

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2011

THESE N°

**ETUDE DE L'IMPLICATION  
DE SEQUENCES CIS-REGULATRICES DU GENE *EGR2/KROX20*  
DANS LES NEUROPATHIES DE CHARCOT-MARIE-TOOTH  
DEMYELINISANTES**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

le 11 Octobre 2011

par

**Emmanuel KHALIFA**

Né le 24 Décembre 1983, à Toulouse

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Jean-Michel VALLAT.....Président du Jury

Mme le Professeur Bettina COUDERC.....Juge

M. le Professeur Franck STURTZ.....Juge

Mme le Professeur Catherine YARDIN.....Juge

M. le Professeur Benoît FUNALOT.....Directeur

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2011

THESE N°

**ETUDE DE L'IMPLICATION  
DE SEQUENCES CIS-REGULATRICES DU GENE *EGR2/KROX20*  
DANS LES NEUROPATHIES DE CHARCOT-MARIE-TOOTH  
DEMYELINISANTES**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

le 11 Octobre 2011

par

**Emmanuel KHALIFA**

Né le 24 Décembre 1983, à Toulouse

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Jean-Michel VALLAT.....Président du Jury

Mme le Professeur Bettina COUDERC.....Juge

M. le Professeur Franck STURTZ.....Juge

Mme le Professeur Catherine YARDIN.....Juge

M. le Professeur Benoît FUNALOT.....Directeur

**DOYEN DE LA FACULTE:**

Monsieur le Professeur VALLEIX Denis

**ASSESEURS:**

Monsieur le Professeur LASKAR Marc  
Monsieur le Professeur MOREAU Jean-Jacques  
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:**

\* C.S = Chef de Service

<b>ACHARD</b> Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
<b>ADENIS</b> Jean-Paul (C.S)	OPHTALMOLOGIE
<b>ALAIN</b> Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
<b>ALDIGIER</b> Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
<b>ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX</b> Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
<b>ARNAUD</b> Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
<b>AUBARD</b> Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
<b>BEAULIEU</b> Pierre	ANESTHESIOLOGIE et REANIMATION CHIRURGICALE
<b>BEDANE</b> Christophe	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
<b>BERTIN</b> Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
<b>BESSEDE</b> Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
<b>BONNAUD</b> François	PNEUMOLOGIE
<b>BONNETBLANC</b> Jean-Marie (C.S.)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
<b>BORDESSOULE</b> Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE
<b>CHARISSOUX</b> Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
<b>CLAVERE</b> Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
<b>CLEMENT</b> Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
<b>COGNE</b> Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
<b>COLOMBEAU</b> Pierre	UROLOGIE
<b>CORNU</b> Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
<b>COURATIER</b> Philippe	NEUROLOGIE
<b>DANTOINE</b> Thierry (C.S)	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
<b>DARDE</b> Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
<b>DAVIET</b> Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
<b>DE LUMLEY WOODYEAR</b> Lionel ( <b>Sur 31/08/2011</b> )	PEDIATRIE
<b>DENIS</b> François ( <b>Sur 31/08/2011</b> )	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>DESSPORT</b> Jean-Claude	NUTRITION
<b>DRUET-CABANAC</b> Michel (C.S)	MEDECINE ET SANTE DU TRAVAIL
<b>DUMAS</b> Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
<b>DUMONT</b> Daniel ( <b>Sur 31/08/2012</b> )	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
<b>ESSIG</b> Marie	NEPHROLOGIE
<b>FEISS</b> Pierre ( <b>Sur 31.08.2013</b> )	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
<b>FEUILLARD</b> Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
<b>FOURCADE</b> Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
<b>FUNALOT</b> Benoît	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>GAINANT</b> Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>GAROUX</b> Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE

**GASTINNE** Hervé (C.S) (Retraite au 04.10.10)  
**GUIGONIS** Vincent  
**JACCARD** Arnaud  
**JAUBERTEAU-MARCHAN** Marie-Odile  
**LABROUSSE** François (C.S)  
**LACROIX** Philippe  
**LASKAR** Marc (C.S)  
**LIENHARDT-ROUSSIE** Anne (CS)  
**MABIT** Christian  
**MAGY** Laurent  
**MARQUET** Pierre  
**MATHONNET** Muriel  
**MAUBON** Antoine  
**MELLONI** Boris (C.S)  
**MERLE** Louis  
**MONTEIL** Jacques (C.S)  
**MOREAU** Jean-Jacques (C.S)  
**MOULIES** Dominique (C.S) (Sur. 31.08.2013)  
**MOUNAYER** Charbel  
**NATHAN-DENIZOT** Nathalie (C.S)  
**PARAF** François  
**PLOY** Marie-Cécile (C.S)  
**PREUX** Pierre-Marie  
**ROBERT** Pierre-Yves  
**SALLE** Jean-Yves (C.S)  
**SAUTEREAU** Denis (C.S)  
**SAUVAGE** Jean-Pierre (Sur 31/08/2011)  
**STURTZ** Franck (C.S)  
**TEISSIER-CLEMENT** Marie-Pierre  
**TREVES** Richard  
**TUBIANA-MATHIEU** Nicole (C.S)  
**VALLAT** Jean-Michel (C.S)  
**VALLEIX** Denis (C.S)  
**VANDROUX** Jean-Claude (Sur 31/08/2011)  
**VERGNENEGRE** Alain (C.S)  
**VIDAL** Elisabeth (C.S)  
**VIGNON** Philippe  
**VIROT** Patrice (C.S)  
**WEINBRECK** Pierre (C.S)  
**YARDIN** Catherine (C.S)

REANIMATION MEDICALE  
 PEDIATRIE  
 HEMATOLOGIE  
 IMMUNOLOGIE  
 ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE  
 MEDECINE VASCULAIRE  
 CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE  
 PEDIATRIE  
 ANATOMIE  
 NEUROLOGIE  
 PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE  
 CHIRURGIE DIGESTIVE  
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE  
 PNEUMOLOGIE  
 PHARMACOLOGIE CLINIQUE  
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE  
 NEUROCHIRURGIE  
 CHIRURGIE INFANTILE  
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE  
 ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE  
 ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE  
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE  
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION  
 OPHTALMOLOGIE  
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION  
 GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE  
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE  
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE  
 ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES  
 RHUMATOLOGIE  
 CANCEROLOGIE  
 NEUROLOGIE  
 ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE  
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE  
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE et PREVENTION  
 MEDECINE INTERNE  
 REANIMATION MEDICALE  
 CARDIOLOGIE  
 MALADIES INFECTIEUSES  
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

### **MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS**

**AJZENBERG** Daniel  
**ANTONINI** Marie-Thérèse (C.S)  
**BOURTHOUMIEU** Sylvie  
**BOUTEILLE** Bernard  
**CHABLE** Hélène  
**DURAND-FONTANIER** Sylvaine  
**ESCLAIRE** Françoise  
**HANTZ** Sébastien  
**LAROCHE** Marie-Laure  
**LE GUYADER** Alexandre  
**MARIN** Benoît  
**MOUNIER** Marcelle  
**PICARD** Nicolas  
**QUELVEN-BERTIN** Isabelle

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE  
 PHYSIOLOGIE  
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE  
 PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE  
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE  
 ANATOMIE – CHIRURGIE DIGESTIVE  
 BIOLOGIE CELLULAIRE  
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE  
 PHARMACOLOGIE CLINIQUE  
 CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE  
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE  
 BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE – HYGIENE  
 PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE  
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

**TERRO** Faraj  
**VERGNE-SALLE** Pascale  
**VINCENT** François

BIOLOGIE CELLULAIRE  
THERAPEUTIQUE  
PHYSIOLOGIE

**PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE**

**CAIRE** François

NEUROCHIRURGIE

**P.R.A.G.**

**GAUTIER** Sylvie

ANGLAIS

**PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**

**BUCHON** Daniel  
**BUISSON** Jean-Gabriel

MEDECINE GENERALE  
MEDECINE GENERALE

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

**DUMOITIER** Nathalie  
**MENARD** Dominique  
**PREVOST** Martine

MEDECINE GENERALE  
MEDECINE GENERALE  
MEDECINE GENERALE

# REMERCIEMENTS

## **A notre Maître et Président de Thèse**

**Monsieur le Professeur Jean-Michel VALLAT**

Professeur des Universités de Neurologie

Praticien hospitalier

Chef de service

C'est un grand honneur pour nous de vous avoir à la présidence de cette thèse. Votre expérience et votre renommée dans cette discipline ne nous permettait d'envisager aucun autre à votre place. C'est avec un profond respect que nous vous assurons de notre très sincère gratitude.

## **A nos Maîtres et Juges**

### **Monsieur le Professeur Franck STURTZ**

Professeur des Universités de Biochimie et de Génétique  
Moléculaire

Praticien hospitalier

Chef de service

C'est pour nous un honneur de vous compter parmi nos juges. C'est toujours un grand plaisir de travailler avec vous. Nous vous remercions pour votre accueil chaleureux et votre souci de délivrer un enseignement de qualité et soutenu à vos internes, malgré un emploi du temps hospitalier si prenant, en cette période de changement. Veuillez trouver l'expression de notre profonde reconnaissance.



## **A nos Maîtres et Juges**

### **Madame le Professeur Catherine YARDIN**

Professeur des Universités d'Histologie, Cytologie, Histologie,  
Cytogénétique et Embryologie

Praticien hospitalier

Chef de service

Votre disponibilité, votre gentillesse et votre convivialité au quotidien m'ont laissé d'excellents souvenirs de mon passage dans votre service. Votre pédagogie m'a permis de me familiariser avec le monde des remaniements chromosomiques dont la complexité est parfois insoupçonnable. Dieu merci, la région Xq28 n'a plus de secret pour moi.

Nous sommes très honorés que vous ayez accepté de juger notre travail, soyez assurée de notre profond respect.

## **A nos Maîtres et Juges**

**Madame le Professeur Bettina COUDERC**

Professeur des Universités de Génétique

Praticien hospitalier

Nous sommes très honorés de vous compter parmi nos juges et sommes très touchés que vous ayez fait le déplacement depuis Toulouse pour cette occasion.

Soyez assurée, Madame le Professeur, de notre profonde gratitude.

## **A nos Maîtres et Juges**

### **Monsieur le Professeur Benoît FUNALOT**

Professeur des Universités de Biochimie et Génétique  
Moléculaire

Praticien hospitalier

Travailler avec vous est pour moi un grand honneur. Dès mon arrivée dans le service, vous avez su me faire aimer encore plus cette spécialité. Votre accueil chaleureux, vos conseils avisés, votre pédagogie et votre patience ont été pour moi une chance.

Merci de m'avoir épaulé pas à pas dans l'élaboration de ce travail et plus généralement de m'avoir appuyé et soutenu dans mon cursus. Merci enfin de m'avoir fait découvrir le monde passionnant des neuropathies héréditaires où le dieu Krox20 règne sans partage...

## **Ce travail est dédié**

*A ma famille bien aimée,*

A mes parents bien aimés, Michel et Dominique.

Avoir grandi avec vous a été pour moi une chance. Votre amour, votre affection, votre disponibilité et votre soutien n'ont jamais connu de faille. Vous avez su me transmettre les valeurs du travail et du mérite dans un foyer toujours uni, et chaleureux. J'espère avoir hérité de toutes vos grandes qualités qui sont très complémentaires.

J'espère vous rendre un jour autant, et même plus encore, que tout ce que vous avez su me donner.

A mon frère Samuel,

Tu as été, et tu seras toujours un compagnon pour moi. Tu ne manques jamais d'humour, à l'image de ton idole Gad. Ton insouciance, ta jovialité, et ta « zénitude » en toutes circonstances, je dois dire, me surprendront toujours. Je t'embrasse fort.

A mon Grand-Père Félix,

Tu as toujours montré une grande affection à mon égard. Même si tu n'es pas à Limoges aujourd'hui, nous pensons tous très fort à toi. Les récits des nombreuses péripéties qui ont jalonné ta vie me manquent.

A ma Grand-Mère Denise,

Tu as su veiller constamment à rassembler tous les membres de notre nombreuse famille, et nous élever dans le respect des traditions et de notre culture dont je suis si fier.

A Gaby,

La voix de la famille, l'homme de scène. Ta foi et ton énergie sont un don qui force le respect.

A tous mes oncles et tantes. Avoir grandi en votre compagnie a été pour moi un grand bonheur.

A tous mes cousins et les nouveaux cousins, ceux qui sont présents et ceux qui n'ont pas pu venir. Merci pour tous les bons moments passés avec vous.

A la nouvelle génération de petits cousins qui promet...

A tous les autres membres de ma famille.

*A ceux qui sont partis trop tôt*

A ma Grand-mère Renée, pour tout l'amour que tu m'as donné. Ta vie a aussi été une succession d'épreuves auxquelles tu n'as jamais manqué de faire face avec un courage exemplaire. Je ne t'oublierai jamais. Ton esprit sera à mes côtés, et le mien aux tiens en ce jour et pour tous les suivants.

A mon grand-père Gilbert, dont je porte aussi le prénom. La chance de te connaître ne m'a pas été donnée mais ton aura semble toujours planer au dessus de nous.

A Magalie, mon cœur, ton amour et ton affection illuminent tous les jours que je vis avec toi, et me rendent meilleur.

A mes amis,

Frank, Adrien, David, vous avez toujours compté pour moi et j'espère vous revoir très souvent malgré la distance pour certains.

Mes amis de Limoges, Antoine, Thomas, Lucie.

A Claire Vincent et à tes parents, Annie et Maurice.

A tous ceux que j'ai connus et que je salue.

### **Au service de Biochimie et Génétique Moléculaire de Limoges**

Aux biologistes, techniciens et secrétaires. Merci pour votre accueil.

### **Au service d'Histologie-Cytologie-Cytogénétique-Embryologie de l'HME**

Merci à toute l'équipe pour votre convivialité.

A Sylvie Bourthoumieu, pour sa gentillesse, sa ténacité, ses conseils avisés, et son érudition.

A Françoise Esclaire pour sa bonne humeur, sa désinvolture, et son sens de la qualité.

Aux secrétaires et aux techniciennes.

### **Au service de Génétique de Necker**

Au Professeur Arnold Munnich, merci de m'avoir accueilli dans votre service. Votre parcours, vos engagements, vos futurs projets et votre énergie forcent le respect.

Au Docteur Jean-Paul Bonnefont, merci de m'avoir introduit dans l'équipe du laboratoire. Votre disponibilité et votre pédagogie n'ont jamais fait défaut.

A tous les autres membres de l'équipe avec lesquels j'ai travaillé.

### **A l'équipe de recherche du Professeur Patrick Charnay sur la biologie du développement du système nerveux périphérique, à l'ENS de Paris**

Piotr, Pascale, Fanny, Aurélie, Patrick, Solange et tous les autres, merci pour votre sympathie, et d'avoir porté un œil attentif à mon égard malgré mon emploi du temps très partagé et imprévisible. Votre rigueur scientifique a été pour moi source d'enrichissement.

**Au laboratoire d'Hématologie de Limoges**

**Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Limoges**

Au Docteur Daniel Ajzenberg, pour ta bonne humeur et ton humour pinçant.

**Au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène de Limoges**

**A tous mes cointernes, ex-cointernes, et ex-colocataires de l'internat que j'ai  
croisés**



# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>18</b>
<b>I) DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE DES VERTEBRES.....</b>	<b>20</b>
A) Présentation générale du système nerveux périphérique.....	21
B) Développement des cellules de Schwann.....	43
C) Rôle de <i>Krox20/Egr2</i> dans le processus de myélinisation.....	58
<b>II) PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>85</b>
<b>III) MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>90</b>
A) Prélèvement des nerfs sciatiques de souris.....	91
B) RT-PCR des ARNm <i>Krox20</i> .....	91
C) Western blot de <i>Krox20</i> .....	98
D) Echantillons humains.....	99
<b>IV) RESULTATS.....</b>	<b>105</b>
A) Semi-quantification des ARNm <i>Krox20</i> à E18,5, P1 et P9 chez la souris.....	106
B) Semi-quantification des protéines <i>Krox20</i> à E18,5 et P1 chez la souris.....	108
C) Analyse qualitative des ARNm <i>Krox20</i> chez la souris.....	112
D) Séquençage de MSE sur les ADN génomiques de 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth.....	115
E) Semi-quantification de MSE sur les ADN génomiques de 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth.....	117

<b>V)</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>121</b>
	A) Utilité d'une régulation post-transcriptionnelle de <i>Krox20</i> .....	122
	B) Leviers de la régulation post-transcriptionnelle de <i>Krox20</i> pouvant aboutir au découplage observé entre ARNm et protéine chez la souris.....	123
	C) Exploration moléculaire du découplage entre les cinétiques d'évolution des ARNm <i>Krox20</i> et de la protéine <i>Krox20</i> chez la souris.....	123
	D) Acteurs candidats de la régulation post-transcriptionnelle de <i>Krox20</i> .....	125
	E) Analyse qualitative et semi-quantitative de MSE chez 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth.....	128
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>132</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>135</b>

# INTRODUCTION

La gaine de myéline est un élément majeur du système nerveux car elle garantit la vitesse de circulation du message nerveux, et toute altération de sa fonction se traduit par des neuropathies, parfois très sévères. Elle est synthétisée par des cellules très spécialisées: les oligodendrocytes dans le système nerveux central, et les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique.

Notre travail appartient au vaste champ d'étude des mécanismes moléculaires qui régissent l'initiation et le maintien de la myélinisation par les cellules de Schwann. Il fait suite au diagnostic, chez un nourrisson décédé d'une neuropathie amyélinisante congénitale, d'un déficit en un facteur de transcription essentiel: *Egr2*, dans les cellules de Schwann, suite à la délétion homozygote d'une séquence « enhancer »: Myelinating Schwann cell Element (MSE). Deux hypothèses permettent d'expliquer l'absence de la protéine *Egr2*. Dans le premier cas, aucun autre enhancer ne pourrait activer la transcription du gène *Egr2*. Dans le deuxième cas, le second enhancer connu: Immature Schwann cell Element (ISE), normalement éteint après la naissance, serait réactivé, et induirait la transcription d'un ARNm *Egr2* soumis ensuite à une régulation post-transcriptionnelle négative.

Nous allons d'abord nous attacher à établir chez la souris l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de *Krox20* (équivalent d'*Egr2* chez la souris) compatible avec l'intervention d'ISE et de MSE, afin de rendre la deuxième hypothèse physiopathologique plausible.

Le rôle essentiel de MSE dans l'expression d'*Egr2* chez l'homme nous conduira ensuite à l'analyser sur un échantillon de 76 patients atteints de neuropathie périphérique de type Charcot-Marie-Tooth dont le diagnostic moléculaire, comprenant notamment l'exploration de la séquence codante d'*Egr2*, n'a pas pu aboutir.

# **I) DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE DES VERTEBRES**

## A) Présentation générale du système nerveux périphérique

### 1) Description anatomique du système nerveux périphérique

Dans le système nerveux pris dans son intégralité, on oppose le système nerveux central (SNC) qui comprend l'encéphale et la moelle épinière, au système nerveux périphérique (SNP) qui connecte le précédent aux divers organes récepteurs et effecteurs.

Le SNP est classiquement divisé en deux ensembles fonctionnels:

- le système nerveux somatique, qui contrôle les fonctions conscientes.
- le système nerveux autonome qui contrôle les fonctions végétatives.

Le système nerveux somatique est associé aux mouvements volontaires et réflexes, et au tonus musculaire. Il innerve les muscles squelettiques du tronc et des membres, les articulations et les tendons.

Il se subdivise en deux composantes, motrice et sensitive:

- La composante motrice efférente va de la moelle épinière à la fibre musculaire.

L'élément fondamental est l'unité motrice. L'unité motrice comprend un motoneurone, situé dans la corne antérieure de la moelle épinière à tous les niveaux (cervical, dorsal ou lombaire, ou encore situé dans les noyaux moteurs des nerfs crâniens); le corps cellulaire se

prolonge par un axone moteur qui sort de la moelle épinière par la racine antérieure (ou ventrale) correspondante et qui part, au sein d'un nerf moteur, innervé un certain nombre de fibres musculaires délimitant l'unité motrice. Le territoire musculaire regroupant les unités motrices provenant d'un étage ou segment médullaire donné est appelé myotome. Le segment médullaire est décalé par rapport à la vertèbre correspondante, celle-ci siégeant au niveau un segment plus bas situé.

- La composante sensitive afférente va des récepteurs périphériques à la moelle épinière.

Des fibres sensibles myélinisées ou non (amyéliniques), partent des récepteurs spécifiques et se regroupent en faisceaux qui, à leur tour, forment des nerfs sensitifs. Chaque axone sensitif possède un corps cellulaire situé dans un ganglion rachidien postérieur (ou DRG, pour Dorsal Root Ganglia), qui envoie l'information sensitive vers la moelle via la racine postérieure ou dorsale. Chaque racine correspond à un territoire cutané en bande, horizontal, ou dermatome. L'ensemble dermatome/myotome définit le métamère.

Ainsi, de la moelle épinière à la périphérie, partent, à chaque étage et de chaque côté, une branche ventrale motrice et une branche dorsale sensitive qui en se regroupant forment une racine rachidienne. Il y a 31 paires de racines rachidiennes (8 paires cervicales, 12 paires dorsales, 5 lombaires, 5 sacrées et 1 coccygienne). Après être sortie de la moelle par le foramen de conjugaison situé entre 2 vertèbres adjacentes, la racine se divise en une branche

postérieure et une branche antérieure ; chaque branche se distribue dans le métamère, correspondant à la peau et aux muscles postérieurs et antérieurs respectivement. Les branches antérieures des nerfs dorsaux, au nombre de 12, ne s'anastomosent pas et forment les nerfs intercostaux. Les branches antérieures des racines cervicales, lombaires, sacrées et coccygiennes s'anastomosent entre elles et forment les plexus cervical, brachial, lombaire, honteux et coccygien. Des plexus, vont naître des nerfs périphériques constitués de fibres motrices et de fibres sensibles.

Chez les Mammifères, il existe une trentaine de paires bilatérales de racines rachidiennes, émergeant au niveau des espaces intervertébraux du rachis. Les nerfs rachidiens sont tous de nature mixte (composante sensitive et motrice). Les nerfs crâniens, à la différence des nerfs rachidiens n'émergent pas de la moelle épinière, mais directement du SNC et sont au nombre de 12 paires. Si certains d'entre eux sont de type mixte (sensitifs et moteurs, comme les nerfs rachidiens), d'autres sont purement sensitifs (I, II et VIII) ou purement moteurs (III, IV, VI et XI).

Le système nerveux végétatif comporte deux voies qui s'antagonisent mutuellement: le système nerveux orthosympathique et le système nerveux parasympathique. Le premier permet de mobiliser l'organisme dans des conditions de stress par augmentation de l'afflux sanguin et des rythmes cardiaque et respiratoire, via la libération de noradrénaline au niveau synaptique. Le second assure le maintien des fonctions vitales à l'état basique, le neurotransmetteur associé étant l'acétylcholine.

Le système nerveux végétatif (ou autonome) comporte des fibres afférentes et efférentes assurant l'innervation des viscères (péristaltisme du tube digestif, rythme cardiaque et respiratoire,...), du système vasculaire (vasomotricité qui



correspond à la constriction et la dilatation des vaisseaux) et de certaines structures de la peau (sécrétions glandulaire). Ce système complexe comporte des récepteurs viscéraux sensibles à leur mobilisation et leur distension.

- Les fibres afférentes transmettent les informations au SNC:
  - Les fibres viscérales (fibres nociceptives de type C partant des intestins, de la vessie, du pharynx, de l'œsophage, de la trachée,...) rentrant dans la constitution des nerfs sympathiques viscéraux.
  - Les fibres pariétales (fibres nociceptives partant des feuillets péritonéaux, pleuraux, péricardiques et des organes rétropéritonéaux).
  
