *J Neurol Sci* 1990; 96: 89-101.

Topilko P, Murphy P, Charnay P. Embryonic Development of Schwann Cells: Multiple Roles for Neuregulins along the Pathway. *Mol Cell Neurosci* 1996; 8: 71-5.

Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 1994; 371: 796-9.

Umehara F, Takenaga S, Nakagawa M, Takahashi K, Izumo S, Matsumuro K, et al. Dominantly inherited motor and sensory neuropathy with excessive myelin folding complex. *Acta Neuropathol* 1993; 86: 602-8.

Vallat JM, Gil R, Leboutet MJ, Hugon J, Moulies D. Congenital hypo- and hypermyelination neuropathy. Two cases. *Acta Neuropathol* 1987; 74: 197-201.

Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, et al. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 1996; 39: 813-7.

Warner LE, Garcia CA, Lupski JR. Hereditary peripheral neuropathies: clinical forms, genetics, and molecular mechanisms. *Annu Rev Med* 1999a; 50: 263-75.

Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, et al. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 1998; 18: 382-4.

Warner LE, Reiter LT, Murakami T, Lupski JR. Molecular mechanisms for Charcot-Marie-Tooth disease and related demyelinating peripheral neuropathies. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1996; 61: 659-71.

Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 1999b; 8: 1245-51.

Xu W, Manichella D, Jiang H, Vallat JM, Lilien J, Baron P, et al. Absence of P0 leads to the dysregulation of myelin gene expression and myelin morphogenesis. *J Neurosci Res* 2000; 60: 714-24.

Zhong Y, Briehner WM, Gumbiner BM. Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J Cell Biol* 1999; 144: 351-9.

CMT2 ou forme axonale

autosomal dominant

- CMT2A : présentation classique
mutation ponctuelle P0
loci 1p36,7p15
- CMT2B : prédominance des signes sensitifs
loci 3q13, 9q22,3q23(blépharospasme-épicanthus)
- CMT2C : avec atteinte des cordes vocales
locus inconnu
- CMT2D=CMT2A ? : locus 7q14
- CMT2E : origine russe
locus 8p21

- CMT2 spinal : loci 12q24, 17p19

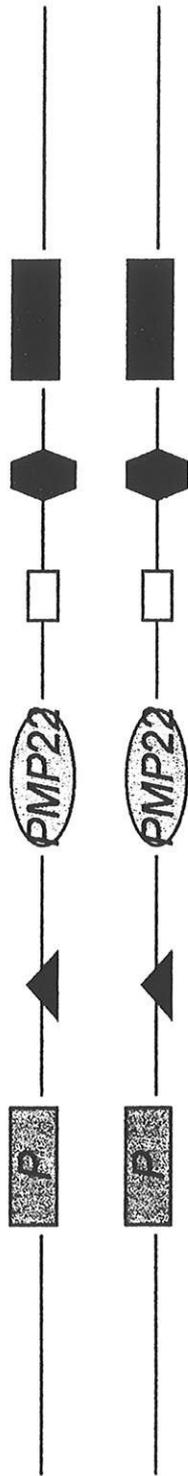
autosomal récessif

CMTX

- dominant : mutation ponctuelle de CX32
- récessif : loci Xq26,Xq22,Xq13

Schéma de la région de 1,5 Mb comprise entre 2 segments de forte homologie P (segment proximal) et D (segment distal) situés de chaque côté de PMP-22 en 17p11.2. Les fragments de jonction J1 en cas de duplication et J2 en cas de délétion résultent d'un crossing-over inégal entre P et D (17,18). Localisation des 4 polymorphismes étudiés par rapport à PMP-22. (8,20,21).