- Les fibres efférentes du système nerveux végétatif sont constituées de 2 neurones reliés par une synapse dont la localisation anatomique dépend du système. Dans le système orthosympathique, le relais est à distance de l'organe à innover, dans les ganglions rachidiens végétatifs paravertébraux, prévertébraux et préviscéraux ; dans le système parasymphatique le relais s'effectue au voisinage de la paroi des viscères.

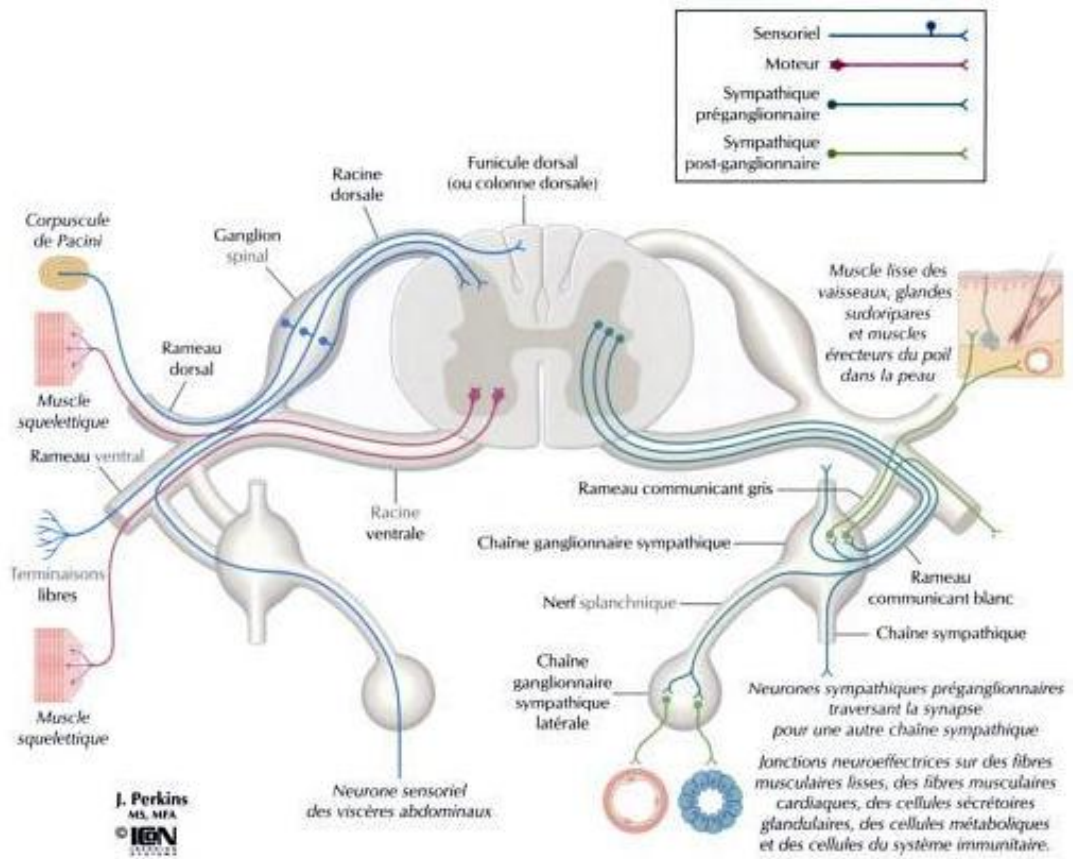


Figure 1: Schema de la moelle épinière avec les composants moteurs, sensitifs et autonomes du système nerveux périphérique (d'après l'Atlas de Neurosciences humaines de Netter).

## 2) Architecture des nerfs périphériques

Un nerf périphérique est constitué d'un ensemble de fascicules au sein desquels se distribuent les fibres nerveuses (l'axone et ses cellules de Schwann satellites).

Le fascicule est limité par le périnèvre constitué de couches de cellules périneurales de type fibroblastique séparées par des faisceaux de collagène. L'endonèvre correspond au tissu conjonctif intrafasciculaire. La moitié de la surface fasciculaire est occupée par les fibres nerveuses elles-mêmes. Le reste est composé d'une matrice de collagène de type I, de fluides endoneuraux, de fibroblastes et de rares mastocytes et macrophages. Les fascicules nerveux se rassemblent dans un tissu conjonctif lâche appelé l'épinèvre qui assure la fixation et le glissement du nerf avec les structures de voisinage. Il contient le réseau vasculaire et lymphatique. À l'extrémité proximale, l'endonèvre du nerf fusionne avec celui de la racine, tandis que l'épinèvre fusionne avec la dure-mère. À l'extrémité distale, le périnèvre s'amincit et entre en continuité avec les capsules des organes sensoriels. En revanche, il s'interrompt avant la jonction neuromusculaire, laissant un court espace ouvert.

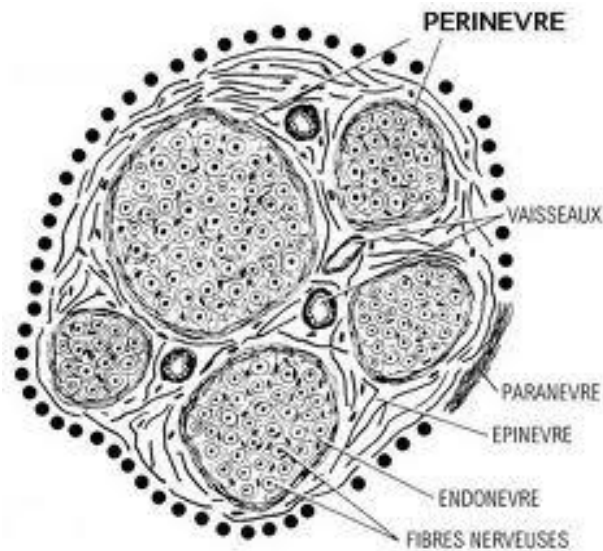


Figure 2: Architecture des nerfs périphériques: Représentation schématique d'une coupe transversale d'un nerf rachidien (d'après le cours d'histologie du Pr Daniel Balas, Université Sophia Antipolis, Nice).

Quant à l'organisation longitudinale, le nombre et la distribution des fascicules varient en permanence tout au long du nerf du fait de fusions et d'échanges de rameaux anastomotiques entre eux. Un nerf peut contenir de 1 à 100 fascicules. Les fascicules sont plus nombreux dans les régions proximales et tendent à fusionner dans les régions distales. Cette organisation joue un rôle important dans la distribution des fibres nerveuses. Dans les régions proximales, celles-ci se répartissent au hasard et un fascicule contient des fibres destinées à plusieurs branches de division. Les fibres destinées aux branches de division proximales tendent cependant à se grouper en périphérie. Distalement, la proportion de fibres destinées à une branche de division croît d'autant plus qu'on s'approche de la division et le rameau ne s'individualise que peu avant son émergence du tronc du nerf.

### 3) Aspects fonctionnels et structuraux des fibres myélinisées

Au sein du système nerveux, les neurones véhiculent des informations le long de leur axone et les transmettent à d'autres neurones via les synapses. Ces informations sont codées sous forme de dépolarisations stéréotypées de la membrane plasmique, appelées potentiels d'action (PA).

Les neurones sont des cellules hautement différenciées dont l'organisation stéréotypée comprend tout d'abord un corps cellulaire ou soma, avec des dendrites. C'est au niveau de ces dernières que les neurones reçoivent des informations, la morphologie et la taille des dendrites influençant la capacité d'intégration des neurones. Le corps cellulaire est poursuivi par un segment initial au niveau duquel sont générés les PA.

La différence de concentration ionique de part et d'autre de la membrane axonale (excès de charges positives à l'extérieur) génère une différence de potentiel négative de -70 mV, dite potentiel de repos. Ce potentiel résulte de l'équilibre entre la diffusion passive des ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) et le mouvement actif de pompes membranaires. Le potentiel d'action ne se produit que lorsqu'une forte dépolarisation de la membrane survient (diminution de la différence de charge inférieure à -40 mV) suivant la loi du tout ou rien. Le sodium pénètre alors brièvement dans l'axone. C'est la phase ascendante. Très rapidement, une sortie de potassium survient et le potentiel retourne à la normale (phase descendante). Pendant cette période, l'axone devient inexcitable (période réfractaire absolue). Elle est suivie d'une période réfractaire relative correspondant à une hyperpolarisation transitoire de la membrane où seule une stimulation supraliminaire peut induire un potentiel d'action. L'inversion des charges de part et d'autre de l'axolemme, localisée à

l'endroit où est généré le potentiel d'action, crée une différence de potentiel avec les régions avoisinantes, qui permet la propagation de l'influx nerveux par contiguïté. La période réfractaire absolue empêche la propagation rétrograde de l'influx.

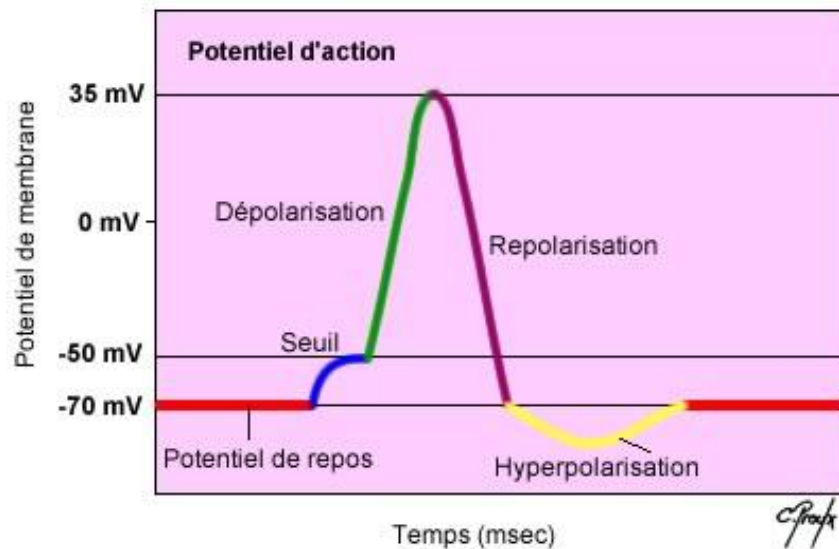


Figure 3: Représentation des différentes phases d'un potentiel d'action (d'après Chantal Proulx, Cours Pharmacie.com.).

Afin d'augmenter la vitesse de l'influx nerveux, qui représente un enjeu majeur lorsque la taille de l'organisme est importante - ce qui est le cas notamment chez les Vertébrés - l'évolution a sélectionné la myéline. Les axones sont myélinisés par des cellules gliales: les cellules de Schwann (CS) dans le SNP, et les oligodendrocytes (OL) dans le SNC. Ces cellules génèrent une gaine isolante autour de l'axone. Les PA sont alors générés au niveau de zones spécialisées, entre deux CS adjacentes: les nœuds de Ranvier. Le message nerveux est alors conduit sur un mode saltatoire, très rapide, d'un nœud de Ranvier au suivant.

La gaine de myéline correspond à l'empilement de multiples couches de membrane plasmique gliale formée par enroulement des CS autour de l'axone, sa composition est donc essentiellement lipidique.

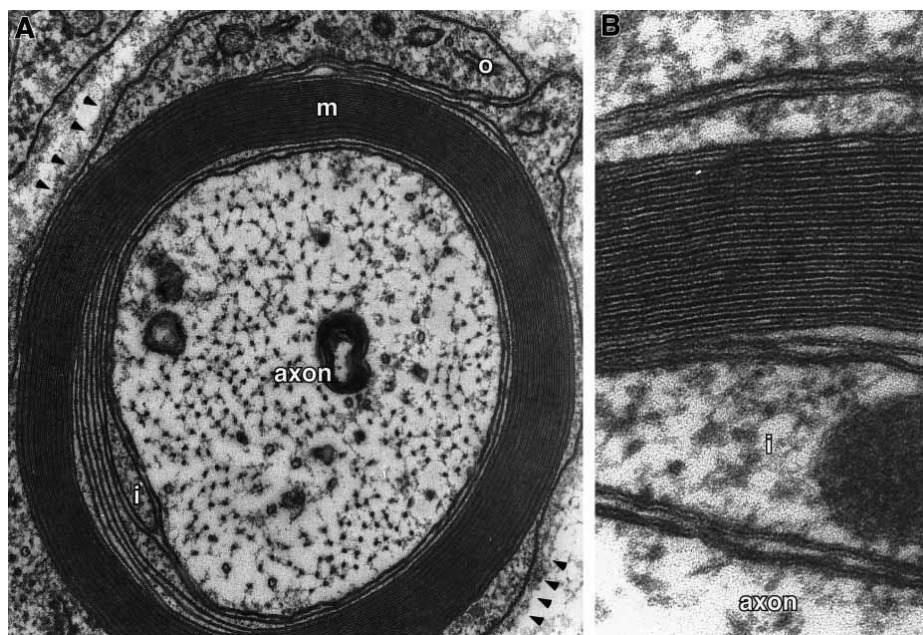


Figure 4: Ultrastructure d'une fibre myélinisée du système nerveux périphérique chez une souris âgée de quatre jours, au microscope électronique à transmission (d'après (1)).

Une des principales caractéristiques qui distingue la myéline des autres membranes biologiques est sa très forte teneur en lipides (70-80%) par rapport à celle en protéines (20-30%). C'est de cette propriété que lui vient sa fonction d'isolant électrique permettant une conduction saltatoire de l'influx nerveux.

La gaine de myéline présente une composition particulière qui lui est propre: Le cholestérol représente environ 20 à 30% des lipides totaux. Les phospholipides comportant de l'éthanolamine et de la choline, ainsi que les sphingolipides (monogalactosylsphingolipides avec cérébrosides Gal-C) sont particulièrement nombreux dans la myéline périphérique.

La composition en acides gras est aussi particulière dans la myéline, comparée aux autres membranes biologiques. L'acide oléique (C18) est majoritaire. On peut noter aussi une forte proportion en acides gras à très longue chaîne carbonée (20 à 24 atomes de carbone), la plupart d'entre eux entrant dans la composition des sphingolipides (Gal-C).

Au niveau internodal, elle est essentiellement de type compact, c'est-à-dire que cette zone de la CS est dépourvue de cytoplasme et que les couches membranaires adjacentes forment des contacts autotypiques étroits, via des interactions entre des protéines membranaires spécialisées (cf Fig. 4). A ce niveau, l'espace extracellulaire est de l'ordre de 2nm.

- La protéine majoritaire dans la myéline du SNP est P0, qui est codée par le gène *Mpz* et qui représente 50% des protéines de myéline (cf Fig. 6). C'est une protéine transmembranaire de 30kDa qui comprend un domaine de type Immunoglobuline glycosylé, une hélice  $\alpha$  transmembranaire et un court domaine cytoplasmique (2). Elle forme des tétramères interagissant de façon homotypique avec les protéines P0 de la couche membranaire adjacente, via leur domaine extracellulaire de type immunoglobuline (Ig). Des mutations de la portion extracellulaire ont été décrites dans des neuropathies démyélinisantes et ont pu être analysées en détail par cristallographie (3). Le domaine extracellulaire porte un unique site de N-glycosylation. Le glycanne correspondant porte l'épitope HNK-1 commun à plusieurs protéines d'adhérence (4). Ce domaine contribuerait à la formation des lignes mineures intrapériodiques de la structure multilamellaire, en accollant les feuilletts exoplasmiques



via des interactions électrostatiques et hydrophobes. Le court domaine cytoplasmique de P0, très basique, participerait à la formation des lignes périodiques denses en accolant très étroitement les feuillettes endoplasmiques via des interactions électrostatiques avec les phospholipides chargés négativement. Des expériences d'inactivation du gène *Mpz* ont montré que la protéine P0 est essentielle dans la spiralisation des CS, la compaction de la myéline, sa maintenance ainsi que l'intégrité des axones myélinisés (5).

- Les protéines MBP sont de petites protéines qui possèdent un fort pourcentage d'acides aminés basiques, ainsi, chargées positivement, et qui représentent une part importante des protéines cytosoliques de la myéline compacte. Elles sont synthétisées dans les OL comme les CS. Les protéines MBP présentent un polymorphisme important dû notamment à un épissage alternatif. Elles sont localisées contre le feuillet endoplasmique de la membrane des CS et participeraient très probablement à l'accollement de deux feuillettes adjacents via des interactions électrostatiques, à l'instar du domaine cytoplasmique de la protéine P0. MBP a été décrite comme une protéine multifonctionnelle interagissant avec de nombreuses molécules polyanioniques, non seulement avec les lipides membranaires mais aussi avec des protéines du cytosquelette comme l'actine, la tubuline et la clathrine (6). MBP fait l'objet d'une régulation multiple s'exerçant notamment via des modifications post-traductionnelles qui modifient sa charge électrique globale. Le gène *MBP* est sous la dépendance d'enhancers différents dans les OL et les CS (7). *MBP* est situé dans un locus beaucoup plus large appelé *Golli-MBP* (8). Ce locus

contient deux sites d'initiation de transcription, du fait d'un système de promoteurs alternatifs: le premier qui permet la synthèse des protéines MBP et le deuxième, situé plus en amont qui permet la synthèse des protéines Golli, ces dernières n'étant pas des protéines de myéline.

- PMP22 est une autre protéine membranaire de la myéline compacte qui contient en revanche 4 domaines transmembranaires représentant 2 à 5% des protéines de la myéline du SNP. Des expériences de knock-out chez la souris ont montré que PMP22 était impliqué dans l'initiation de la myélinisation, la détermination de l'épaisseur de la gaine, ainsi que sa stabilité (9).

Au sein de la gaine de myéline compacte internodale existent par ailleurs des zones de myéline non compacte.

Les incisures de Schmidt-Lanterman sont des canaux de cytoplasme se mettant en place lors de la formation de la gaine de myéline, assurant ainsi l'existence d'une voie de diffusion hélicoïdale reliant la zone périaxonale de la cellule gliale avec sa région périnucléaire. Il existe d'autres zones de myéline non compacte au niveau des fibres myélinisées: les boucles paranodales, correspondant aux extrémités latérales des couches membranaires internodales et formant des saccules cytoplasmiques interagissant entre eux et avec l'axone, ainsi que les microvillosités, prolongements membranaires de la CS recouvrant l'axone au niveau nodal. Au niveau de la myéline non compacte, les espaces extracellulaires sont de l'ordre de 12-14nm.

Les CS forment également de nombreuses jonctions autotypiques au niveau des zones de myéline non compacte.

- Le premier type de jonctions observées sont des jonctions dites adhérentes (10). Elles sont basées sur l'interaction homotypique des E-cadhérines, molécules dépendantes du calcium. Les E-cadhérines (Epithelial cadhérines) sont une superfamille de protéines transmembranaires d'adhérence, calcium-dépendantes. Les E-cadhérines sont constituées d'une région aminoterminal extracellulaire (divisée en cinq domaines dont la plupart possèdent des sites de liaison au calcium), d'un domaine transmembranaire, et d'une région carboxyterminale intracellulaire responsable d'interactions avec des protéines cytoplasmiques. Au niveau intracellulaire, la E-cadhérine interagit avec la  $\beta$ -caténine qui la connecte au cytosquelette, et plus particulièrement aux filaments d'actine. Il a été montré que les membranes paranodales des CS devenaient désorganisées dans un milieu ne contenant pas de calcium, suggérant un rôle possible de ces protéines dans l'organisation de cette région (11). Des expériences utilisant des anticorps spécifiques ont ensuite montré qu'il s'agissait de glycoprotéines d'adhérence majoritaires au niveau de la myéline non compacte (10). Les E-cadhérines apparaissent comme étant des constituants majeurs du réseau cytoplasmique des CS, déterminant ainsi leur polarisation.
- Le deuxième type de jonctions présentes à ce niveau de la myéline correspond aux jonctions serrées (12), qui favorisent l'existence de domaines membranaires spécialisés en limitant la fluidité de la membrane, et assurant ainsi la séparation entre myéline compacte et non compacte. Elles assurent également une perméabilité sélective aux molécules. Les protéines impliquées dans ces jonctions sont les

claudines, protéines membranaires intégrales à quatre domaines transmembranaires. La claudine-1 est localisée dans les boucles paranodales et la région périaxonale, alors que la claudine-5 est retrouvée dans les incisures de Schmidt-Lanterman (13).

- Le dernier type de jonctions autotypiques observées sont les jonctions communicantes localisées au niveau des incisures et des boucles paranodales (12). Elles sont composées de deux connexons formant un canal entre les deux compartiments cytoplasmiques adjacents, favorisant les échanges d'ions et de diverses molécules de faible poids. Chaque connexon est un ensemble de six connexines, majoritairement la connexine 32 et la connexine 29, pour les jonctions communicantes au niveau des CS (14). La connexine 32 n'était pas connue pour jouer un rôle dans la myélinisation du SNP avant qu'elle ne se révèle impliquée dans des formes de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth liées à l'X. La connexine 32 est une protéine possédant 4 domaines hydrophobes transmembranaires. Du fait de sa localisation au sein de la myéline non compacte et notamment au niveau des incisures de Schmidt-Lanterman, il a été montré que les jonctions communicantes formées assurent une voie de diffusion radiale directe au travers de la structure multilamellaire, contrairement à la voie beaucoup plus longue qui emprunte les canaux cytoplasmiques. Ces voies de diffusion auraient pour rôle d'assurer une homéostasie ionique dans le cytoplasme des CS. La connexine 32 pourrait aussi assurer une communication entre l'axone et les CS. Le gène codant la connexine 32, *Gjb1*, produit 2 transcrits alternatifs qui diffèrent par leur zone 5' non traduite, et qui sont l'objet

d'une régulation tissu-spécifique par un système de promoteur alternatif (15).

- La première molécule impliquée dans ces interactions lors de la formation de la gaine est la protéine MAG (Myelin Associated Glycoprotein). On la retrouve au niveau de la membrane périaxonale des CS, des boucles paranodales et des incisures de Schmidt-Lanterman, ce qui en fait une protéine spécifique de la myéline non compacte. La portion amino-terminale extracellulaire de MAG comporte cinq domaines immunoglobuline-like (16). Elle se fixe à des gangliosides spécifiques portés par la membrane axonale, participant probablement à l'adhérence des CS myélinisantes à l'axone (17). D'autres études suggèrent que le premier domaine Ig-like montre de fortes similitudes avec le domaine de liaison à l'acide sialique des sialoadhésines (18). MAG pourrait aussi jouer un rôle dans la transduction de signaux dans les CS. Du fait d'un épissage alternatif, 2 isoformes de MAG sont produites, L-MAG et S-MAG, différant uniquement par leur portion carboxy-terminale (19). L-MAG est localisée uniquement au niveau de la membrane périaxonale où elle pourrait jouer un rôle de signalisation comme l'attestent ses interactions avec de multiples protéines cytoplasmiques telles que S-100 $\beta$  (20) et la phospholipase C  $\gamma$  (21). S-MAG, elle, remplirait une fonction structurale propre à la myéline non-compacte.
- La périaxine est une protéine de la myéline non-compacte du SNP, de 170kDa, située proche de la membrane périaxonale des CS, (22) qui possède 2 isoformes générées par un épissage alternatif: la L-périaxine et la S-périaxine (23). Des mutations induisant une perte de fonction ont

été décrites dans des neuropathies démyélinisantes (24). Le domaine commun aux deux isoformes aurait une conformation similaire aux domaines PDZ. Les domaines PDZ sont des domaines modulaires qui reconnaissent et se lient à la partie carboxyterminale de leurs cibles. La périaxine pourrait interagir avec le domaine cytoplasmique de récepteurs au glutamate (25). Des expériences sur des souris inactivées pour la périaxine ont montré que cette protéine jouait un rôle non pas dans son développement mais dans sa stabilisation (26).

Enfin, les CS interagissent avec une lame basale qu'elles produisent elles-mêmes. Elles expriment notamment des récepteurs aux laminines, protéines trimériques correspondant au constituant majeur de la lame basale. L'un de ces récepteurs aux laminines est le dystroglycane, molécule transmembranaire interagissant au niveau intracellulaire avec DRP2 et la Périaxine (27).

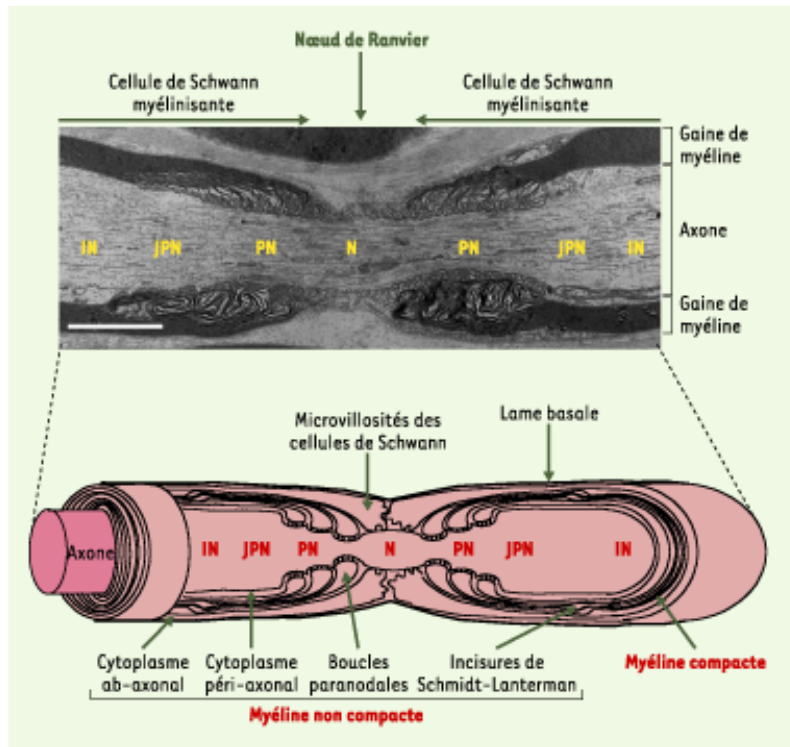


Figure 5: Organisation de la myéline compacte et non compacte, vue en microscopie électronique puis schématisée. N: Nœud ; PN: Paranoëud ; JPN: Juxta paranoëud ; IN: Internoëud (d'après (28)).

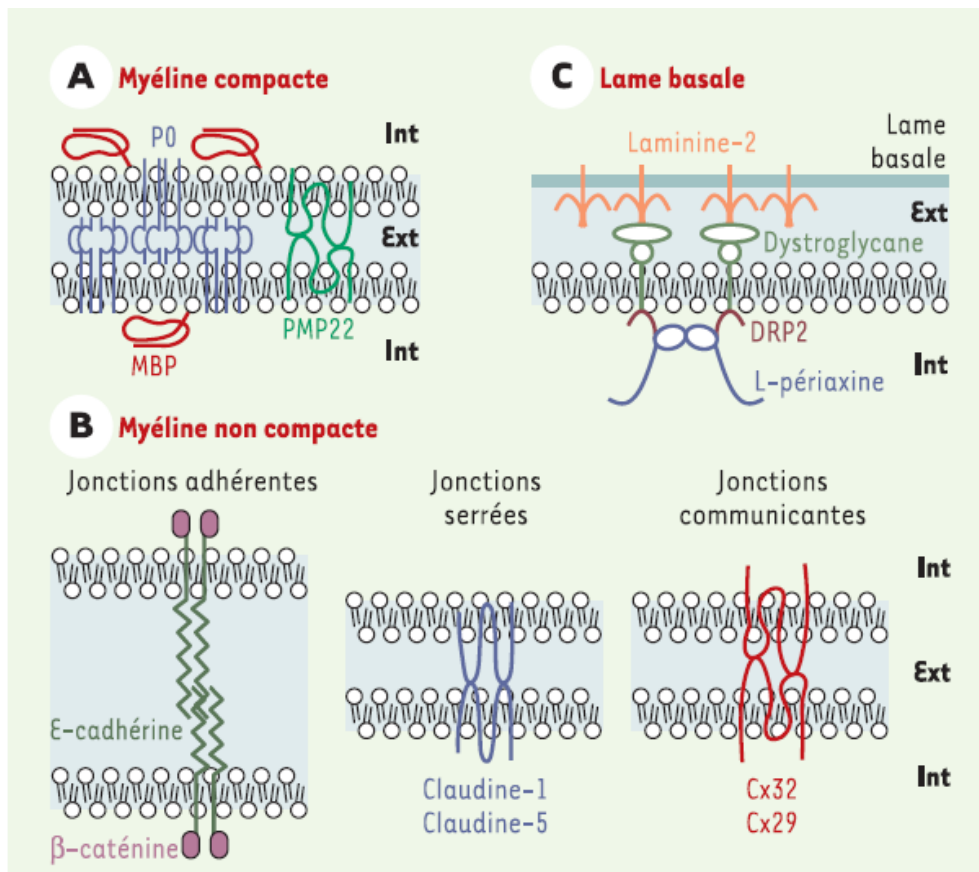


Figure 6: Organisation moléculaire des interactions gliales autotypiques et de la connexion entre la cellule gliale et la lame basale, dans le système nerveux périphérique (d'après (28)).



#### 4) Organisation de la région nodale

Les nœuds de Ranvier correspondent à une zone d'interruption de la gaine de myéline entre deux CS myélinisantes adjacentes. La région nodale axonale possède une structure moléculaire particulière, lui permettant d'assurer l'existence des flux d'ions transmembranaires nécessaires à la propagation saltatoire du message nerveux. Au niveau nodal, on retrouve en effet une forte concentration de canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants, dépassant les  $1200/\mu\text{m}^2$  (29). Ce sont des complexes multimériques composés d'une sous-unité  $\alpha$  formant le pore du canal proprement dit et d'une sous-unité  $\beta$  (30). Ces dernières modulent l'ouverture du canal et jouent le rôle de molécules d'adhérence via leur domaine immunoglobuline extracellulaire. D'autres types de canaux ioniques sont présents comme les canaux potassiques. On retrouve à ce niveau un enrichissement en pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, permettant le maintien de la fonction physiologique du nœud (1). D'autres molécules ont également été caractérisées au niveau de la région nodale: des molécules d'adhérence CAM, la Nr Cam et la Neurofascine 186, et des molécules du cytosquelette comme l'ankyrine G et la spectrine  $\beta$  IV. Ces molécules forment un réseau complexe en relation avec les canaux  $\text{Na}^+$ , nécessaire à la localisation nodale de ces derniers (31).

## 5) Contacts axogliaux au niveau des fibres myélinisées

Les contacts axogliaux désignent les zones de jonction entre les axones et les cellules gliales. Dans le SNP, ces contacts ont lieu au niveau nodal et internodal. Les internoeuds représentent 99% des zones d'interaction entre axones et CS. L'interaction gliale y est uniformément répartie avec une séparation de 15nm entre la membrane plasmique de la CS et l'axolemme. Le candidat proposé pour médier cette interaction est la protéine MAG. Cette dernière est également connue pour favoriser la remyélinisation via ce type d'interaction (32). Dans le SNP, il existe de plus 2 structures spécialisées au niveau de l'axone, liées à la présence des zones de myéline non-compacte: le juxtamésaxone et la juxta-incisure. Le mésaxone interne est en continuité avec la spirale paranodale. On retrouve au niveau du juxtamésaxone MAG, la Neurofascine, et parfois la Connexine 29 sur la membrane gliale, tandis qu'on observe Caspr (contactin-associated-protein, qui appartient à la famille des neurexines) et la contactine à la surface axonale, flanquée de chaque côté par Caspr2, Tag1 (transiently-expressed-axonal-glycoprotein-1) et des canaux K<sup>+</sup> (29). La juxtaincisure est une structure en anneau reproduisant l'organisation moléculaire des incisures de Schmidt-Lanterman (1).

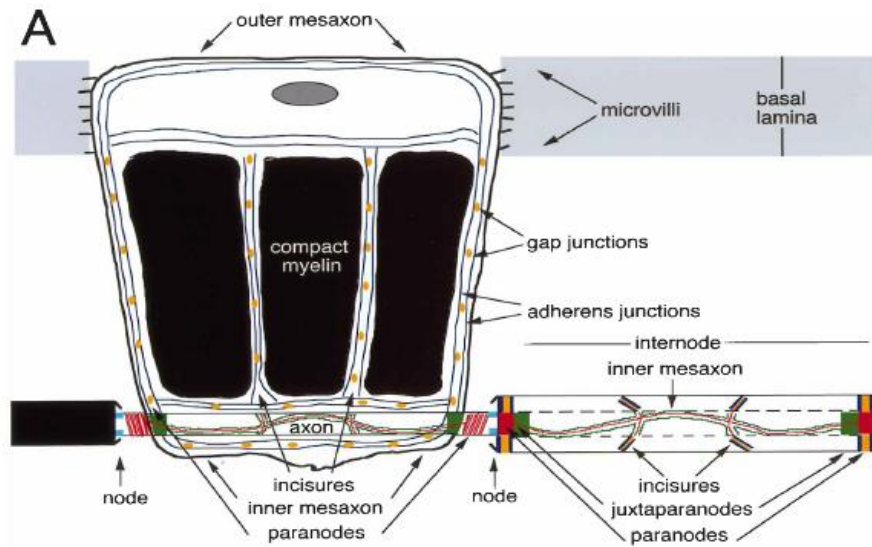


Figure 7: Vision schématique d'un axone myélinisé dans le SNP (d'après(1)).

## **B) Développement des cellules de Schwann**

### **1) Les cellules de Schwann sont originaires des crêtes neurales, et leur survie et leur maturation dépendent de signaux axonaux**

#### a) Les cellules de Schwann

Lors du développement des nerfs périphériques, les cellules des crêtes neurales génèrent les CS myélinisantes et non-myélinisantes (33), qui vont s'associer aux axones de large et de faible diamètre respectivement. Il existe des étapes intermédiaires dans la différenciation des CS (34) (cf Fig. 8).

Les cellules des crêtes neurales se différencient d'abord en précurseurs de cellules de Schwann (PCS) à E12-13 chez la souris (la gestation chez la souris dure 19 jours). On retrouve donc déjà des cellules gliales précoces au sein des nerfs embryonnaires lors de leur croissance. Les nerfs correspondent à ce stade à un ensemble d'axones compacts étroitement associés à des PCS, et sont dépourvus de tissu connectifs protecteurs, et de vascularisation, qui se mettent en place plus tardivement, après que ces premiers aient atteint leur cible (35). Les PCS ne sont pas nécessaires à la croissance axonale, mais assurent diverses autres fonctions: ils servent de sources aux CS que l'on retrouve au niveau des nerfs en période périnatale, de support trophique pour les axones, et sont essentiels pour que leur fasciculation ait lieu correctement (36). Enfin, ils sont peut-être à l'origine de la petite population de fibroblastes observée au niveau des nerfs périphériques.

La seconde étape correspond au passage, vers E15, des PCS à l'état de cellules de Schwann immatures (ISC), dont le devenir myélinisant ou non-myélinisant n'est pas encore défini. Au même moment, diverses modifications se produisent au niveau du nerf, dont le phénomène de vascularisation ainsi que la mise en place de la couche cellulaire externe, nommée perineurium. Au niveau des cellules gliales, on observe une évolution coordonnée de l'expression génique et de la réponse aux signaux de survie et de prolifération. Les ISC possèdent notamment la capacité de mettre en place une voie autocrine de signaux de survie. Le passage d'une dépendance à des signaux paracrines de survie axonaux pour la survie des PCS, permettant d'ajuster leur nombre, à un mode de survie autocrine est sans doute un des éléments majeurs pour permettre la survie des CS dans le cas de lésion et dégénérescence des axones. Ce phénomène assure notamment la possibilité de réparation et remyélinisation après régénération axonale. Parmi les facteurs contrôlant la transition entre PCS et ISC, AP2 $\alpha$  et l'endothéline sont connus comme étant des facteurs inhibiteurs.

Le devenir post-natal des ISC dépend des caractéristiques des axones auxquels elles s'associent de façon aléatoire, le processus de myélinisation s'activant dans celles interagissant spécifiquement avec un axone isolé de fort diamètre (>1 $\mu$ m). La différenciation en cellules myélinisantes et non myélinisantes est un processus lent qui commence durant la période périnatale et se déroule en plusieurs semaines.

Les cellules myélinisantes vont subir de profondes modifications morphologiques et biochimiques durant cette phase. Elles vont en effet synthétiser des lipides pour produire la membrane qui va s'enrouler autour de l'axone pour former la gaine de myéline. Elles vont également activer les gènes

aits de myéline, comme *Mpz*, *PMP22* ou *MPB*, afin de produire les facteurs permettant de stabiliser et compacter cette gaine. Cette activation va être suivie de la baisse d'expression d'autres gènes, tels p75, GFAP, la NCAM ou la L1 CAM, qui sont exprimés dans les ISC et les CS non myélinisantes.

Les facteurs de transcription favorisant la transition vers un devenir myélinisant sont Brn2, SKI, Oct6, puis Krox20 et les Nabs, inhibant la prolifération et étant nécessaires à l'expression des gènes de myéline. Cette transition est également contrôlée par des facteurs extrinsèques aux CS, certains la promouvant, comme la Neuréguline 1, le GDNF, des IGF, la progestérone ou encore la laminine. D'autres facteurs vont au contraire l'inhiber, comme Notch ou les TGF $\beta$ , qui favorisent respectivement la prolifération et la mort cellulaires des cellules gliales en différenciation (33).

Outre l'aspect moléculaire, les cellules de la voie de différenciation des Schwann présentent des rapports divers avec leur environnement. Ainsi, si les cellules des crêtes neurales présentent des capacités migratoires, les PCS comme les ISC sont intimement associés à des axones, état caractéristique des cellules gliales. De plus, les PCS et les cellules des crêtes neurales présentent des réponses très différentes aux facteurs de survie. Concernant les PCS et les ISC, seules ces dernières présentent une lame basale et sont aptes à assurer leur propre survie via des signaux autocrines, les PCS nécessitant la présence de signaux paracrines.

Le processus de différenciation vers la voie myélinisante est donc un phénomène extrêmement régulé et nécessite un dialogue complexe entre les CS et leur environnement. Il est intéressant de noter que les cellules des crêtes neurales, les PCS, et les ISC prolifèrent rapidement *in vitro*, et que seule l'étape finale de différenciation est corrélée avec une sortie du cycle cellulaire. En cas de dédifférenciation des cellules matures, celles-ci se remettent à proliférer

(37). L'un des caractères des CS est donc leur grande plasticité, maintenue tout au long de leur voie de différenciation.

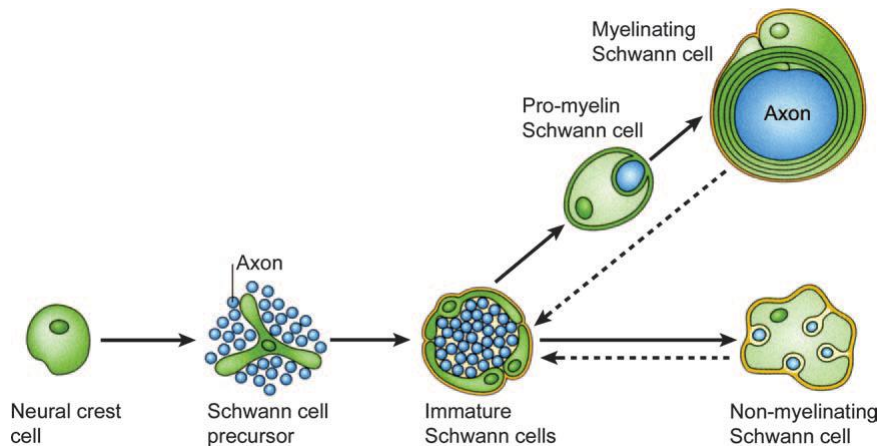


Figure 8: Le lignage des cellules de Schwann.

Illustration schématique des principaux types cellulaires et des transitions développementales. Les flèches en pointillés indiquent le caractère réversible des transitions. Durant le développement embryonnaire, 3 types cellulaires se succèdent: les cellules des crêtes neurales, les précurseurs des cellules de Schwann, et les cellules de Schwann immatures. Les transitions finales génèrent des cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes (d'après (34)).

## b) Les signaux régulant la survie et la différenciation des cellules de Schwann

Les transitions entre chaque étape du développement des CS sont dépendantes de signaux médiés par des facteurs de survie, des mitogènes et des facteurs de différenciation émis par l'axone, avec lequel interagissent les cellules gliales (38). Certains signaux ont déjà été évoqués plus haut et seul le signal majeur pour le développement des CS sera véritablement développé ici.

La Neuréguline 1 axonale apparaît comme jouant un rôle prépondérant dans le processus de myélinisation. Il existe plus de 15 isoformes de Neuréguline 1. La

présence du domaine EGF suffit à la Neuréguline 1 pour assurer ses fonctions biologiques via sa fixation sur les récepteurs membranaires ErbB. Les formes transmembranaires de la Neuréguline 1, subissant un clivage protéolytique au niveau juxtamembranaire sont les plus répandues dans le SNP. Ce clivage induit la libération des isoformes I et II de la Neuréguline 1, qui correspondent donc à un signal paracrine. L'isoforme III, la plus active lors du développement des CS, possède un second domaine transmembranaire, qui la maintient ancrée dans la membrane axonale après clivage. Il s'agit donc cette fois d'un signal juxta-paracrine. La Neuréguline 1 interagit avec les récepteurs ErbB3 et ErbB4 et leur co-récepteur ErbB2. L'interaction prédominante pour la différenciation et la survie des CS est celle de l'isoforme III de la Neuréguline avec le couple ErbB3-ErbB2 exprimé par les CS. Chez les mutants affectant la voie de signalisation de la Neuréguline 1, les PCS et plus tardivement les CS sont absents ou présents en très faible nombre au niveau des nerfs spinaux (39). La Neuréguline 1 est nécessaire à la migration des cellules des crêtes neurales depuis les DRG vers les nerfs spinaux, ce qui peut jouer un rôle dans les phénotypes observés au niveau de ces nerfs. Cela reflète également le rôle probable de la Neuréguline 1 en tant que facteur de survie sécrété par les axones et mitogène pour les PCS. La Neuréguline 1 est un facteur de survie essentiel pour les PCS *in vitro*, dont elle stimule de plus la prolifération. L'expression de la Neuréguline 1 au niveau des DRG et des neurones moteurs est compatible avec ce rôle *in vivo*, car cette expression est observée au stade où les PCS colonisent les axones. La survie des PCS dépend de la Neuréguline 1 *in vivo* et la présence de ce facteur suffit à endiguer le processus de mort cellulaire affectant les PCS en cas d'induction d'une perte axonale. Des résultats comparables ont également été observés dans le cas des CS plus différenciées. Par ailleurs, ce facteur favorise le processus de différenciation des PCS et la prolifération précédant la



myélinisation. La Neuréguline 1 est donc impliquée dans la génération, la prolifération et la survie des CS. Elle semble promouvoir la myélinisation et l'accroissement de l'épaisseur de la gaine de myéline de façon dose-dépendante (40). Enfin, la voie de signalisation de la Neuréguline 1(41) semble jouer également un rôle important pour la différenciation correcte des CS non-myélinisantes, dont le développement et la fonction sont altérés chez les mutants pour l'isoforme III de la Neuréguline 1 ainsi que chez la souris exprimant un dominant négatif du récepteur ErbB4.

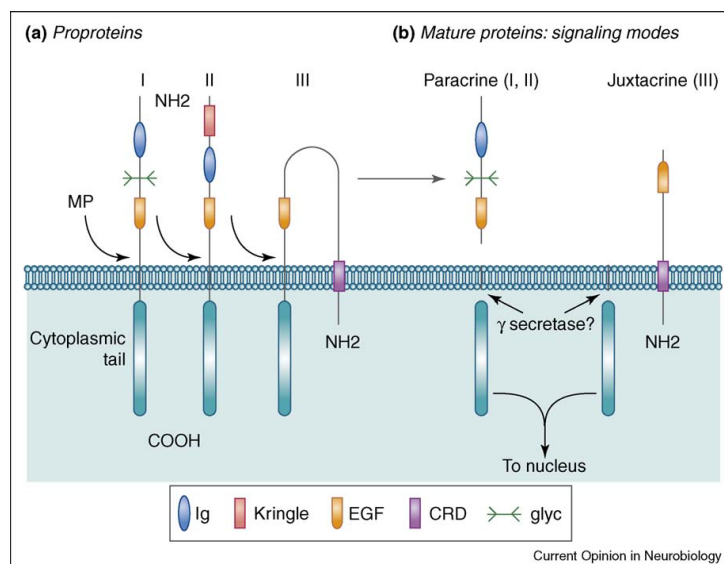


Figure 9: Les différentes isoformes de la Neuréguline 1: disposition membranaire et signalisation (d'après (41)).

## 2) Les différentes étapes de la myélinisation

### a) Mécanismes moléculaires préparant à la myélinisation

A E18 chez le rat (environ E16 chez la souris), les nerfs consistent en des faisceaux d'axones interagissant avec des cellules gliales, séparés par du tissu conjonctif contenant des fibroblastes endoneuraux et des vaisseaux sanguins. Cette organisation correspond globalement à celle que l'on retrouve chez les adultes. Les ISC entourent alors en commun des groupes d'axones et la myélinisation débute quelques jours plus tard, à la naissance pour le rat et vers E18,5 pour la souris. Cette évolution nécessite un tri radial, c'est-à-dire un processus qui va permettre de passer à une interaction 1:1 entre cellules gliales et axones. Le nombre de CS est en parallèle régulé par des signaux de mort et de survie, et un certain nombre de signaux limitant une myélinisation prématurée sont également présents.

Le tri radial est un phénomène qui se poursuit après la naissance, les CS ségrégeant progressivement des groupes de cellules gliales où elles se trouvaient pour s'associer à un unique axone de large diamètre (stade pré-myélinisant), formant une interaction 1:1 stable caractéristique du stade pro-myélinisant. Les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal connus, mais ce processus est perturbé chez les mutants pour la laminine 2 ou l'intégrine  $\beta 1$ , sous-unité des récepteurs à la laminine exprimés par les CS (42). La laminine 2 et la laminine 8 possèdent un rôle important dans la myélinisation et la défasciculation des neurones du SNP et semblent de plus appartenir à la voie contrôlée par la Neuréguline (43). La défasciculation est

également altérée chez les mutants *claw paw*, où le gène *Lgi4*, codant normalement une protéine sécrétée, subit une perte de fonction (44).

Parallèlement à ce phénomène, il est important de réguler le nombre de CS pour qu'il soit ajusté au nombre d'axones, et ce, par des signaux de survie ou de mort cellulaire pour les CS.

- Les axones eux-mêmes contrôlent de façon importante la prolifération des CS *in vitro* et la perte de contact des CS avec les axones en cas de section de nerfs chez les animaux nouveaux-nés limite beaucoup leur prolifération *in vivo*. La Neuréguline 1 est un mitogène pour les CS *in vitro* mais ce rôle n'a pas été clairement caractérisé *in vivo*. D'autres mitogènes potentiels sont les TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), qui sont exprimés par les nerfs embryonnaires (45). Enfin, l'interaction des CS avec les laminines favorise la prolifération dans les nerfs en cours de développement (43) de même que les signaux autocrines évoqués précédemment.
- Le nombre des ISC est également contrôlé par un phénomène de mort cellulaire durant la période périnatale. Deux types de signaux favorisant ce processus pour les CS *in vivo* ont été caractérisés à ce jour. Le premier est médié par le récepteur aux neurotrophines p75, possiblement après activation par liaison au NGF (Nerve Growth Factor) (46). La seconde implique la voie des TGF $\beta$ . Il est possible de restreindre l'augmentation de la mort cellulaire après section des nerfs de souris chez les nouveaux-nés, par injection d'anticorps bloquant la voie des TGF $\beta$  et par délétion des récepteurs au TGF $\beta$  dans les CS (45).