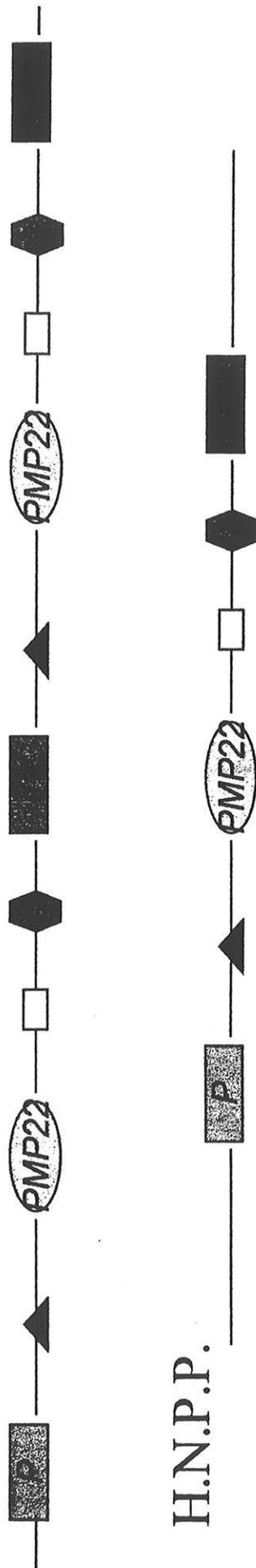
Sujet sain



C.M.T.1A



H.N.P.P.



Centromère

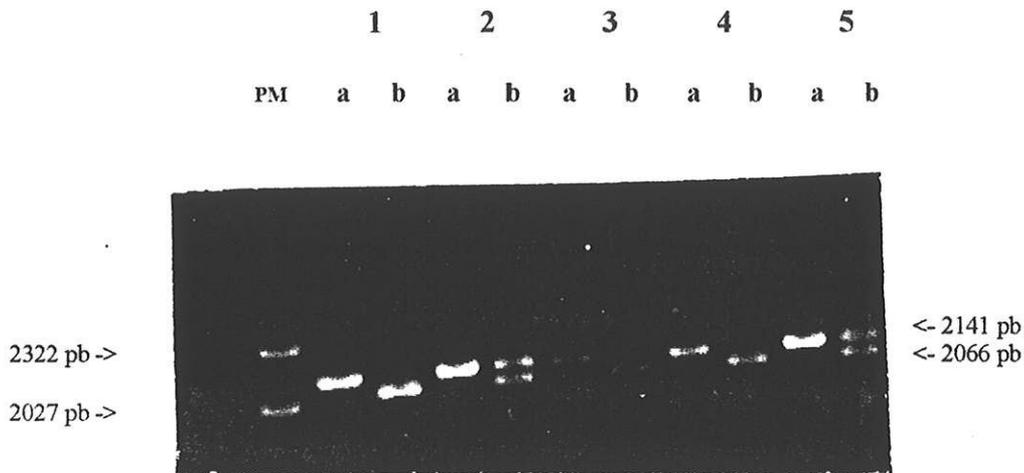
J2

Télomère

▲ RM11gt

□ 955 / 839

● 921



résultat de l'étude du fragment de jonction (FJ) par PCR chez 5 patients, avant (a) et après (b) double digestion enzymatique par EcoRI et NsiI. 3 : témoin normal; 1, 2, 4 et 5 : patients monoalléliques pour 4 marqueurs polymorphes de la région de PMP-22. Avant digestion, un fragment de 2141 pb est amplifié chez tous les patients. Après digestion, un fragment de 2066 pb est retrouvé chez le témoin. La persistance d'un fragment de 2141 pb après digestion chez les patients 2 et 5, témoigne de la disparition des sites de restriction chez ces patients et donc de la présence du FJ spécifique de la délétion. La présence chez ces derniers d'une 2^{ème} bande de 2066 pb témoigne de l'amplification "parasite" du CMT1A-REP proximal normal de l'autre chromosome 17, présentant les sites de restriction concernés. PM : témoin de poids moléculaire.

BON A IMPRIMER N° 161

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Résumé

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la neuropathie héréditaire la plus fréquente avec une prévalence de 1/2500. Nous avons mis au point une technique d'extraction d'ADN à partir de biopsies nerveuses qui nous a ensuite permis d'entreprendre un diagnostic rétrospectif à partir de 72 biopsies nerveuses de patients CMT. Nos résultats ont été validés à partir de témoins positifs. Nous avons pu poser un diagnostic génétique positif pour 21 patients et établir une excellente corrélation entre le génotype, le phénotype et l'histologie de ces 21 cas. Nous avons mis en évidence une grande variabilité phénotypique supportant l'hypothèse des gènes modificateurs. La gravité nous a paru dans certains cas corrélée à la perte axonale.

Nous pensons qu'il existe des gènes encore inconnus responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, ce qui expliquerait que nous n'ayons pu poser de diagnostic génétique pour certains de nos patients.

Mots clés

Neuropathie héréditaire

Charcot-Marie-Tooth

Biopsie nerveuse

Diagnostic génétique

Corrélation phénotype-génotype

Gènes modificateurs

Perte axonale