Finalemment, il existe plusieurs voies de signalisation actives dans les ISC qui inhibent leur différenciation et il est nécessaire de supprimer leur action pour entamer le processus de myélinisation.

- La première voie implique la signalisation JNK (c-Jun-amino (N)-terminal kinase), active entre E18 et la naissance, période pendant laquelle elle est nécessaire pour le relais des signaux Neuréguline et TGF $\beta$  (47). Cette voie de signalisation est inactivée dans les CS lors de leur entrée dans le processus de myélinisation par le biais du facteur de transcription Krox20, via notamment l'activation de JIP-1. Si l'on bloque cette inhibition, la voie JNK reste active, la myélinisation dans des cocultures de neurones et de CS est bloquée, et l'expression des gènes de myéline normalement activée par l'AMPC et Krox20, n'est pas induite.
- La seconde voie freinant la différenciation caractérisée à ce jour est celle du facteur Notch, qui favorise la prolifération des ISC, est qui est également inhibée lorsque les cellules entrent dans le processus de myélinisation. Là encore, si cette inhibition est levée, la myélinisation n'a pas lieu.

Parallèlement à l'inhibition des voies freinant la myélinisation, il est nécessaire d'activer des voies pro-myélinisantes impliquant Oct6 et Brn2 (48), Krox20 (49), et les Nabs, ainsi que PI3K (50), et SKI (51). L'interaction précise entre ces voies positives et négatives s'avère complexe et est encore mal définie, tout comme

les voies moléculaires causales qui initient la transition nécessaire à l'entrée en phase de myélinisation.

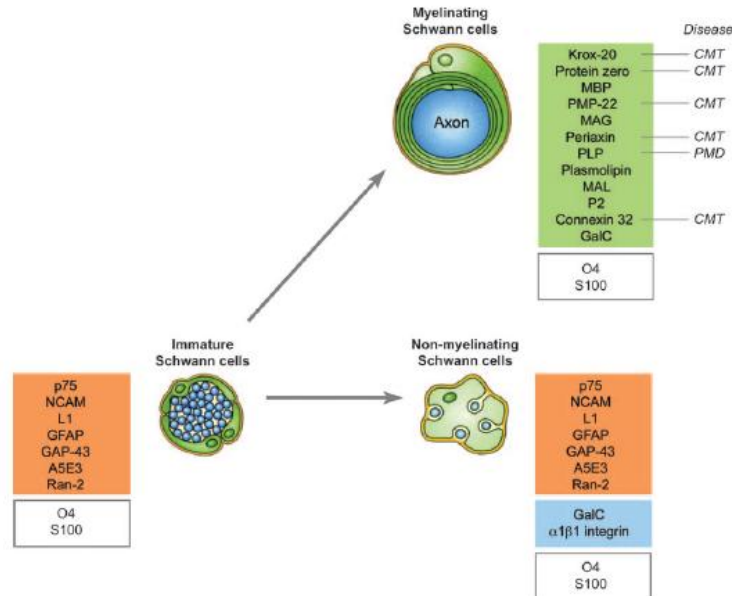


Figure 10: Modification de l'expression de marqueurs moléculaires lorsque les cellules de Schwann immatures se différencient en cellules de Schwann matures myélinisantes et non-myélinisantes (d'après (34)).

## b) La formation de la gaine de myéline

La gaine de myéline est formée par l'enroulement progressif de la membrane plasmique interne des CS autour de l'axone (52). La membrane est ensuite compactée par élimination du cytoplasme, conduisant à une organisation multilamellaire. Ces événements morphologiques sont marqués par des modifications d'expression des molécules d'adhérence exprimées par l'axone et la CS. Notamment la L1-CAM est réprimée lors de la myélinisation. En revanche, MAG, molécule d'adhérence exprimée par les CS qui favorise l'association avec la partie internodale de l'axolemme, est très fortement

exprimée après la formation du premier tour et demi de la gaine de myéline (53).

Durant la période de la synthèse active de la myéline, la plupart des modifications biochimiques observées au niveau du nerf résultent de l'augmentation rapide de la synthèse des composants de la gaine.

On observe notamment chez le rat une forte accumulation de P0 entre le jour 5, où elle représente 3% des protéines purifiées à partir des nerfs sciatiques, et le jour 22, où elle représente plus de 15%. L'expression de l'ARNm codant P0 commence vers E18, puis augmente jusqu'au 10ème jour de développement post-natal environ, où elle atteint son maximum. Ce taux est maintenu pendant les 10 jours suivants, correspondant à la phase de production maximale de la protéine. Celle-ci subit de plus des modifications post-traductionnelles pouvant jouer un rôle dans sa localisation membranaire, puis dans les interactions qu'elle développe. En cas de lésion, le taux d'expression du gène *Mpz*, codant P0 est fortement réduit, accompagnant ainsi le phénomène de démyélinisation.

Le profil d'expression de l'ARNm et de la protéine PMP22 est comparable à celui de P0 (54). Le profil d'expression de *MBP*, étudié chez la souris, est comparable à celui de *Mpz* chez ce modèle, bien qu'il soit légèrement retardé. Il a été montré que la synthèse de la protéine MBP se produisait directement dans les zones de croissance de la myéline, par traduction localisée de son ARNm. Il faut noter de plus qu'il existe plusieurs isoformes de MBP et que leur quantité relative évolue au cours de la myélinisation, suggérant des fonctions biologiques distinctes (55).

La connexine 32, qui joue un rôle dans le maintien de la gaine de myéline, pourrait également intervenir lors de sa formation. Elle disparaît en effet en même temps que les autres protéines de myéline en cas de transection des

nerfs et est détectée dans les incisures de Schmidt-Lanterman et les régions paranodales au cours de la remyélinisation (14).

Au regard du rôle isolant de la myéline, reposant notamment sur sa forte teneur en lipides, il n'est pas étonnant que la synthèse de ces molécules soient l'élément le plus profondément remanié au cours de la myélinisation.

Un des constituants majeurs lipidiques de la myéline est le cholestérol. Il est synthétisé *in situ*, et sa biosynthèse et son accumulation sont finement régulées. En effet, l'ARNm codant l'enzyme limitant de la voie de synthèse du cholestérol, l'HMG-CoA-réductase, est exprimé selon le même profil que l'ARNm P0. L'augmentation de cette expression n'est pas directement liée à un signal de myélinisation, mais à la consommation massive de cholestérol au niveau de la gaine (56). La plupart des lipides présents au niveau du nerf sciatique chez la souris, comprenant la sphingomyéline, Gal-C et SGal-C (galactolipides), ainsi que l'éthanolamine, la sérine et l'inositoldiacylphosphoglycéride, présentent des profils d'accumulation similaires à ceux des protéines de structure de la gaine de myéline, avec une phase d'accumulation lente dans les dix premiers jours, puis une période très active, et enfin une réduction du taux d'accumulation. Cependant, les proportions relatives de ces différents lipides varient au cours des trois phases, notamment en raison de différences dans la cinétique de leur accumulation au niveau des membranes. Les galactolipides sont ainsi préférentiellement accumulés en fin de myélinisation. Si leur rôle n'est pas encore clairement caractérisé, on sait néanmoins que leur taux est important dans la gaine de myéline (entre 15 et 25% des lipides accumulés) et que la déplétion ou la surexpression chez des souris de l'enzyme qui les synthétise, la céramide

galactosyltransférase (CGT), induit une déstabilisation de la gaine et altère sa fonction (57).

Finalement, le cytosquelette, et notamment les microfilaments, paraissent également jouer un rôle majeur dans ce processus (58). Elle régule en effet la transduction mécanique du couple actine-myosine en phosphorylant la chaîne légère de la myosine. L'absence de ROCK conduit à la formation par une CS de plusieurs internoeuds de taille réduite, le processus myélinisant se fragmentant. Le rôle de l'actine au cours de la myélinisation a été montré par des études de perturbation du cytosquelette à l'aide de cytochalasine D (59). De faibles concentrations de cytochalasine entraînent l'arrêt de l'enroulement en spirales de la membrane de la CS autour de l'axone. L'absence de filaments d'actine fonctionnels induit en effet une inhibition de l'expression des gènes codant les protéines de myéline, d'où un arrêt de la croissance de l'extension membranaire myélinisante (52). Cela concorde avec le fait que les microfilaments seraient un des éléments faisant le lien entre régulation du profil génique des CS myélinisantes et signaux axonaux.

L'épaisseur de la gaine de myéline est également un élément finement régulé, et il semble dépendant du calibre de l'axone. Le g-ratio est le rapport entre le diamètre de l'axone et de la fibre myélinisée (gaine de myéline plus axone). La plupart des fibres myélinisées possèdent un g-ratio compris entre 0.6 et 0.7, et ce, quelle que soit l'espèce considérée. La Neuréguline est un signal important pour la régulation de l'épaisseur de la gaine de myéline. Des souris mutantes pour le gène *ErbB2* possèdent une gaine de myéline, mais elle est plus fine que la normale (36). De plus, les souris hétérozygotes Neuréguline  $1^{+/-}$  possèdent également une gaine de myéline dont l'épaisseur est réduite (60) et la



surexpression de l'isoforme III de la Neuréguline 1 induit une augmentation de l'épaisseur de la gaine de myéline. La longueur des segments internodaux n'est en revanche pas affectée dans les différents mutants évoqués, et elle serait donc établie indépendamment de la voie Neuréguline-ErbB.

D'autres signaux semblent également impliqués dans la régulation de l'épaisseur de la gaine de myéline. C'est notamment le cas du BDNF et du récepteur p75, qui semblent jouer un rôle régulateur dans les épisodes tardifs de la myélinisation (61). La surexpression du BDNF par transgénèse induit une croissance à la fois du diamètre de l'axone et de l'épaisseur de la gaine de myéline (62). Par ailleurs, les mutants nuls pour la Périaxine possèdent un g-ratio inférieur aux souris sauvages, montrant l'existence d'une hypermyélinisation, que l'on observe également après réparation suite à une lésion des axones. Cela suggère un rôle possible de la Périaxine dans la régulation de l'épaisseur de la gaine de myéline.

La myélinisation apparaît donc comme un phénomène complexe régulé par un grand nombre de facteurs. Au cours de ce processus, les molécules d'adhérence, les canaux ioniques et les protéines cytosquelettiques associées, précédemment réparties de manière uniforme le long de l'axone vont se redistribuer en régions distinctes, aboutissant à la formation des domaines décrits précédemment.

### c) Croissance des axones et segments myélinisés

Certains nerfs périphériques continuent leur croissance alors que la myélinisation a déjà commencé, posant la question du devenir des segments internodaux lorsque l'axone s'allonge. Dans le modèle murin présentant une

inactivation de la Périaxine, on observe une perte du complexe Périaxine-DRP2-dystroglycane décrit plus haut. Ceci entraîne une perturbation des bandes de Cajal, canaux cytoplasmiques formés dans la zone abaxonale, et la perte de capacité pour les CS à s'allonger au cours de l'élongation axonale, d'où la formation d'internoeuds plus courts (27). De plus, les microtubules paraissent désorganisés en l'absence des bandes de Cajal, et les ARNm normalement relocalisés dans les régions distales des CS (notamment ceux codant MBP) sont absents, suggérant une altération de la fonction biologique des microtubules. A ce stade, l'épaisseur de la gaine de myéline n'est cependant pas perturbée, suggérant l'existence d'une voie de régulation indépendante. Les bandes de Cajal jouent donc un rôle prédominant dans l'allongement des CS au cours de la croissance axonale et il est intéressant de noter que dans des nerfs de souris chimériques contenant approximativement 50% de cellules sauvages et 50% de cellules mutantes, ces dernières forment toujours des internoeuds plus courts, indiquant que la capacité à s'allonger est cellulaire autonome (31, 63).

## C) Rôle de *Krox20/Egr2* dans le processus de myélinisation

### 1) Structure et fonction de *Krox20*

*Krox20*, appelé *Egr2* (Early Growth Response 2) chez l'homme, code une protéine facteur de transcription à trois doigts de zinc, de 471 acides aminés. *Krox20* est exprimé dans de nombreux tissus (SNC au cours de la segmentation du tronc cérébral, CS dans le système nerveux périphérique, tissu osseux,...).

Il est un élément régulateur central de la myélinisation dans le système nerveux périphérique (64). En effet, une étude de l'expression du gène *Krox20* a été réalisée grâce à un système de gène rapporteur qui consiste en une insertion hétérozygote du gène de la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* dans la séquence codante de *Krox20*, et a montré que son expression était restreinte aux seules CS myélinisantes. La relation étroite entre myélinisation du SNP et l'expression de *Krox20* a conduit à étudier le rôle précis de *Krox20*. Chez les souris déficientes pour *Krox20*, l'étude de l'expression de plusieurs gènes de myéline a été étudiée. Les protéines dites tardives de myéline telles P0 et MBP voient leur expression très fortement diminuée dès le niveau transcriptionnel, contrairement à MAG, dont l'expression n'est pas modifiée de façon significative. On assiste, au niveau ultrastructural à une augmentation du nombre de CS. De plus, l'absence de *Krox20* n'altère pas l'initiation de la myélinisation, mais affecte la spiralisation et la compaction aboutissant à la formation de la gaine, d'où un blocage au stade promyélinisant. *Krox20* apparaît alors comme un gène jouant un rôle central dans la myélinisation en

activant un certain nombre de gènes permettant la différenciation terminale en CS myélinisantes, ainsi qu'en inhibant leur prolifération.

Des gènes cibles de Krox20 ont été identifiés:

- Par des études comparatives de transcriptome de CS cultivées en l'absence de neurones, et infectées alternativement par un virus exprimant *Krox20* et un gène témoin. Les résultats obtenus sur puces, confirmés par RT-PCR quantitative indiquaient que les gènes codant P0, PMP22, MBP, la Périaxine, la Connexine 32, et MAG sont des gènes cibles de Krox20. Toutefois, le caractère direct de la relation entre Krox20 et ces cibles n'avait pas été démontré.

L'expression ectopique de *Krox20* dans des cultures de CS est ainsi suffisante pour induire l'expression de plusieurs gènes de myéline (65-66).

De plus de nombreux autres gènes intervenant dans le métabolisme lipidique sont aussi activés par Krox20, dont l'HMG-CoA réductase, enzyme limitant pour la synthèse du cholestérol.

- Par des études menées chez des souris possédant un allèle hypomorphe de *Krox20* à l'état homozygote, ayant l'avantage de survivre trois semaines après la naissance. Des études comparatives de transcriptome avec des souris saines ont révélé que l'expression des mêmes gènes de myéline décrits plus haut était dépendante de Krox20 (49, 65).

Pour certains gènes cibles de Krox20, tel celui codant la Périaxine, il a été montré que Krox20 servait seulement à amplifier une activation préalable et indépendante de sa propre action. Ainsi la Périaxine est déjà exprimée en période postnatale dans des nerfs de souris *Krox20<sup>-/-</sup>* ; la Périaxine est aussi détectée deux jours avant l'apparition de la protéine Krox20 au cours du développement normal de la souris ; enfin le cAMP qui est une molécule transductrice du contact axonal, peut induire l'expression importante de la Périaxine en l'absence d'une augmentation aussi franche de l'expression de *Krox20*. Ces résultats nous montrent que les signaux axonaux responsables de la myélinisation sont seulement partiellement transduits dans les CS par des voies dépendantes de *Krox20* (66).

Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont permis d'améliorer considérablement l'étude de la régulation des gènes cibles de *Krox20 in vivo*, (67) (68) et ont montré que ce dernier contrôlait directement leur transcription. En effet pour démontrer cette relation directe, il faut réussir à identifier des sites conservés de liaison à Krox20, prouver leur corrélation avec des séquences enhancers requises dans l'expression de ces gènes, et enfin montrer que ces sites de liaison sont occupés *in vivo* dans les CS au cours de la myélinisation des nerfs périphériques.

- C'est ainsi qu'a été révélé le rôle inducteur direct de Krox20 sur l'expression de *Mbp*, *Mpz*, *MAG*, *Gjb1*, et de plusieurs gènes du métabolisme lipidique dans les CS myélinisantes (67).
  - Dans le cas le plus simple, Krox20 active le gène *Gjb1* via sa fixation au promoteur P2.

- D'autres gènes de myéline sont activés via plusieurs sites de liaison à Krox20, fréquemment introniques (68). Ainsi *Mpz* possède deux sites majeurs de liaison à Krox20 au niveau du promoteur et du premier intron. L'association de plusieurs sites de liaisons pourrait faciliter la fixation de l'ARN polymérase II sur le promoteur. De plus le site de liaison intronique aurait peut-être pour effet d'isoler la régulation du gène *Mpz* de celle du gène *Sdhc* codant la succinate déshydrogénase C, situé seulement à 5kb en amont du promoteur de *Mpz* (69).
  
- Quant à *Mbp*, il a été montré que Krox20 induisait sa transcription en se fixant sur un enhancer spécifique aux CS, *MbpSCE1* situé à environ 9kb du site d'initiation de la transcription, et une séquence localisé dans le premier intron (67) (70).
  
- La ChIP a permis aussi de révéler une colocalisation entre Krox20 et Sox10, un facteur de transcription exprimé tout au long du développement des CS, sur la plupart des sites de liaisons. Cette colocalisation suggère une interaction directe entre ces deux facteurs (71), avec pour conséquence un effet synergique probable sur la plupart de leurs cibles.
  
- Il a été montré que Krox20 se fixe sur les promoteurs de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique ; d'autres études ont montré que les régulateurs majeurs des gènes du métabolisme lipidique, les

SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein), se fixent sur ces mêmes promoteurs, suggérant que les SREBPs et Krox20 interagiraient mutuellement à ce niveau. De plus une synergie entre Krox20 et SREBP a été objectivée par des expériences de cotransfection (72).

Si il active la maturation en CS myélinisantes, Krox20 réprime aussi de nombreux marqueurs associés aux ISC tels *Cyclin D1*, *Cd44*, ainsi que d'autres gènes couramment impliqués dans la prolifération cellulaire (*Ki67*, *Rad51*) et dans le maintien de l'état indifférencié (*Sox2*, *Fox D3*, *Id2*), ce qui illustre le caractère bivalent de ses fonctions (49).

Ainsi, Krox20 déclenche la sortie des CS du cycle cellulaire, condition nécessaire à leur différenciation terminale en cellules myélinisantes. Cette action est principalement médiée par l'inhibition du facteur promitotique c-Jun (47).

c-Jun est un facteur qui est activé par phosphorylation, transducteur à la fois d'agents mitogènes (surtout la Neuréguline 1) et de facteurs de mort cellulaire (TGF $\beta$ ). L'expression ectopique de *Krox20* dans des CS aboutit à une réduction de la phosphorylation de c-Jun par la c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase (JNK), associée à une diminution importante de la prolifération. De plus les effets antimitotiques liés à Krox20 sont retrouvés en inactivant c-Jun, suggérant que la grande majorité de l'effet antimitotique de Krox20 est médié par c-Jun. L'action de Krox20 passe par l'activation d'un facteur inhibiteur de JNK : JIP-1 (JNK-interacting protein-1).

Pour finir, il est très important de préciser que l'action de Krox20 ne se résume pas à l'initiation de la myélinisation mais aussi à sa maintenance toute la vie, ce qui nécessite son expression constante (73). Ainsi, l'inactivation conditionnelle de *Krox20* chez des souris adultes, après que le processus de myélinisation ait

abouti, déclenche une démyélinisation très rapide (<3 jours) avec invasion macrophagique. De plus, on assiste à une dédifférenciation des CS en ISC et un retour à la prolifération, suivi d'une tentative vaine de remyélinisation, avec blocage des CS au stade promyélinisant. La rapidité de la démyélinisation appuie de nouveau la thèse selon laquelle *Krox20*, en plus d'activer le programme de myélinisation, réprime aussi un programme de démyélinisation et de dédifférenciation des CS. La maintenance de la myélinisation par *Krox20* apparaît alors comme un processus très dynamique et réversible.

Une fonction supplémentaire de *Krox20* a été récemment découverte, et consiste à maintenir la frontière entre SNC et SNP, en empêchant, en l'occurrence, sa transgression par des cellules gliales centrales (oligodendrocytes et astrocytes) (74). En effet, l'inactivation de *Krox20* chez des souris, ainsi qu'un cas humain de Neuropathie Amyélinisante Congénitale (où *Krox20/Egr2* n'est pas exprimé dans les CS), aboutit à cette transgression. Cependant la seule absence de myélinisation, chez des souris porteuses de la mutation *Trembler* (mutation faux-sens dans la partie codante de *PMP22*) n'altère pas la ségrégation SNP/SNC. Ceci suggère que *Krox20* maintient cette ségrégation indépendamment, et donc en plus, de son action promyélinisante dans le SNP.



## **2) Des mutations ponctuelles de *Krox20* ont été identifiées dans des neuropathies humaines héréditaires**

Les neuropathies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) sont des neuropathies héréditaires relativement fréquentes avec une prévalence globale de 1/2500 dans la population générale. Ces neuropathies sont marquées par l'atteinte des axones et/ou de la gaine de myéline. Les CMT classiques sont associées à une faiblesse progressive des membres distaux et parfois proximaux. Elles sont caractérisées par une atrophie musculaire distale symétrique et une faiblesse des jambes s'étendant ensuite aux mains, les patients pouvant également développer progressivement une déformation des pieds de type pieds creux (plus rarement pieds plats). Cependant, si les symptômes apparaissent souvent durant l'enfance, la progression de la maladie est lente et seul un nombre restreint de patients perdent leur capacité à se déplacer de façon autonome. Les DSS et CHN correspondent à des syndromes de survenue plus précoce, durant l'enfance, et plus sévères, dont l'issue est parfois fatale, avec une initiation précoce durant la jeune enfance, associée à une faiblesse généralisée et un développement moteur altéré.

Les CMT classiques sont réparties:

- en formes démyélinisantes (CMT1):

La vitesse de conduction des nerfs est réduite de façon homogène (<38m/s contre environ 50m/s pour le sujet sain), et tous les nerfs sont atteints, suggérant une démyélinisation globale plutôt que focale. Au

cours de la progression des symptômes, la vitesse de conduction reste relativement inchangée, alors que les troubles moteurs s'aggravent, notamment en raison d'une perte axonale distale.

- en formes axonales (CMT2):

La vitesse de conduction est relativement préservée dans ce type de neuropathie.

- les CMT3 correspondant aux formes dé- ou dysmyélinisantes précoces (DSS et CHN):

Les DSS et CHN sont des formes très sévères de CMT. On distingue la forme hypertrophique DSS- correspondant à une augmentation de la taille des nerfs, avec la présence d'une accumulation concentrique de cytoplasme Schwannien dite « en bulbes d'oignons » autour des axones hypomyélinisés – de la forme de type CHN, sans « bulbes d'oignons ». La vitesse de conduction le long des nerfs est généralement très fortement altérée, allant de 1 à 10m/s. DSS et CHN diffèrent aussi sur le plan clinique: l'atteinte neurologique débute *in utero* dans les CHN, avec une hypotonie périnatale sévère, alors que les DSS se caractérisent par un intervalle libre avant le début des symptômes.

- les CMT4 correspondent à un groupe hétérogène de formes récessives de sévérité variable (75) (3).

Outre l'aspect dominant ou récessif et le caractère plus ou moins précoce de l'apparition des symptômes, les CMT sont classées en fonction de la vitesse de conduction des nerfs, de leur état de myélinisation et du locus associé à la maladie. Parmi les gènes dont les mutations sont associées aux CMT, on retrouve majoritairement des gènes impliqués dans la myélinisation comme *PMP22*, *Gjb1/Cx32*, *Mpz*, *Prx* ou *Krox20*.

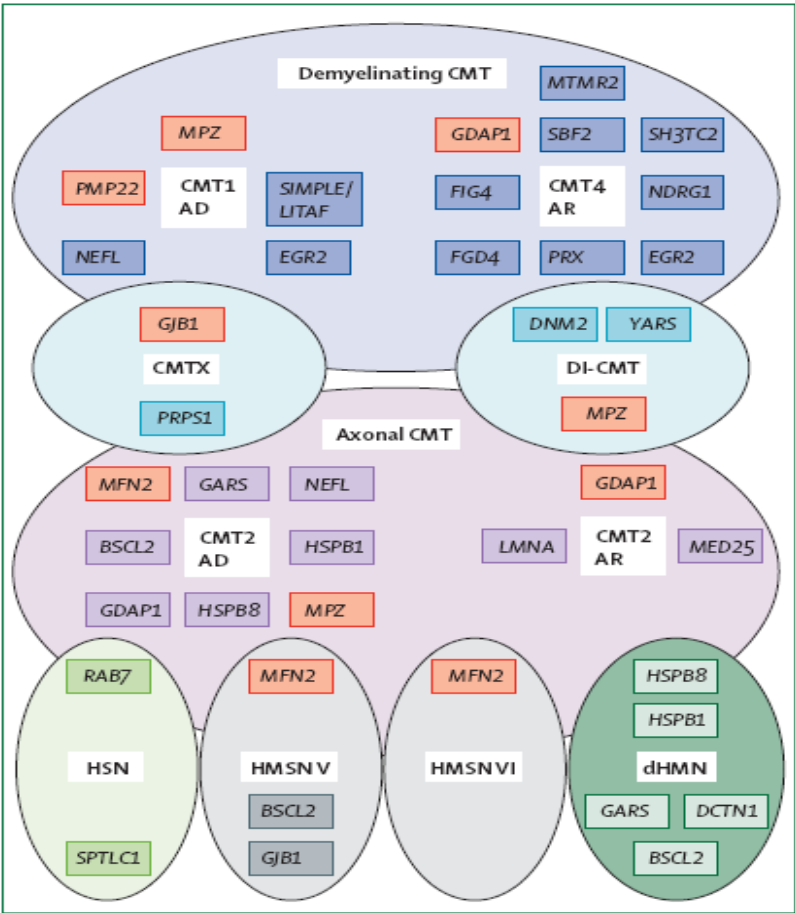


Figure 11: Classification des différentes formes de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth avec les différents gènes impliqués (d'après (76)).

Type	Gène impliqué	Locus
<b>Dominant</b>		
<b>Démyélinisant</b>		
CMT1A	<i>PMP22</i>	17p11
CMT1B	<i>MPZ</i>	1q22
CMT1C	<i>LITAF</i>	16p13
CMT1D	<i>EGR2</i>	10q21
CMT1E	<i>MPZ</i>	1q22
CMT1F	<i>NEFL</i>	8p21
<b>Axonal</b>		
CMT2A1	<i>KIF1B</i>	1p36
CMT2A2	<i>MFN2</i>	1p36
CMT2B	<i>RAB7</i>	3q13
CMT2C	<i>TRPV4</i>	12q23
CMT2D	<i>GARS</i>	7p15
CMT2E	<i>NEFL</i>	8p21
CMT2F	<i>HSPB1</i>	7q11
CMT2G	<i>non connu</i>	12q12
CMT2I/J	<i>MPZ</i>	1q22
<b>CMT2K</b>	<b><i>GDAP1</i></b>	<b>8q21</b>
CMT2L	<i>HSPB8</i>	12q24
CMT2M	<i>DNM2</i>	19p12
CMT2N	<i>AARS</i>	16q22
<b>Intermédiaire</b>		
DI-CMTA	<i>non connu</i>	10q24
DI-CMTB	<i>DNM2</i>	19p12
DI-CMTC	<i>YARS</i>	1p34
DI-CMTD	<i>MPZ</i>	1q22
<b>Récessif</b>		
<b>Démyélinisant</b>		
<b>CMT4A</b>	<b><i>GDAP1</i></b>	<b>8q21</b>
CMT4B1	<i>MTMR2</i>	11q23
CMT4B2	<i>SBF2</i>	11p15
CMT4C	<i>KIAA 1985/SH3TC2</i>	5q32
CMT4D	<i>NDRG1</i>	8q24
CMT4E	<i>EGR2</i>	10q21
CMT4F	<i>PRX</i>	19q13
CMT4G	<i>HK1</i>	10q23
CMT4H	<i>FGD4</i>	12q12
CMT4J	<i>FIG4</i>	6q21
<b>Axonal</b>		
AR-CMT2A	<i>LMNA</i>	1q21
AR-CMT2B	<i>MED25</i>	19q13
<b>AR-CMT2C</b>	<b><i>GDAP1</i></b>	<b>8q21</b>
Sans dénomination	<i>LRSAM1</i>	9q33
<b>Lié à l'X</b>		
CMTX1	<i>GJB1</i>	Xq13
CMTX2	<i>non connu</i>	Xp22
CMTX3	<i>non connu</i>	Xq26
CMTX4	<i>non connu</i>	Xq24
CMTX5	<i>PRPS1</i>	Xq22

Tableau 1: Classification des maladies de Charcot-Marie-Tooth par type et sous-types en fonction du mode de transmission de la maladie et des critères électrophysiologiques. Les gènes sont mentionnés avec la position de leur locus.

Les gènes les plus fréquemment atteints dans les CMT sont *PMP22*, *Mpz*, et *Gjb1*:

- Les altérations du gène *PMP22* correspondent à la cause majeure de ces maladies héréditaires, avec des modifications au niveau du locus de ce gène retrouvées dans 70% des cas (délétion, mutation, mais aussi duplication d'une copie du gène). Des souris et des rats transgéniques possédant des copies surnuméraires de *PMP22* placé sous le contrôle de son propre promoteur présentent des symptômes similaires à ceux observés chez les patients présentant une duplication du gène (77). Une surexpression très forte du gène dans des modèles de rongeurs induit de plus une perte quasi-totale de myéline périphérique.
- De nombreuses mutations du gène *Mpz* ont également été retrouvées chez l'homme et conduisent à des phénotypes de gravité variable. L'inactivation de *Mpz* dans des modèles murins induit une importante hypomyélinisation de leur système nerveux périphérique, tandis qu'une surexpression par transgénèse conduit à une démyélinisation.
- Des mutations altérant les régions codantes et non codantes de *Gjb1*, le gène codant la Connexine 32, ont par ailleurs été caractérisées chez des patients souffrant d'une forme de CMT, nommée CMT1X, fréquemment observées. Les modèles murins d'inactivation de *Gjb1* développent des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteints de CMT1X, avec une démyélinisation progressive du SNP.

Le fait que diverses mutations d'un même gène conduisent à des maladies de type différent ou que l'altération de 2 gènes différents conduise au même phénotype complexifie la classification des CMT, et les sous-classes principales sont plutôt basées sur des données cliniques (avec le mode de transmission), électrophysiologiques et histologiques.

L'importance du rôle de *Krox20/Egr2* dans le processus de myélinisation a été confirmé par l'identification chez l'homme, de plusieurs mutations, majoritairement dominantes chez des patients atteints de Neuropathies Hypomyélinisantes Congénitales (CHN), Syndrome de Dejerine-Sottas (DSS) et Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1)(78-80) (cf Tab. 2).

Mutation		Transmission	Phénotype
ADNc	Protéine		
c.1225C>T	R409W Substitution dans le troisième doigt de zinc (80)	AD	CMT1 familiale
c.1076G>A	R359Q Substitution dans l'hélice alpha du premier doigt de zinc (81)	AD	CMT1 typique d'allure progressive, avec scoliose et sans atteinte des nerfs crâniens
c.1142G>A	R381H Substitution dans le deuxième doigt de zinc (82)	AD	CMT1 familiale avec atteinte des nerfs crâniens (III, IV, V, VII, VIII, X, XI)
c.1141C>T	R381C Substitution dans le deuxième doigt de zinc (83)	AD	CMT1 familiale
c.1064A>T	D355V Substitution dans le premier doigt de zinc (78, 84)	AD	CMT mixte (démýélinisante et axonale)
c.1147C>A	D383Y Substitution dans l'hélice alpha du deuxième doigt de zinc (85)	AD	CMT1 sévère sporadique
c.[1146T>G + 1147G>T]	S382R et D383Y Substitution dans le deuxième doigt de zinc (80, 86)	AD	CHN sporadique
c.803T>A	I268N Substitution dans le domaine R1 (80)	AR	3 enfants atteints issus d'un mariage consanguin, présentant une CHN
c.1075C>T	R359W Substitution dans l'hélice alpha du premier doigt de zinc (24, 79)	AD	Patients présentant un syndrome de Dejerine-Sottas avec des complications respiratoires et une atteinte des nerfs crâniens

Tableau 2: Liste des mutations connues dans la séquence codante d'*Egr2* avec les phénotypes correspondants.

Parmi les mutations de *Krox20/Egr2* retrouvées chez des patients, certaines sont des mutations ponctuelles dominantes localisées dans un des trois domaines à doigt-de-zinc de la protéine inhibant la fixation de *Krox20/Egr2* à l'ADN.

- Les mutations D355V, R409W, R359Q, R381H, R381C sont associées à des pathologies de type CMT1. On peut noter que la mutation R381C donne un phénotype de CMT1 de survenue tardive, contrairement à la mutation R381H. Il s'agit d'un exemple de divergence phénotypique en rapport avec le codon 381 (83). Des résidus arginines sont fréquemment remplacés parmi les mutations situées dans les doigts de zinc. En effet, à leur niveau, l'arginine forme des liaisons hydrogène avec les bases G de la séquence consensus de liaison (87). Sa substitution aboutit donc à une perte de fonction.
- La double mutation S382R/D383Y sur le même allèle *Krox20* conduit à une neuropathie de type CHN.
- La mutation D355V diminue préférentiellement l'affinité d'Egr2 pour un élément situé dans le promoteur du gène *Gjb1*. La présentation clinique pourrait être la conséquence d'une dérégulation transcriptionnelle de la connexine 32.
- La forme R359W est associée à un syndrome de Dejerine-Sottas.
- Plusieurs mutations (notamment R381H et R359W) donnent des phénotypes avec atteinte des nerfs crâniens. Cela pourrait s'expliquer



par le rôle déterminant d'Egr2 dans la segmentation du rhombencéphale lors de l'embryogénèse.

Il est intéressant de noter que ces mutations induisant une perte de liaison de la protéine à l'ADN devraient correspondre à une perte de fonction, et donc plutôt présenter un caractère récessif, l'allèle normal restant pouvant au moins partiellement compenser cette perte de fonction. Cette hypothèse est de plus renforcée par le fait que les animaux *Krox20*<sup>+/-</sup> présentent une myélinisation normale du SNP. Le caractère dominant suggère donc la possibilité d'un rôle de dominant négatif pour ces protéines mutées, ou d'un éventuel gain de fonction. Une étude semble corroborer l'hypothèse d'un rôle dominant négatif de la protéine mutée S382R/D383Y (71). L'effet dominant négatif des mutations de *Krox20* situées sur le domaine de liaison à l'ADN, n'a pas pu être objectivé sur des plasmides transfectés contenant le promoteur de *Mpz* associé à un gène rapporteur. Par contre cet effet est observé sur le niveau d'expression endogène des gènes cibles de *Krox20*. Cela veut dire que l'effet dominant négatif de ces mutations s'exerce sur un autre facteur que la demi-dose sauvage de *Krox20*, au niveau d'éléments de réponse à *Krox20* situés à l'extérieur du promoteur de *Mpz* (65). En effet le premier intron de *Mpz* est porteur de sites de liaison à *Krox20* et *Sox10*, quasiment adjacents. La mutation SR/DY de *Krox20* diminue l'activation de cet élément de réponse intronique en diminuant la liaison de *Sox10* sur son site sans affecter la fixation de *Krox20* lui-même. Ainsi l'effet dominant négatif s'exerce sur *Sox10* en diminuant sa fixation *Krox20*-dépendante sur certains éléments de réponse. Il s'agit d'un mécanisme inhabituel expliquant l'effet dominant négatif. En effet, l'effet

dominant négatif d'une mutation concerne surtout des protéines qui forment des homodimères, où la forme mutée inactive sa contrepartie non mutée.

La seule mutation hors du domaine de liaison à l'ADN touche le domaine R1, et plus particulièrement l'isoleucine 268 (80). Cette isoleucine est nécessaire à l'interaction des facteurs *Krox20* avec les protéines Nabs. Les protéines Nabs (*Nab1* et *Nab2*) sont des protéines pour lesquelles il a d'abord été décrit un rôle antagoniste de l'effet de *Krox20* sur la transcription de ses gènes cibles, dans des cultures cellulaires (88). Puis un rôle agoniste a été corroboré par la double mutation de *Nab1* et *Nab2* chez la souris, qui aboutit à une hypomyélinisation sévère du SNP (49). De plus la mutation I268N de *Krox20* aboutit à des effets similaires sur la myélinisation à ceux de la double mutation *Nab1* et *Nab2*. Cela suggère donc que dans les CS, le rôle promyélinisant des Nabs est en grande partie médié par son interaction avec *Krox20*. L'étude de l'abolition de l'interaction *Krox20/Nab* par la mutation I268N sur modèle murin montre une diminution de l'effet propre de *Krox20* sur la plupart des gènes cibles (89).

L'expression d'une minorité de gènes cibles de *Krox20* n'est pas affectée par la dissociation *Krox20/Nab*. La composition de la gaine de myéline ainsi produite serait altérée par la surexpression relative des protéines codées par ces gènes. Ceci pourrait expliquer son caractère instable et donc l'évolution biphasique de la neuropathie, où l'hypomyélinisation est suivie d'une étape de démyélinisation.

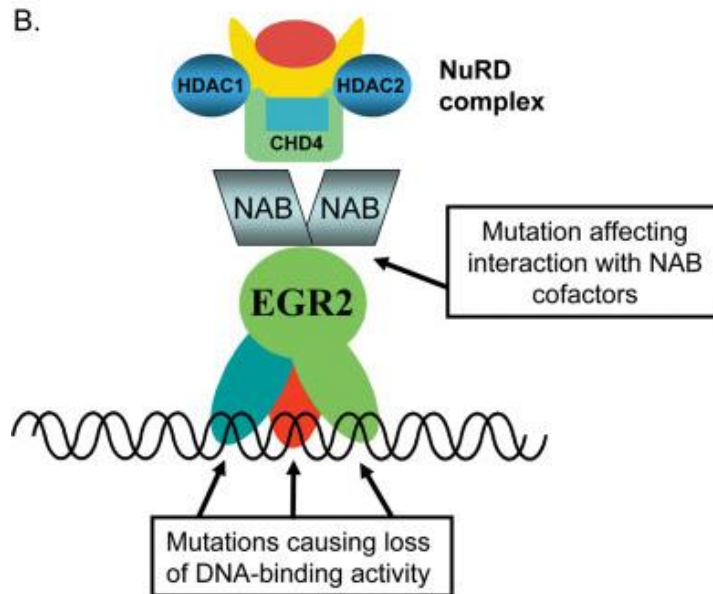


Figure 12: Représentation schématique des différentes mutations de *Krox20* associées à des neuropathies humaines héréditaires (d'après (90)).

### 3) Régulation de l'expression de *Krox20*

#### a) Profil d'expression de *Krox20*

La régulation de l'expression du gène *Krox20* chez la souris a été explorée par étude de gène rapporteur (KI hétérozygote où la séquence *LacZ* d'*E.coli* a été insérée dans le deuxième exon de *Krox20*). Celle-ci a montré le long des nerfs périphériques une transition à E15,5 correspondant au début d'activation du locus *Krox20* (64) (91). Cette activation se poursuit ensuite après la naissance et est maintenue tout au long de la vie.

L'expression de *Krox20* est totalement dépendante du contact axonal lors de la myélinisation comme l'attestent des expériences de cocultures entre CS et neurones (91). En effet, l'expression de *Krox20* n'est observée *in vitro* dans des cocultures de neurones et de CS, qu'en présence d'un contact axonal.

L'expression de *Krox20*, en outre, n'est plus observée dans un système de coculture Millicell, où neurones et CS n'établissent pas de contact direct. Ainsi est mise en lumière la dépendance de l'induction de *Krox20* pour un signal axonal qui est lié à la membrane et/ou très instable et/ou faiblement diffusible. Si *Krox20* n'est activé *in vivo* qu'à partir de E15.5 le long des nerfs périphériques, la coculture de CS avec des neurones issus d'embryon de souris E12.5 induit aussi son expression. Ceci prouve que la signalisation axonale inductrice de l'expression de *Krox20* est déjà présente avant E15.5, et que les CS acquièrent la capacité d'y répondre au moment de la transition PCS/ISC qui survient le même jour. Enfin, des expériences de dégénérescence Wallerienne par cryolésion de nerfs sciatiques de souris adultes ont montré que le maintien de l'expression de *Krox20*, tout comme son initiation, dépend aussi du contact axonal (92).

#### b) Séquences cis-régulatrices de *Krox20* dans les cellules de Schwann

La recherche de séquences cis-régulatrices de *Krox20* a abouti à la découverte de deux séquences « enhancers » qui jouent un rôle majeur dans l'expression de *Krox20* dans les CS (92). Des souris transgéniques comportant le transgène *Krox20<sup>LacZ</sup>* associé séparément aux régions juxtagéniques situées en 5' ou en 3' ont été étudiées. L'étude de l'expression de *Krox20<sup>LacZ</sup>* a révélé que les régions juxtagéniques en 5' et en 3' portent deux éléments régulateurs indépendants, qui interviennent successivement au cours de deux phases distinctes du développement des CS:

- L'enhancer ISE (Immature Schwann cell Element), situé en 5' du gène, actif pendant le stade immature

- L'enhancer MSE (Myelinating Schwann cell Element), situé en 3', actif seulement dans les CS engagées dans la myélinisation, et myélinisantes (cf Fig. 13).

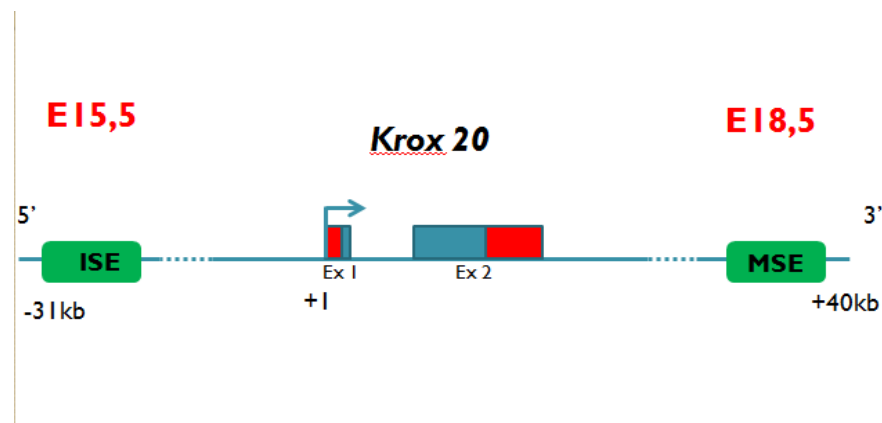


Figure 13: Illustration schématique du gène *Krox20* et des deux enhancers actifs connus dans les cellules de Schwann, ISE et MSE. Les deux rectangles correspondent aux exons. Les zones rouges correspondent aux régions non traduites, les rectangles bleus aux séquences codantes.

Seule la séquence de MSE a été caractérisée: il s'agit d'un segment conservé de 1,3kb situé à environ 35kb en aval de la séquence codante du gène *Krox20*. La cartographie a été effectuée en étudiant l'expression d'un gène rapporteur dépendant de fragments de restriction chevauchants issus de la région porteuse de MSE.

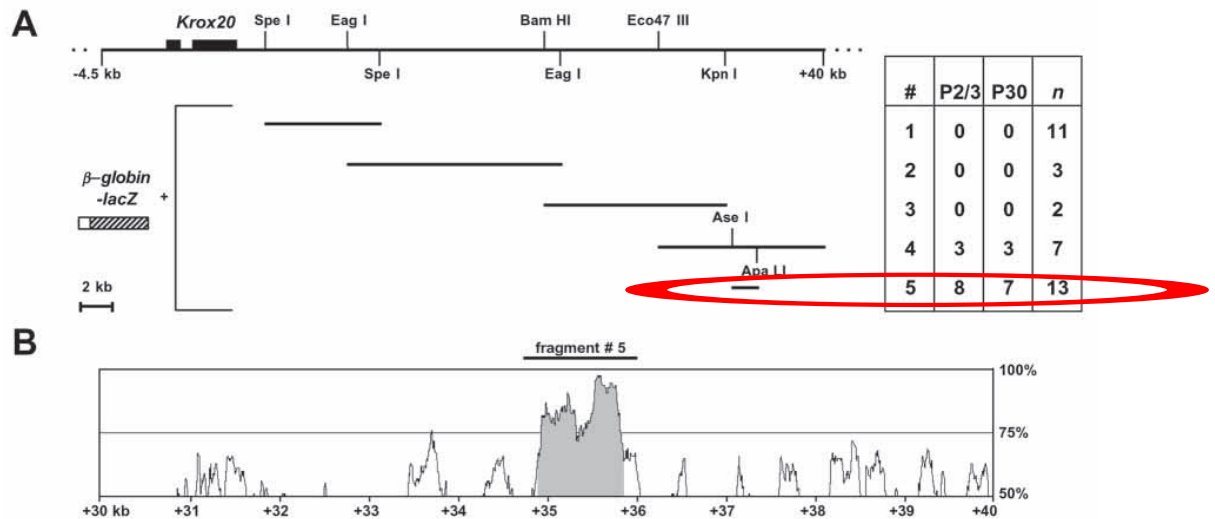


Figure 14: Isolement de MSE dans un élément conservé de 1,3kb. A: Gène *Krox20* humain et séquences extragéniques s'étendant de -4,5kb à +40kb (en haut). Les enzymes de restriction utilisées pour générer les fragments chevauchants sont montrées. Ces fragments ont été fusionnés avec une construction associant le promoteur de la  $\beta$ -globine et le gène rapporteur *LacZ* et testés en transgénèse (en bas). Le nombre de souris qui montrent une activité  $\beta$ -galactosidase dans des biopsies de nerfs sciatiques à P2/3 et P30 et le nombre total de souris (n) sont indiqués. B: Etude d'homologie entre le fragment murin 5 et les séquences humaines correspondantes. L'axe vertical indique le pourcentage d'homologie (d'après (92)).

MSE renferme deux domaines très conservés entre l'homme et la souris: un domaine A de 478pb (84% d'homologie) et un domaine B de 436pb (90% d'homologie) qui pourraient porter des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription.

Le switch ISE /MSE qui se produit peu avant la naissance, correspond au début de la myélinisation et renforce l'hypothèse d'un rôle spécifique de MSE dans la myélinisation, celui d'ISE n'étant à ce jour pas connu.

### c) Facteurs de transcription régulant l'expression du gène *Krox20*

L'expression de *Krox20* est gouvernée par plusieurs facteurs de transcription.

Il a été montré que Oct6 et Sox10 coopèrent pour se fixer et activer la transcription de *Krox20* à partir de MSE (92).

- Oct6/SCIP appartient à la famille des protéines à domaine POU de classe III dont l'expression, transitoire, présente un pic au stade promyélinisant (48, 93).
  - L'inactivation d'*Oct6* chez la souris, tout comme l'inactivation de *Krox20*, aboutit à un blocage des CS au stade promyélinisant (94). Cependant le blocage des CS n'est que temporaire, confirmant le fait que d'autres facteurs prennent le relais sur *Oct6*, encore inconnus à ce jour. *Oct6* coopère avec un autre facteur POU: *Brn2*. D'ailleurs chez les doubles mutants pour *Oct6* et *Brn2*, le phénotype est aggravé par rapport aux mutants *Oct6* (48). Le mécanisme de l'extinction d'*Oct6* est encore inconnu, cependant il est probable que *Krox20* joue ce rôle (95). Dans le même sens, le promoteur d'*Oct6* contient plusieurs sites de liaison pour *Krox20*. Enfin l'extinction d'*Oct6* est cruciale: en effet son expression prolongée dans les CS entraîne une hypomyélinisation ainsi qu'une perte axonale (96).
  - L'activation d'*Oct6* dépend du contact axonal et met en jeu plusieurs voies de signalisation impliquant des récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G (qui lorsqu'ils sont activés, induisent une augmentation du taux d'AMP cyclique intracellulaire) (97) (98), la Neuréguline 1 type III (40), ainsi que *Sox10* (99).

- Oct6 est un acteur essentiel de l'activation de *Krox20* en se fixant sur MSE. En effet l'inactivation d'*Oct6* chez la souris permet le maintien de la transcription de *Krox20* à la naissance (période au cours de laquelle les deux enhanceurs ISE et MSE sont actifs), alors qu'un transgène *Krox20* sous la seule dépendance de MSE ne produit aucun ARN messager (92). Plusieurs sites consensus de liaison à Oct6 ont été mis en évidence au sein des 2 domaines conservés de MSE. La fixation d'Oct6 sur 4 domaines renfermant des sites potentiels, a été démontrée *in vitro* par des expériences d'empreinte à la DNase I et par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) (100). Ces résultats ont été confirmés par étude de cotransfection d'un vecteur d'expression d'*Oct6* avec une construction transgénique associant un gène rapporteur *Krox20<sup>LacZ</sup>* associé à des formes mutées de MSE au niveau des domaines décrits.
- Sox10 appartient à la famille des High Mobility Group Proteins (HMG), et contrôle aussi l'expression de *Krox20* comme le suggère la présence d'une démyélinisation des nerfs périphériques dans le syndrome de Waardenburg-Hirschprung où le gène *Sox10* est muté (101).
  - Plusieurs sites consensus de liaison aux facteurs Sox, ont, tout comme pour Oct6, été caractérisés au niveau de MSE.
  - Enfin des études de cotransfection de vecteurs d'expression de Sox10 et Oct6 avec une construction associant MSE et un gène rapporteur ont montré un effet synergique entre Sox10 et Oct6 pour activer MSE



(100). Le mécanisme de cette synergie a été récemment exploré. Il semble qu'elle ne soit pas due à un phénomène coopératif de la fixation des deux facteurs sur MSE malgré la proximité de leurs sites de liaison. En revanche elle dépend d'un domaine de Sox10 nommé K2. Ce domaine pourrait interagir directement avec Oct6 ou bien avec un partenaire commun à ce dernier (102).

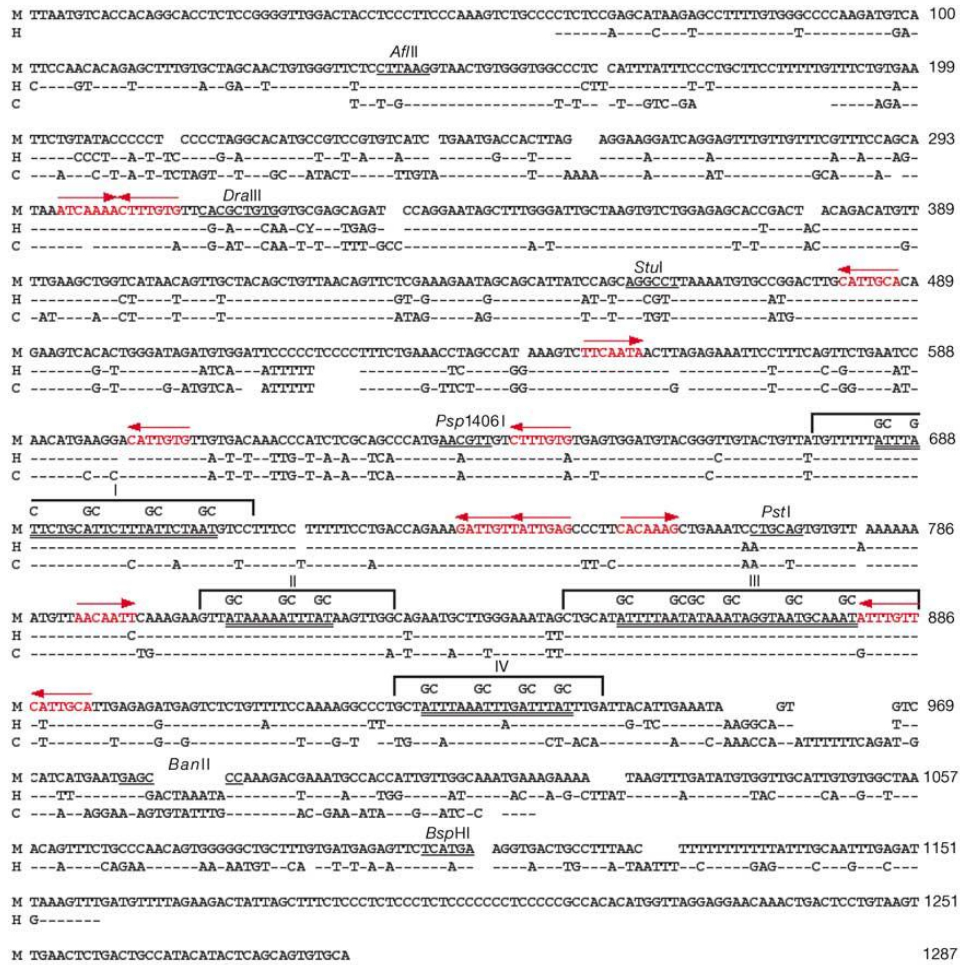


Figure 15: L'alignement des séquences humaines et de poulet à la séquence murine de MSE montre plusieurs sites conservés de liaison à des facteurs de transcription. La numérotation des nucléotides correspond à la séquence murine. Les tirets désignent les bases conservées. Les empreintes à la DNase I générées par Oct6 sont indiquées (I-IV). Dans ces régions, les sites conservés de liaison aux facteurs Oct6 et Brn2 sont soulignés deux fois. Les sites conservés de liaison à Sox10 sont représentés en rouge avec des flèches. Ces sites sont basés sur les sites connus de liaison à Sox9 (d'après (100)).

- Les facteurs NFATc: des études d'inactivation du gène codant la calcineurine B1, *CnB1*, un effecteur de la voie Neuréguline 1/ErbB3/ErbB2, ont montré son implication dans le développement et la myélinisation des CS (103). Les facteurs de transcription NFATc étant activés par *Cnb1*, leur étude a montré qu'ils induisent l'expression de *Krox20*, en activant MSE, de manière synergique avec Sox10. Enfin, la présence de sites consensus au sein de MSE prône un rôle inducteur direct par NFATc.

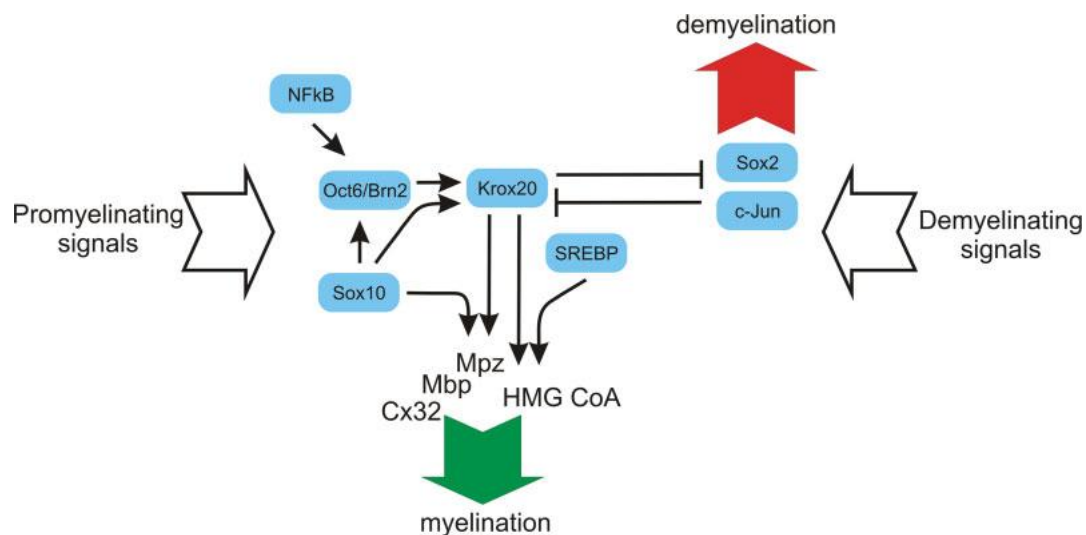


Figure 16: Représentation schématique du réseau de régulation des gènes de myéline. Il décrit la position centrale de Krox20 entre les signaux promyélinisants et démyélinisants (d'après (90)).

#### d) Importance de MSE dans l'expression de *Krox20*

Le seul cas humain de délétion homozygote de l'enhancer MSE présentait une neuropathie amyélinisante congénitale. Il s'agissait d'un nouveau-né d'origine Marocaine issu d'une union consanguine dans laquelle ses deux parents, sains, présentent la même délétion mais à l'état hétérozygote. Le séquençage de la région codante de *Krox20/Egr2* n'a révélé aucune mutation. Cependant le

phénotype était similaire à celui d'une déficience pour *Krox20* chez la souris. Le patient est décédé à l'âge de 7 mois dans un contexte d'hypotonie généralisée avec atteinte respiratoire sévère. La biopsie nerveuse a révélé une absence complète de myélinisation, une absence de détection de la protéine Egr2 dans le noyau des CS par immunohistochimie. De plus les racines nerveuses étaient myélinisées par des cellules gliales centrales, témoignant d'une transgression de la frontière séparant SNC et SNP, autre stigmate du déficit en Egr2 (Funalot et al, soumis). En outre, cette délétion n'est pas répertoriée dans le Database Genomic Variant (DGV), et n'a pas non plus été retrouvée chez 170 contrôles, ce qui renforce la corrélation génotype-phénotype entre la délétion de MSE et l'atteinte neurologique.

Cette observation souligne l'importance de MSE dans l'expression du gène *Egr2* lors de la myélinisation par les CS.

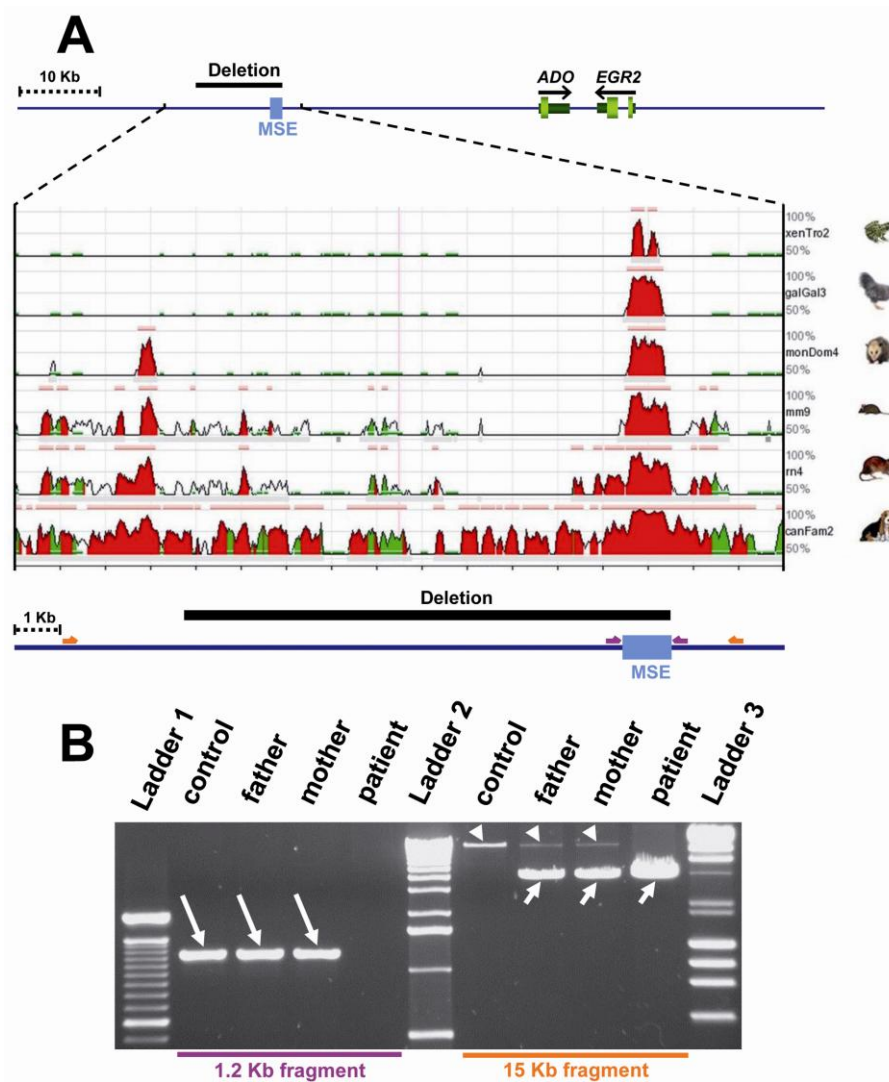


Figure 17: Cartographie de la délétion de 11kb, emportant la totalité de MSE, observée chez le patient index à l'état homozygote, et chez ses deux parents à l'état hétérozygote. Le pourcentage d'homologie de la séquence délétée avec d'autres espèces est représenté par le graphique en ordonnée (A). L'étude des produits de PCR sur gel d'agarose avec les amorces représentées en violet (fragment de 1218pb) ne montre aucune bande chez le patient index, indiquant que la totalité de MSE est délété chez lui (gauche). La PCR avec les amorces représentées en orange (fragment de 15kb) montre la présence d'un unique fragment de jonction de 4.3kb chez le patient index, alors que ses parents ont aussi l'allèle sauvage de 15kb (droite) (B).

## **II) PROBLEMATIQUE**

Les études menées sur *Krox20/Egr2* montrent qu'il est un élément régulateur central de la myélinisation du SNP.

Chez le patient index décédé de la neuropathie amyélinisante congénitale, la délétion homozygote de MSE est associée à l'absence de la protéine Egr2 dans les CS mais les ARNm *Egr2* n'ont pas pu être quantifiés. Le phénotype pathologique peut donc s'expliquer de 2 façons:

- La délétion de MSE empêche toute transcription des ARNm *Egr2* après la naissance.
- La délétion de MSE réactive l'autre enhancer, ISE qui gouvernerait la transcription d'un ARNm *Egr2* soumis à une régulation post-transcriptionnelle négative. ISE serait réactivé (de manière similaire à ce qui est observé dans les expériences de dégénérescence Wallerienne chez la souris (92)).

La mise en évidence d'une régulation post-transcriptionnelle de *Krox20* compatible avec l'activation d'ISE et MSE rendrait plausible la deuxième hypothèse physiopathologique.

- La première partie de mon travail, réalisée à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), vise à établir chez la souris l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle du gène *Krox20*, que l'on pourrait mettre en relation avec l'activation d'ISE et MSE. En effet l'extrapolation chez l'homme d'un résultat positif, nous permettrait

d'expliquer en partie le mécanisme du déficit en Egr2 chez le patient décédé.

Comme décrit précédemment, la transcription du locus *Krox20* suivie grâce au gène rapporteur *LacZ*, est observée à partir de E15,5 le long des nerfs périphériques chez la souris (91).

Or la protéine Krox20 n'est détectée qu'à partir du jour de la naissance (66), par immunohistochimie, au moment où débute la myélinisation.

Il y a donc, pour *Krox20*, une contradiction entre les moments où le transcrit et la protéine sont censés apparaître (cf Fig. 18).

Ainsi, dans les CS, la protéine Krox20 serait produite brutalement autour de la naissance, après un retard de 4 jours sur la transcription, retard qui ne peut pas être imputable à la vitesse de traduction des ARNm *Krox20*.

Par ailleurs, une quantification des ARNm *Krox20* a montré que leur niveau augmentait faiblement autour de la naissance (104). L'augmentation, franche, du niveau des protéines Krox20 ne serait donc pas proportionnelle à celle, graduelle, des ARNm *Krox20*.

*Krox20* ferait donc l'objet d'une régulation post-transcriptionnelle, négative de E15,5 jusqu'à la naissance (c'est-à-dire pendant 4 jours), où celle-ci serait abolie. La deuxième partie de cette supposée régulation coïnciderait avec le recrutement de MSE, et y laisserait entrevoir un rôle de ce dernier.

Afin d'étudier en détail ce processus putatif de régulation post-transcriptionnel, il a été nécessaire d'affiner et de quantifier précisément les niveaux d'ARN et de protéine Krox20 produits avant et après la naissance.

En effet, la sensibilité de l'immunohistochimie n'est pas optimale, ce qui ne permet pas d'exclure la présence de la protéine Krox20 avant la naissance. De



plus l'analyse quantitative des ARNm *Krox20* réalisée par Blugeon et al n'a pas été réalisée sur des temps assez rapprochés autour de la naissance.

- J'ai ainsi effectué dans un premier temps sur des nerfs de souris, à E18,5 et P1, une quantification relative des ARNm *Krox20* par qPCR, et de la protéine *Krox20* par Western Blot (technique très sensible, et quantitative) afin d'analyser s'il existe une discordance entre leurs cinétiques d'évolution, qui prouverait de fait l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle. E18,5 et P1 délimitent un laps de temps assez court (24-48 heures) au sein de cette période charnière de l'expression de *Krox20*, leur exploration augmente donc la résolution de l'analyse.
- Dans un deuxième temps, j'ai recherché s'il existe différentes formes d'ARNm *Krox20* aux stades embryonnaire et post-natal, afin d'explorer le mécanisme de cette régulation supposée. La mise en évidence de 2 ARN différant par la position du site d'initiation de transcription révélerait un système de promoteur alternatif, en accord avec un rôle de MSE dans cette régulation.

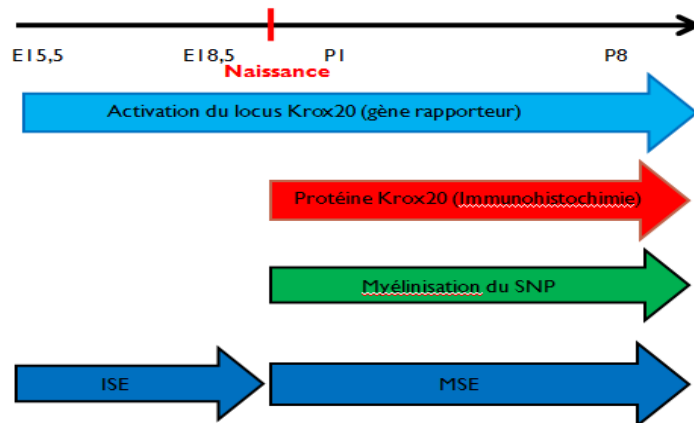


Figure 18: Illustration schématique du décalage observé entre l'activation du locus *Krox20* et la détection de la protéine *Krox20* par immunohistochimie. Vision synoptique et comparée de l'activation du locus *Krox20*, la détection de sa protéine par IHC, la myélinisation du SNP, et l'activation des deux enhancers ISE et MSE au cours du temps.

- La deuxième partie de mon travail s'attache, au vu de l'importance de MSE, à évaluer le rendement diagnostique de son exploration chez des patients présentant des formes de neuropathies de CMT compatibles avec une déficience pour *Egr2*, et pour lesquels une mutation dans sa séquence codante n'a pas été trouvée. Pour cela nous avons sélectionné et étudié des ADN génomiques de 76 patients conservés dans le Centre National de Référence des Neuropathies Périphériques Rares au CHU Dupuytren de Limoges.
  - L'étude de MSE chez ces patients a été effectuée par séquençage et par semi-quantification après migration sur gel de séquenceur capillaire. La mise en évidence d'éventuelles anomalies génétiques chez ces patients pourrait permettre d'établir un conseil génétique dans leur famille afin de dépister les porteurs sains hétérozygotes et prévenir la récurrence de cette neuropathie lors de grossesses ultérieures.

### **III) MATERIELS ET METHODES**

## **A) Prélèvement des nerfs sciatiques de souris**

Les souris ont été fournies par l'animalerie de l'IBENS. Elles ont été sacrifiées par élongation cervicale, ou par décapitation à E18,5. Trois incisions cutanées ont été réalisées sur la partie dorsale: une le long du rachis et 2 autres le long de chaque patte postérieure. Les nerfs sciatiques ont été repérés après écartement des masses musculaires, puis sectionnés au niveau des racines ainsi qu'en distalité. Ils ont ensuite été groupés par paires dans des tubes Eppendorf séparés.

Les nerfs servant à extraire des protéines ont été immédiatement congelés à 80°C dans de l'azote liquide ; ceux servant à extraire les ARN ont été conservés à +4°C dans 800µl de tampon RNA Later pour 3 paires.

## **B) RT-PCR des ARNm *Krox20***

### **1) Extraction des ARN**

L'extraction des ARN totaux a été réalisée avec 2 kits différents en fonction du type de l'échantillon. Les ARN totaux des nerfs sciatiques embryonnaires et post-nataux jusqu'à P8 (exclu) ont été extraits avec le kit RNAqueous-Micro (Ambion), tandis que les ARN totaux des nerfs sciatiques à partir de P9 ont été extraits avec le kit RNeasy Fibrous Tissues (Qiagen).

Deux à trois paires de nerfs par tube ont été broyées par des billes de Tungstène stériles dans 100µl de solution de lyse et 50µl d'éthanol à 95%, sous agitation

dans un homogénéisateur (Qiagen) pendant 45 à 90 secondes, à 30 pulsations par secondes.

Ces kits incluent une étape de traitement à la protéinase K. Dans les deux cas, les ARN totaux sont retenus sur une colonne échangeuse d'ions, puis des lavages successifs permettent d'éliminer l'ADN génomique et les protéines. Les ARN totaux sont ensuite été récupérés dans 20µl de tampon d'élution.

Chaque extraction est suivie d'un traitement à la DNase I à 37°C afin d'éliminer les éventuelles traces d'ADN génomique dont la présence entraînerait une surestimation de la quantité d'ADNc.

Toutes les étapes ont été réalisées en suivant les instructions du fournisseur.

Les concentrations des ARN extraits ont été mesurées par le Nanodrop, leur qualité a été vérifiée sur le Bioanalyseur 2100 (AgilentTechnology) (cf Tab. 3).

Echantillon	Kit d'extraction	Nanodrop			Bioanalyseur 2100 (Agilent)	
		Concentration (ng/µl)	DO 260/280	DO 260/230	rRNA ratio (28S/18S)	RNA Integrity Number (RIN) ( /10)
<b>E18,5</b>	Ambion	52,21	1,8	0,94	1,9	10
<b>P1</b>	Ambion	189,04	1,88	0,57	1,4	9,6
<b>P9</b>	Qiagen	164	1,86	1,88	1,3	8

Tableau 3: Dosage et contrôle de la qualité des ARN extraits de nerfs sciatiques de souris, à E18,5, P1, et P9.

## 2) Rétrotranscription

La rétrotranscription a été réalisée avec le kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) dans un volume réactionnel de 40µl.

Une quantité initiale de 400 à 500ng d'ARN est utilisée. Les ARN subissent dans un premier temps une dénaturation thermique à 65°C afin de supprimer les structures secondaires.

Des oligo-dT de 20 nucléotides, utilisés à une concentration finale de 2,5µM, sélectionnent la queue poly-A des ARN messagers, et des oligonucléotides dégénérés favorisent la synthèse de longs brins d'ADNc en réduisant le risque d'interruption de la réaction de polymérisation.

La rétrotranscription proprement dite est effectuée par la Superscript III Reverse Transcriptase (400UI) avec son tampon, pendant 1 heure à 50°C. Il s'agit d'une version recombinante et thermostable de la rétrotranscriptase codée par le gène *pol* du virus M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus).

Après inactivation de la rétrotranscriptase à 70°C pendant 15 min, les brins complémentaires d'ARN ont été dégradés par la RNase H d'*E.coli* (4UI) pendant 20 min à 37°C (cf Tab. 4).

Toutes les étapes ont été réalisées en accord avec les instructions du fournisseur.

Les ADNc obtenus ont été dosés par le Nanodrop et conservés à -20°C.

	Volume (en µl)		
500ng d'ARN	9,6		
Oligo (dT) 50µM	2	65°C 5min	
dNTP 10mM	2	4°C 5min	
Random Primer	1		25°C 5min
Eau	13,4		50°C 1h
	<hr/>		70°C 15min
	28		
			Traitement par 0,8µl de RNaseH
			(5UI/µl)
			37°C 20min
First-Strand Buffer 5X	8		
DTT 0,1M	2		
Superscript III RT (200UI/µl)	2		
	<hr/>		
	40		

Tableau 4: Protocole de rétrotranscription des ARNm avec le kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen).

### 3) PCR semi-quantitative des ADNc *Krox20*

Une PCR semi-quantitative en temps réel des ADNc *Krox20* a été réalisée avec le kit Quanti Tect SYBR-Green PCR (Qiagen). Les stades E18,5, P1 et P9 ont été explorés. Les ADNc ont été étudiés au sein d'une gamme de dilutions (1/5, 1/10 et 1/20).

Les amorces utilisées amplifient un fragment de 183pb à cheval sur la fin de la séquence codante et la région 3'UTR de l'ARNm *Krox20* (cf Fig. 19), et ont une Tm de 60°C.

L'expression relative de *Krox20* a été mesurée par PCR en temps réel sur l'automate Lightcycler (Roche) et normalisée avec la  $\beta$ -tubuline et la GAPDH.

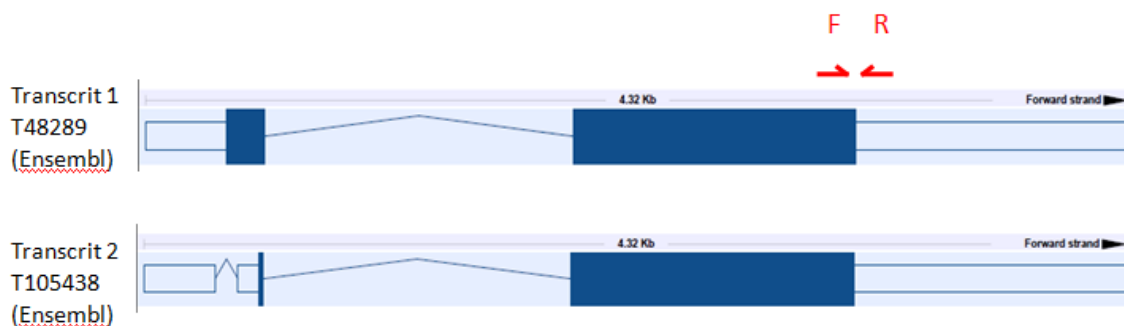
Toutes les réactions de PCR ont été réalisées en tubes séparés dans un volume réactionnel de 20 $\mu$ l.

	Volume (en $\mu$ l)		
Tampon Master Mix 2X	10	95°C	15min
Amorce F (250ng/ $\mu$ l)	1,5	94°C	15s
Amorce R (250ng/ $\mu$ l)	1,5	60°C	20s
Eau	4	72°C	20s
ADNc	3	65°C	15s
	20	40°C	30s

X40

Tableau 5: Protocole de qPCR des ADNc *Krox20*.





F: 5'-GCAGAAGGAACGGAAGAGC-3'  
 R: 5'-ACTGGTGTGTCAGCCAGAGC-3'

Figure 19: Cartographie des amorces utilisées pour la quantification des ARNm *Krox20*.

Le transcrit 1 (T48289, Ensembl) a une longueur de 2965pb.

Le transcrit 2 (T105438, Ensembl) a une longueur de 2864pb.

Les rectangles colorés en bleu correspondent aux séquences codantes ; les rectangles vides correspondent aux séquences non traduites ; les lignes en trait plein représentent les introns épissés.

#### 4) Analyse qualitative des ARNm *Krox20*

Deux variants d'épissage de l'ARNm *Krox20* ont été caractérisés in vitro (cf Fig. 19) après stimulation par du serum humain de cellules qui ont été transfectées par un plasmide contenant le gène *Krox20*. Ils sont répertoriés dans des bases de données bioinformatiques (Ensembl). Seul le transcrit 1 (le plus long) a été identifié in vivo dans le rhombencéphale de souris. Ces deux transcrits diffèrent par l'épissage d'une séquence de 101pb située dans la région 5'.

Afin de pouvoir identifier et distinguer ces deux transcrits dans les CS, j'ai utilisé des couples d'amorces situées de part et d'autre de la séquence épissée spécifiquement dans le transcrit 2 (cf Fig. 20).

Le couple d'amorces 1F/1R amplifie un fragment dont la taille attendue est de 1885pb pour le transcrit 1, et de 1784pb pour le transcrit 2. Le couple 1F/6R amplifie un fragment de 1062pb dans le transcrit 1, de 961pb dans le transcrit

2. Ces amorces sont suffisamment éloignées et permettent ainsi d'étudier la séquence de longs fragments.

Les ADNc *Krox20* ont été amplifiés avec la Phusion DNA Polymérase du fait de sa grande fidélité pour les longs fragments secondaire à sa fonction 3'-5' exonucléasique.

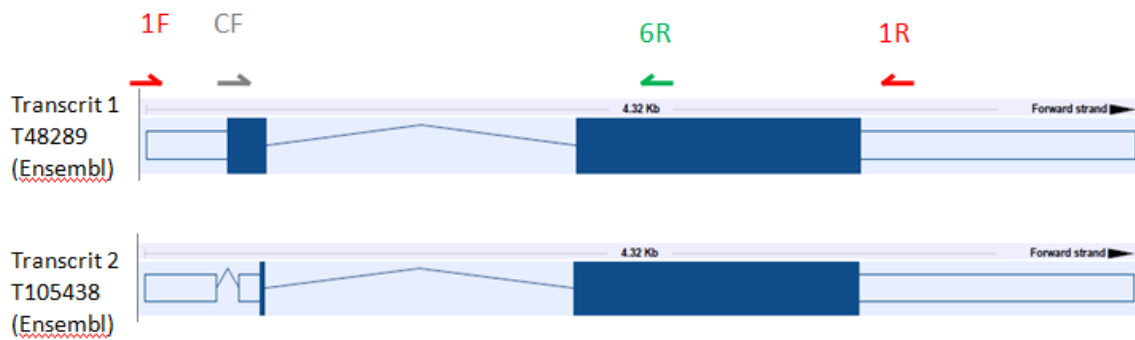
Les ADNc *GAPDH* ont servi de témoin positif afin de valider la rétrotranscription. Toutes les réactions ont été effectuées en tubes séparés, dans un volume réactionnel de 50µl.

Le programme d'amplification par PCR consistait en une étape de dénaturation à 98°C pendant 10s, des étapes confondues d'hybridation et d'élongation à 72°C pendant 60 à 90s, pour 60 cycles d'amplification au total.

Les produits d'amplification ont été visualisés par révélation aux UV, après électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium.

	Volume (en µl)			
Tampon GC	10			
Amorce F (250ng/µl)	1	98°C	30s	X60
Amorce R (250ng/µl)	1	98°C	10s	
dNTP	1	72°C	60 à 90s	
Phusion DNA Polymerase	0,5	72°C	10min	
Eau	33,5	4°C	∞	
ADNc	3			
	<hr/> 50			

Tableau 6: Protocole de PCR qualitative des ADNc *Krox20*.



1F: 5'-TGAGAGAGCAGCGATTGATT-3'  
 1R: 5'-CAAGGTCCTTTGCCAGAT-3'  
 6R: 5'-TCTCTCTGGCACGGAGAT-3'  
 CF: 5'-AGTTGGGTCTCCAGGT-3'

Figure 20: Cartographie des amorces utilisées pour l'analyse qualitative des ARNm *Krox20*.

### C) Western Blot de *Krox20*

Les nerfs sciatiques des souris sauvages ont été lysés dans un tampon d'extraction de protéines (50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton-X100, 1% SDS, 1% inhibiteur de protéases) et broyés par des billes de Tungstène stériles à l'aide de l'homogénéisateur (Qiagen) pendant 45 secondes à 30 pulsations par seconde.

Les surnageants obtenus après centrifugation (14000 tours/min pendant 15min à 4°C) ont été utilisés comme échantillons. Quatre nerfs à E18,5 ont été lysés dans 40µl de tampon, 2 nerfs à P1 ont été lysés dans 30µl de tampon. Les protéines extraites ont été dosées avec le kit Bio-Rad (Hercules, CA) par spectrophotométrie en utilisant le BSA comme étalon. Des quantités égales de protéines (15µg) ont été dénaturées par chauffage dans du tampon Laemmli contenant du beta-mercaptoéthanol, puis séparées dans un gel de SDS-polyacrylamide à 10% fait au laboratoire.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham Biosciences). Les sites de fixation non spécifiques de la membrane ont été bloqués dans du tampon Tris salinisé contenant 0,4% de Tween (TBS-T) supplémenté avec 5% de poudre de lait, pendant trois heures à température ambiante.

La membrane a ensuite été incubée dans du TBS-T supplémenté avec 1% de poudre de lait, mélangé avec des anticorps primaires polyclonaux de lapin dirigés contre Krox20 (1/2000, Covance, Berkeley, CA) toute la nuit à 4°C. Après lavage, elle a été incubée avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué avec la peroxydase HRP (1/5000) (Amersham Biosciences), pendant une heure à température ambiante.

L'actine a été marquée avec des anticorps primaires anti- $\beta$ -actine monoclonaux de souris (1/5000), puis des anticorps secondaires antisouris conjugués avec l'HRP (1/5000).

La révélation s'est faite par chimiluminescence avec le kit Supersignal West Femto (Thermoscientific). Les signaux obtenus ont été acquis et numérisés sur l'automate Chemicapt, puis quantifiés en utilisant le logiciel Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare).

#### **D) Echantillons humains**

Les échantillons d'ADN utilisés pour ce travail font partie de la banque d'ADN conservée à -20°C au laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU Dupuytren. Ce sont des ADN qui ont été préalablement extraits grâce au kit BACC3 Illustra TM (GE Healthcare) à partir de sang total. Leur concentration a ensuite été mesurée sur le Nanodrop, puis ils ont été dilués à 100ng/ $\mu$ l.

Tous les échantillons proviennent de patients informés et ayant fourni un consentement écrit et signé pour l'examen de leur caractéristiques génétiques. Les patients inclus dans cette étude sont ceux qui répondent aux critères de la pathologie pouvant mettre en cause le gène *Egr2*, et pour lesquels aucune mutation n'a été retrouvée, c'est-à-dire des patients présentant des CMT1, 4, DSS, ainsi que des formes voisines, ayant pour caractéristiques principales:

- Une notion de récessivité et/ou de consanguinité chez les parents
- Un début précoce pendant l'enfance voire *in utero*
- Une présentation sévère avec effondrement des vitesses de conduction nerveuses à l'EMG (<30m/s) traduisant une atteinte de la myéline.

Les patients pour lesquels une mutation a été identifiée sur *Egr2* ou sur un autre gène de myéline, et ceux présentant une forme axonale de CMT ont été exclus de l'étude.

A partir de ces critères, 76 patients ont été retenus pour le séquençage et l'analyse semi-quantitative de MSE.

Parmi ces patients, 2 sont issus de la même fratrie et d'une union consanguine. Les ADN de leurs parents, étant disponibles, ont pu être analysés en plus du nombre total de patients inclus dans l'étude.

### **1) Amplification de MSE par PCR et séquençage**

Les amorces utilisées sont celles qui ont été choisies préalablement au laboratoire, ont une Tm de 64°C, et amplifient un fragment de 1218pb.

F3 : 5'TGCAAAACTTTTCATCGCAAC

R1 : 5'GAATGTCCACCACCAGCTTT

La PCR a été réalisée avec l'enzyme Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes), dotée d'une fonction 3'-5' exonucléasique garantissant sa fidélité, adaptée au séquençage des longs fragments.

	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentration finale</b>			
<b>Tampon Phusion HF (5X)</b>	10	1X	98°C	1'30''	X35
<b>F3 (25<math>\mu</math>M)</b>	1	0,5 $\mu$ M	98°C	10''	
<b>R1 (25<math>\mu</math>M)</b>	1	0,5 $\mu$ M	64°C	30''	
<b>dNTP (10mM)</b>	1	0,2mM	72°C	1'	
<b>Phusion DNA polymerase (2U/<math>\mu</math>l)</b>	0,5	0,02U/ $\mu$ l	72°C	10'	
<b>ADN (100ng/<math>\mu</math>l)</b>	1	2ng/ $\mu$ l	4°C	$\infty$	
<b>H2O</b>	qsp 50				

Tableau 7: Protocole de PCR du fragment MSE.

Les produits d'amplification ont été contrôlés par migration sur gel d'agarose à 1,5% avec marquage au BET.

Les produits de PCR ont ensuite été purifiés avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), au moyen de membranes échangeuses d'ions.

Toutes les manipulations ont été réalisées conformément aux instructions du fournisseur. Puis les produits de purifications ont été vérifiés par migration sur gel d'agarose à 1,5%.

Le séquençage des deux brins a été effectué par la méthode de Sanger automatisée sur gel de séquenceur capillaire en utilisant les amorces F3 et R1

séparément. Du fait de la longueur du fragment, 2 autres amorces, internes au fragment, ont aussi été utilisées:

IO1F : 5'TTTCAGCTTTGTGAAGGGCT

IO2R : 5'ACAGTTCGTGGAAGAATGGC

La réaction de séquençage a été effectuée avec le kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

	Volume ( $\mu$ l)			
<b>Amorce F3 ou R1 (10<math>\mu</math>M)</b>	1	94°C	3'	X25
<b>BigDye Terminator v3.1</b>	4	94°C	10"	
<b>Produit de PCR purifié</b>	1,5 ou 4	50°C	5"	
<b>H2O</b>	qsp 20	60°C	4'	
		60°C	1'	
		4°C	$\infty$	

Tableau 8: Protocole de la réaction de séquence de MSE avec le kit BigDye Terminator.

Les produits de la réaction de séquençage ont ensuite été purifiés avec le kit DyeEx Spin Kit (Qiagen).

Le solvant a ensuite été évaporé au SpeedVac. Puis l'ADN a été repris dans du formamide, et dénaturé à 96°C pendant 5 min.

Les échantillons ont migré sur le séquenceur automatique ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems).

Les électrophorégrammes des séquences obtenues ont été reconstitués par le logiciel Sequencing analysis (Applied Biosystems), et analysés avec un logiciel d'alignement multiple de séquences d'ADN: Sequence Navigator (Applied Biosystems), en comparaison avec la séquence de référence, téléchargée depuis le site UCSC Genome Browser.

## 2) Analyse semi-quantitative de MSE

La semi-quantification de MSE par rapport à un gène témoin est pertinente dans la mesure où elle permet de distinguer pour une séquence normale, une homozygotie, d'une délétion hétérozygote.

Nous avons mis au point une technique de semi-quantification de MSE en utilisant l'exon 5 du gène *PMP22* comme référence. En effet le gène *PMP22* est un des premiers gènes à être explorés dans le diagnostic de CMT, et toute anomalie quantitative à son niveau a pu être écartée pour ces patients.

MSE et l'exon 5 de *PMP22* ont été amplifiés au cours d'une PCR biplex en conditions quantitatives par des amorces marquées par le fluorochrome 6-FAM. Puis les fragments amplifiés ont été analysés après migration sur le gel du séquenceur capillaire ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems). La semi-quantification a été réalisée en calculant les rapports d'aires sous la courbe entre le pic correspondant à MSE et celui correspondant au fragment de référence. L'analyse a été effectuée avec le logiciel d'analyse de fragments GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

Les amorces utilisées pour amplifier l'exon 5 de *PMP22* sont les suivantes:

PMP22-F: 6-FAM-5'CTACCCAGCAATTGTCAGCA

PMP22-R: 5' AATGTGGGAGTGATGAAGGC

L'amplification de MSE a été réalisée avec les amorces F3 et R1. Seule l'amorce R1 a été marquée par le fluorochrome 6-FAM à son extrémité 5'.

Le fragment de référence (1138pb) et le fragment MSE (1218pb) ayant une taille différente, ils ont été marqués par le même fluorochrome.



	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentration finale</b>			
<b>Tampon GC Phusion (5X)</b>	4	1X			
<b>dNTP (10mM)</b>	0,4	0,2mM	98°C	3'	} X22
<b>F3 (25<math>\mu</math>M)</b>	0,48	0,6 $\mu$ M	98°C	10''	
<b>R1* (25<math>\mu</math>M)</b>	0,48	0,6 $\mu$ M	64°C	30''	
<b>PMP22-F* (25<math>\mu</math>M)</b>	0,24	0,3 $\mu$ M	72°C	1'	
<b>PMP22-R (25<math>\mu</math>M)</b>	0,24	0,3 $\mu$ M	72°C	10'	
<b>Phusion Hot Start (2U/<math>\mu</math>l)</b>	0,2	0,02U/ $\mu$ l	4°C	$\infty$	
<b>ADN (100ng/<math>\mu</math>l)</b>	0,4	2ng/ $\mu$ l			
<b>H2O</b>	qsp 20				

Tableau 9: Protocole de la PCR semi-quantitative de MSE par rapport à l'exon 5 de *PMP22*, avec des amorces marquées, en vue d'une analyse de fragment sur gel de séquenceur capillaire.

Les produits de la réaction ont ensuite été dénaturés à 96°C pendant 5min dans du formamide et injectés dans le gel capillaire du séquenceur, avec le marqueur de taille fluorescent ROX 500 HD (Applied Biosystems).

La fiabilité de la technique a été éprouvée sur 3 patients porteurs d'une délétion hétérozygote de MSE (témoins positifs) et 3 patients atteints d'hémochromatose (contrôles). La reproductibilité de la technique a été évaluée en calculant l'écart-type des valeurs des rapports d'aires sous la courbe entre MSE et le fragment de référence.

## **IV) RESULTATS**

## **A) Semi-quantification des ARNm *Krox20* par RT-qPCR à E18,5, P1 et P9 chez la souris**

La semi-quantification des ARNm *Krox20* extraits de nerfs sciatiques a été effectuée aux stades E18,5, P1 et P9, par PCR semi-quantitative en temps réel. Le premier essai de quantification a été effectué sur les ADNc d'une première rétrotranscription. Il montrait une augmentation des ARNm *Krox20* d'un facteur 16 entre E18,5 et P1 (donnée non montrée). Ce résultat a été invalidé du fait de l'absence de linéarité des valeurs de Ct au sein des gammes de dilution des échantillons. De plus ces valeurs étaient en désaccord avec les résultats de Blugeon et al, qui montraient une augmentation d'un facteur 2,5 entre E17,5 et P1.

Un autre essai de quantification a été réalisé avec les ADNc d'une deuxième rétrotranscription (cf Tab. 10) et a montré une augmentation d'un facteur 4,3 entre E18,5 et P1 (cf Fig. 21).

**Résultat de la PCR quantitative Krox20 P1 vs E18,5**

PCR	Efficacité de la PCR	Valeur des Ct						Ratio brut P1/E18,5	Coefficient de normalisation par les gènes de ménage	Ratio P1/E18,5 après normalisation
		E18,5			P1					
		1/5	1/10	1/20	1/5	1/10	1/20			
<b>Krox20</b>	1,78	28,2	31	32	24,3	25,8	26,9	20	<b>4,58</b>	<b>4,36</b>
<b>β-tubuline</b>	2,51	22,5	23,5	24,3	20,6	21,5	22,7	5,6		
<b>GAPDH</b>	2,42	21,2	22,3	23,2	19	20,1	21,2	3,6		

**Résultat de la PCR quantitative Krox20 P9 vs E18,5**

PCR	Efficacité de la PCR	Valeur des Ct						Ratio brut P9/E18,5	Coefficient de normalisation par les gènes de ménage	Ratio P9/E18,5 après normalisation
		E18,5			P9					
		1/5	1/10	1/20	1/5	1/10	1/20			
<b>Krox20</b>	2,1	28,2	31	32	25,7	27,8	29,2	9,2	<b>3,9</b>	<b>2,35</b>
<b>β-tubuline</b>	2,15	22,5	23,5	24,3	21,3	22,2	24,3	2,5		
<b>GAPDH</b>	2,28	21,2	22,3	23,2	18,8	20,2	21,2	5,3		

Tableau 10: Résultats de la PCR semi-quantitative de *Krox20* et normalisation avec la GAPDH et la β-tubuline. La méthode des ΔCt a été utilisée pour comparer les quantités d'ARNm *Krox20* à E18,5, P1 et P9. Les ARNm *Krox20* à P1 et à P9 ont été quantifiés en se servant de E18,5 comme référence.

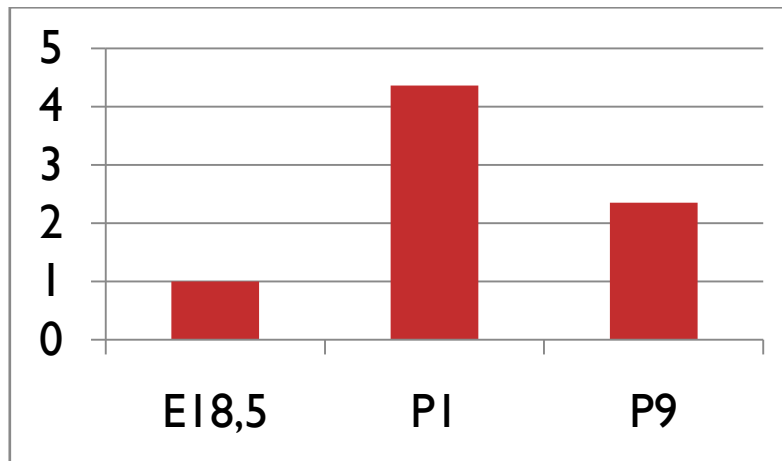


Figure 21: Histogramme représentant les résultats de la RT-PCR semi-quantitative des ARNm *Krox20* après normalisation avec la GAPDH et la  $\beta$ -tubuline.

## **B) Semi-quantification des protéines Krox20 par Western Blot à E18,5 et P1 chez la souris**

Les protéines Krox20 ont été quantifiées par Western Blot sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante aux stades E18,5, P1 et à des stades ultérieurs (P2,5, P8,...).

Nous nous sommes heurtés à des difficultés techniques portant sur plusieurs paramètres.

- La méthode d'extraction:

Deux méthodes d'extraction ont été utilisées: la sonication, et le broyage avec des billes de Tungstène. La plupart des essais réalisés avec la méthode d'extraction par sonication n'ont pas permis de détecter la protéine Krox20. En

effet cette méthode induit une élévation thermique susceptible de dégrader Krox20, au moins partiellement. De plus, les nerfs pris à des stades myélinisés (P9) nécessitent un temps plus long d'extraction, ce qui augmente le risque de dégradation. A l'inverse, la méthode par broyage avec des billes de Tungstène dure moins d'1 minute et n'augmente pas la température des échantillons. Les essais de mise au point ayant réussi, cette méthode a été retenue.

- Le dosage des protéines:

Afin d'équilibrer les concentrations de protéines pour tous les stades explorés, les premiers essais ont été effectués en évaluant empiriquement le rapport entre la masse tissulaire à extraire et le volume de tampon de lyse. Or, le degré de myélinisation des nerfs étant très variable pour les stades explorés, les rendements d'extraction étaient aussi très différents. Ceci engendrait plusieurs problèmes:

- Les quantités de protéines n'étaient pas équilibrées entre les échantillons, ce qui pouvait diminuer la précision de la quantification relative.
- Une mauvaise extraction, et donc une quantité de dépôt insuffisante, pouvait empêcher la détection de Krox20.

C'est pourquoi les extraits protéiques ont été dosés. Les quantités déposées ont ensuite toujours été supérieures à 10µg. Nous n'avons pas dépassé 25µg pour ne pas générer trop de bruit de fond.

- La non-spécificité des anticorps anti-Krox20:

Les lots d'anticorps anti-Krox20 Covance utilisés donnaient de nombreuses bandes non-spécifiques, en l'occurrence dans l'intervalle de taille qui comprend Krox20. Afin de mieux distinguer la bande Krox20, j'ai allongé le temps de migration dans le gel de séparation.

Un témoin positif Krox20 (cellules cos transfectées avec un plasmide contenant le gène *Krox20*) et un témoin négatif (cellules cos non transfectées) ont servi à distinguer la bande Krox20 des autres bandes, non spécifiques.

- La qualité du témoin positif Krox20:

Au fil des utilisations, l'intensité de la bande Krox20 du témoin positif était moins forte, et le niveau de migration était modifié, perturbant l'analyse. Un nouveau témoin positif a donc été préparé en transfectant de nouvelles cellules cos.

Le dernier Western Blot a été réalisé en prenant en compte tous les facteurs sus-cités (cf Fig. 22). Il montre une augmentation franche de la quantité de la protéine Krox20 entre E18,5 et P1, après normalisation avec l'actine. Nous concluons à une augmentation de la protéine Krox20 d'un facteur 9 entre ces deux stades.

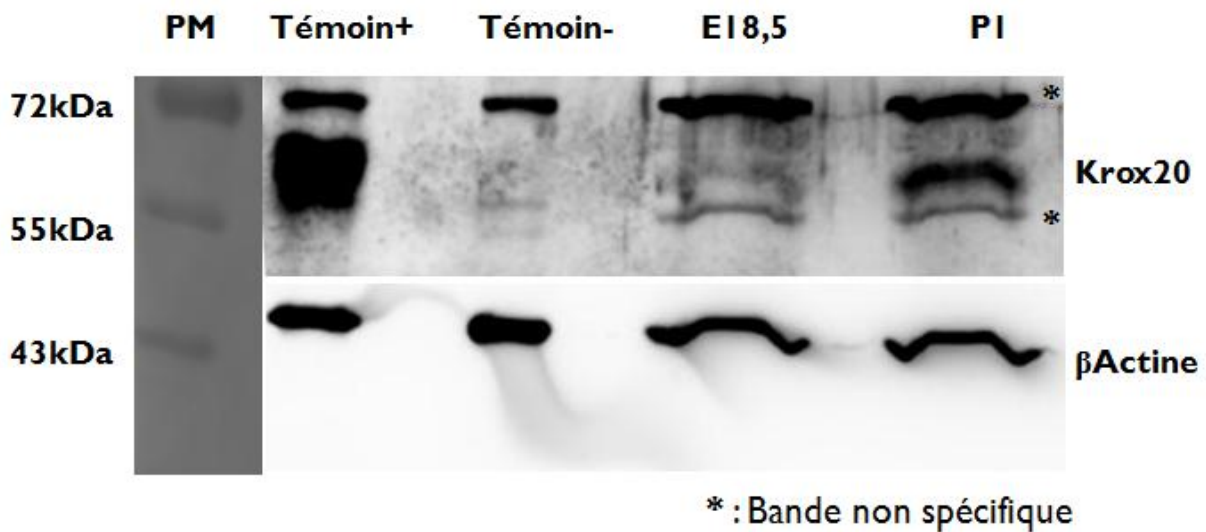


Figure 22: Western Blot marquant la protéine Krox20 dans des nerfs sciatiques de souris aux stades E18,5 et P1. PM: Poids moléculaire; Témoïn +: cellules cos transfectées par un plasmide contenant le gène *Krox20* ; Témoïn -: cellules cos non transfectées. Les astérisques correspondent à des bandes non spécifiques.

La comparaison des cinétiques d'évolution des ARNm *Krox20* et de la protéine correspondante aux mêmes stades, révèle un découplage. L'augmentation de la quantité des protéines Krox20 ne pouvant pas être expliquée par celle des ARNm *Krox20*, suggère ainsi la présence d'une régulation post-transcriptionnelle.

Le découplage ARN/protéine à la naissance marquerait donc une séparation entre une première phase où la régulation est négative (absence de Krox20 détectable en IHC) et une deuxième phase positive caractérisée par la production importante de la protéine.

Ces deux phases coïncident temporellement avec le recrutement successif d'ISE et de MSE. Ceci nous fait évoquer la possibilité d'une relation entre MSE et la phase positive de la régulation post-transcriptionnelle de *Krox20*. (cf Fig. 23).



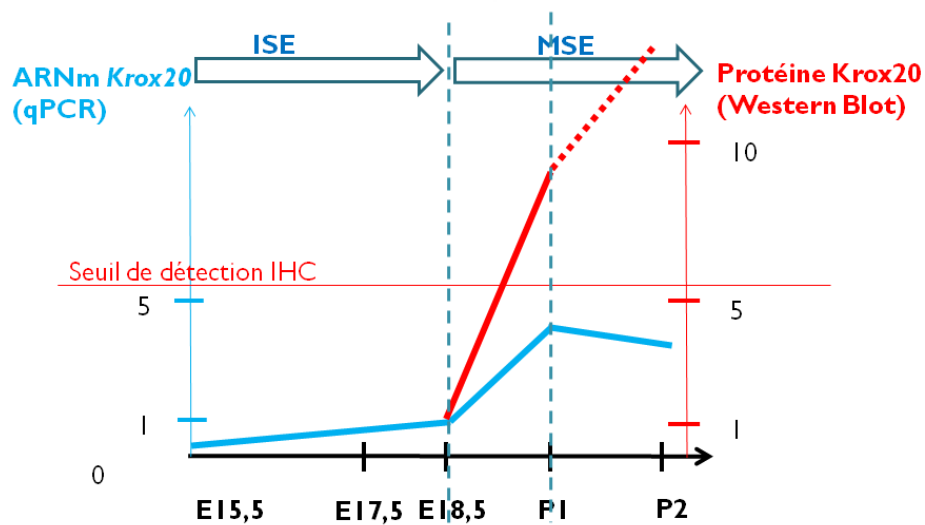


Figure 23: Représentation des cinétiques d'évolution des ARNm *Krox20* et de la protéine *Krox20* sur un graphique à deux axes en ordonnées. Les protéines *Krox20* sont représentées en rouge, les ARNm *Krox20* en bleu. Les valeurs en ordonnées sont calculées par rapport à la quantité présente au stade E18,5. Les périodes d'activation des enhancers ISE et MSE sont représentées en haut.

Un autre Western Blot de *Krox20* a été réalisé à E18,5 et P2, et celui-ci montre une augmentation d'un facteur 30 entre ces 2 stades alors que la quantité d'ARNm *Krox20* diminue à partir de P1. Ce résultat n'a pas encore été confirmé par d'autres manipulations, c'est la raison pour laquelle la dernière partie de la courbe des protéines *Krox20* est représentée en pointillés.

### C) Analyse qualitative des ARNm *Krox20* chez la souris

J'ai recherché à caractériser s'il existe différentes formes d'ARNm *Krox20* aux stades E18,5 et P1. L'approche reposait sur la présence de deux variants d'épissage connus de l'ARNm *Krox20* qui diffèrent par un épissage alternatif dans la région 5' (cf Matériels et Méthodes). J'ai donc recherché des différences dans leur profil de distribution entre E18,5 et P1, qui auraient pu être mises en relation avec l'apparition de la protéine *Krox20*.

Une hypothèse envisageable pour expliquer la grande différence de quantité de protéine Krox20 avant et après la naissance est que ce sont des formes différentes d'ARN qui sont transcrites à ces deux stades et qui présenteraient des différences d'efficacité de traduction.

Une modification de la séquence des ARNm *Krox20* apporterait un argument supplémentaire pour l'implication des enhancers ISE et MSE dans la régulation post-transcriptionnelle, puisqu'ils agissent directement sur la transcription.

Afin de tester cette hypothèse nous avons analysé la structure des ARN après rétrotranscription.

Une première analyse a été effectuée sur les ADNc issus de la première rétrotranscription.

La détection des ADNc *Krox20* n'a pas pu être possible, contrairement aux ADNc *GAPDH*, témoignant d'une bonne efficacité de la rétrotranscription (donnée non montrée).

De nouveaux essais de PCR ont été effectués avec des gammes de dilution des ADNc totaux, des allongements de temps de polymérisation par la Phusion DNA polymérase jusqu'à 1min30s, sans résultat.

Enfin, une PCR nichée, amplifiant les produits de la première réaction PCR, avec la même amorce sens *Krox20* 1F et l'amorce antisens *Krox20* 6R au cours d'une deuxième réaction de PCR, n'a pas non plus donné de résultat (donnée non montrée).

Une PCR spécifique du transcrit 1 a été effectuée avec l'amorce CF, sans succès (donnée non montrée).

Les hypothèses permettant d'expliquer ces échecs sont multiples:

- La taille des fragments amplifiés est trop importante et diminue considérablement le rendement de la PCR, avec la Phusion DNA Polymerase.
- La réaction de rétrotranscription des ARNm *Krox20* a pu être interrompue et donc les ADNc *Krox20* sont tronqués au niveau de leur extrémité 5'.
- Enfin les séquences complémentaires des amorces utilisées ont pu être supprimées par épissage alternatif.

Les mêmes réactions de PCR d'ADNc *Krox20* ont été réalisées sur les ADNc issus de la deuxième réaction de rétrotranscription, sans succès.

La position centrale de MSE dans l'expression de *Krox20* après la naissance nous incite à rechercher des anomalies à son niveau chez des patients atteints de formes démyélinisantes de CMT.

## **D) Séquençage de MSE sur les ADN génomiques de 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth**

Le séquençage des 76 patients sélectionnés a été effectué avec les amorces F3, R1, IO1F et IO2R. Il a révélé la présence d'un variant à l'état hétérozygote identique chez 5 d'entre eux. Il s'agit d'une délétion d'une thymine en position 64,532,000 selon la nomenclature de UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19) de Février 2009. Ce variant est différent de l'unique SNP répertorié dans le fragment étudié: rs224087(C/T). Il est situé entre les deux domaines conservés de MSE, porteurs des sites de liaison aux facteurs POU et Sox10. Les 5 patients qui en sont porteurs ne sont pas apparentés.

Or, la neuropathie amyélinisante congénitale secondaire à la délétion totale de MSE était transmise selon un mode récessif chez le patient index. La découverte chez nos patients d'un nouveau variant hétérozygote dans la séquence de MSE ne pourrait pas expliquer la pathologie par une inactivation de cet enhancer.

De plus les études d'alignement de séquences d'ADN montrent que cette base est peu conservée chez les Vertébrés, ce qui diminue fortement la probabilité que ce variant soit pathogène.

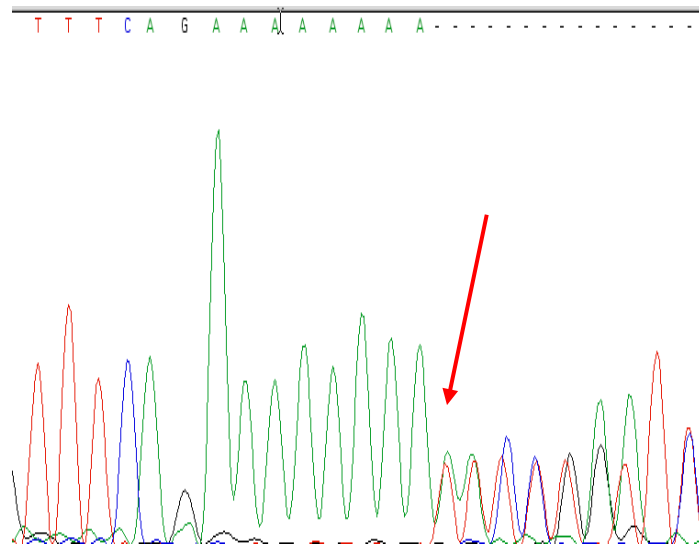


Figure 24: Electrophorégramme montrant la séquence nucléotidique d'un patient porteur de la délétion ponctuelle d'une thymine en position 64,532,000 (Nomenclature UCSC Genome Browser GRCh37/hg19 de Février 2009) à l'état hétérozygote au niveau de MSE.

Il serait néanmoins intéressant d'étudier:

- La présence de ce variant chez les parents de ces patients, ce qui permettrait afin d'évaluer son caractère pathogène ou non.
- La fréquence de ce variant chez des patients non atteints de CMT afin d'étayer la thèse d'un polymorphisme.

Enfin, 14 patients étaient porteurs du variant minoritaire du SNP rs224087, dont 1 des 5 patients porteurs de la délétion ponctuelle de la thymine.

### **E) Semi-quantification de MSE sur les ADN génomiques de 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth**

La reproductibilité de la PCR semi-quantitative de MSE mise au point au laboratoire a été évaluée en analysants 3 patients témoins et 3 contrôles. Pour chaque patient, 3 réactions de PCR ont été effectuées, et chaque produit de PCR a été analysé deux fois sur séquenceur capillaire.

Une moyenne des rapports d'aires sous la courbe entre MSE et le fragment de référence a été calculée pour les patients témoins et contrôles (cf Tab.11)

			AUC PMP22	AUC MSE	AUC MSE / AUC PMP22	Moyenne par PCR	Moyenne par patient	Ecart type
Témoïn 1	PCR1	Migration1	22801	9448	0.41	0.405	0.40	0.01
		Migration2	13473	5390	0.40			
	PCR2	Migration1	18181	7179	0.39	0.39		
		Migration2	11807	4660	0.39			
	PCR3	Migration1	36559	14526	0.40	0.395		
		Migration2	32100	12630	0.39			
Témoïn 2	PCR1	Migration1	16655	7013	0.42	0.42	0.41	0.02
		Migration2	-----	-----	-----			
	PCR2	Migration1	13246	5080	0.38	0.39		
		Migration2	12384	4914	0.40			
	PCR3	Migration1	35389	14630	0.41	0.405		
		Migration2	32510	12938	0.40			
Témoïn 3	PCR1	Migration1	16404	7176	0.44	0.435	0.41	0.03
		Migration2	16763	7199	0.43			
	PCR2	Migration1	-----	-----	-----	0.38		
		Migration2	13771	5208	0.38			
	PCR3	Migration1	31146	12440	0.40	0.405		
		Migration2	36497	15101	0.41			
<b>Moyenne témoins</b>							<b>0.41</b>	<b>0.02</b>
Contrôle 1	PCR1	Migration1	13582	11035	0.81	0.815	0.79	0.03
		Migration2	15595	12850	0.82			
	PCR2	Migration1	11397	9035	0.79	0.76		
		Migration2	11435	8361	0.73			
	PCR3	Migration1	7130	5441	0.76	0.78		
		Migration2	25878	20576	0.80			
Contrôle 2	PCR1	Migration1	15483	12226	0.79	0.80	0.77	0.03
		Migration2	15579	12569	0.81			
	PCR2	Migration1	12084	8607	0.71	0.75		
		Migration2	11470	9068	0.79			
	PCR3	Migration1	30605	23313	0.76	0.745		
		Migration2	29049	21151	0.73			
Contrôle 3	PCR1	Migration1	9084	7526	0.83	0.83	0.79	0.04
		Migration2	8025	6723	0.83			
	PCR2	Migration1	7161	5511	0.77	0.79		
		Migration2	6169	5006	0.81			
	PCR3	Migration1	16911	12875	0.76	0.76		
		Migration2	15379	11722	0.76			
<b>Moyenne contrôles</b>							<b>0.78</b>	<b>0.03</b>

Tableau 11: Evaluation de la PCR semi-quantificative de MSE sur 3 patients témoins (délétion hétérozygote de MSE) et 3 contrôles (non délétés). La reproductibilité de la technique a été évaluée pour chaque patient sur 3 réactions de PCR et 2 analyses de fragment pour chaque réaction.

Les valeurs d'écart-types étaient inférieures à 0,05. Enfin la technique montre un bon pouvoir discriminant entre témoins et contrôles, avec des rapports AUC MSE/PMP22 de 0.41 pour les témoins et 0.78 pour les contrôles (cf Fig. 24).

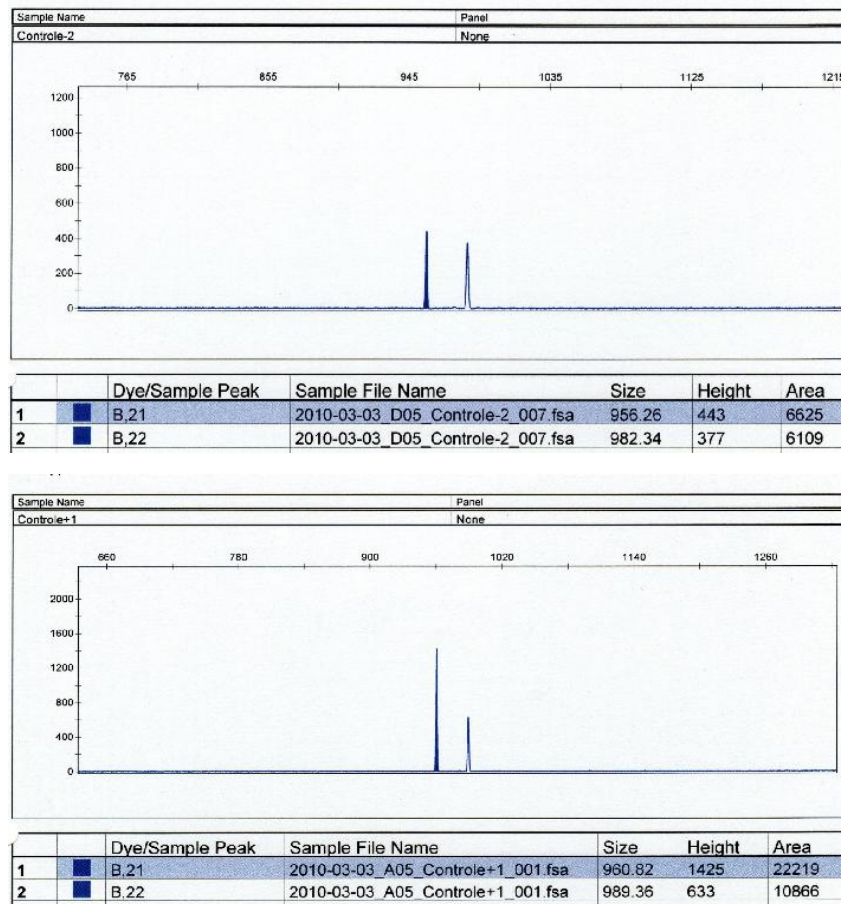


Figure 25: Electrophorégrammes représentant le fragment de référence (premier pic: 1138pb) et MSE (deuxième pic: 1218pb). La semi-quantification est effectuée en calculant le rapport d'aires sous la courbe entre MSE et le fragment de référence. L'image du haut montre le tracé d'un patient porteur des 2 allèles de MSE. L'image du bas montre le tracé d'un patient porteur d'une délétion hétérozygote de MSE.

L'analyse semi-quantitative, effectuée sur 58 des patients inclus dans l'étude, n'a montré aucune délétion (partielle ou totale) du fragment MSE étudié, ni à l'état hétérozygote, ni à l'état homozygote.



Les 18 autres patients n'ont pas pu être semi-quantifiés du fait d'un volume résiduel trop faible d'extrait d'ADN.

Nous pouvons néanmoins exclure pour 6 d'entre eux une délétion totale du fragment MSE étudié car ils sont hétérozygotes pour le SNP rs224087 (C/T).

## V) DISCUSSION

Chez la souris, la comparaison des cinétiques respectives d'évolution des ARNm *Krox20* et de la protéine Krox20, entre E18,5 et P1, a permis de déceler une différence notable. L'analyse en Western Blot confirme bien les résultats antérieurs de l'immunohistochimie sur coupes de nerfs sciatiques: à savoir la quasi-absence de la protéine Krox20 avant le jour de la naissance, puis son apparition très rapide, en l'espace de 24 heures. Entre ces deux phases, la quantité d'ARNm *Krox20* augmente faiblement et graduellement, comme cela avait été décrit (104). Ainsi cela indique qu'entre E18,5 et P1, dans les CS, l'augmentation des protéines Krox20, n'est pas due seulement aux variations concomitantes des ARNm *Krox20*. Ce découplage entre ARNm et protéine introduit l'existence d'une régulation de type post-transcriptionnelle: post-transcriptionnelle immédiate (épissage, stabilité, localisation subcellulaire,...), traductionnelle, ou post-traductionnelle.

#### **A) Utilité d'une régulation post-transcriptionnelle de *Krox20***

Il est probable que les CS doivent produire une quantité importante de protéine Krox20 très rapidement après la naissance. Dans ce cas la transcription précoce des ARNm *Krox20* servirait à constituer un pool, immédiatement disponible pour la traduction le jour de la naissance.

Il est donc légitime de s'interroger sur la nécessité de repousser la synthèse de la protéine Krox20 au jour de la naissance:

de E15,5 jusqu'à la naissance, chez la souris, les ISC atteignent un pic de prolifération afin d'atteindre un rapport de 1/1 avec les axones. Or l'action promyélinisante de Krox20 est indissociable de son action antimitotique. Une

traduction prématurée de *Krox20* aboutirait à une non- prolifération des CS et donc à une hypomyélinisation.

**B) Leviers de la régulation post-transcriptionnelle de *Krox20* pouvant aboutir au découplage observé entre l'ARNm et la protéine chez la souris**

La régulation post-transcriptionnelle de *Krox20* peut jouer:

1/Sur la localisation subcellulaire des ARNm *Krox20*, qui se traduit par une inhibition de la traduction lorsqu'ils sont séquestrés dans le noyau.

2/Sur l'efficacité de la traduction des ARNm *Krox20*.

3/Sur la stabilité de la protéine *Krox20* produite.

**C) Exploration moléculaire du découplage entre les ARNm *Krox20* et la protéine *Krox20***

Le découplage observé pour *Krox20* entre ARNm et protéine, a d'abord été exploré en amont, en étudiant la structure des ARNm *Krox20*. La description *in vitro* de deux variants majoritaires de l'ARNm *Krox20* nous a amené à rechercher leur présence *in vivo* dans les CS. L'apparition à tour de rôle de deux ARNm *Krox20* distincts serait intéressante, car elle serait corrélée avec l'allure biphasique de la régulation de *Krox20*. De cette étude, plusieurs éventualités peuvent se présenter.

### **1) Cas où les ARNm *Krox20* subissent une modification de leur structure**

Ce découplage découlerait alors d'une première régulation, soit transcriptionnelle, soit par épissage alternatif. Son retentissement post-transcriptionnel sur l'expression de *Krox20* se situerait:

- au niveau traductionnel, par une régulation de l'efficacité de la traduction.
- au niveau post-traductionnel: les ARNm *Krox20* coderaient deux isoformes de la protéine *Krox20* qui n'ont pas la même stabilité: la première se dégraderait rapidement alors que la deuxième serait stable.

### **2) Cas où la structure des ARNm *Krox20* reste inchangée**

Contrairement au cas précédent, la régulation générant ce découplage serait initiée au niveau post-transcriptionnel. Le découplage résulterait du recrutement successif de protéines de liaison à l'ARN aux actions antagonistes, pouvant interférer avec la localisation subcellulaire des ARNm et/ou l'efficacité de la traduction.

## D) Acteurs candidats de la régulation post-transcriptionnelle de *Krox20*

### 1) Les enhanceurs ISE et MSE

Le recrutement successif de deux enhanceurs de *Krox20*: ISE dans les ISC, et MSE dans les CS myélinisantes à des périodes qui coïncident avec les phases négative puis positive de la régulation post-transcriptionnelle respectivement, plaide en faveur d'une action de ces premiers dans cette régulation. En effet, ils pourraient gouverner chacun la synthèse d'un ARNm *Krox20* différent. Leur intervention via deux promoteurs différents, se traduirait par un découplage ARN/protéine au moment de la naissance qui dépend de modifications dans la structure des ARNm *Krox20*. ISE et MSE sont activés respectivement avant et après la naissance, c'est pourquoi il est nécessaire de comparer les séquences des ARNm *Krox20* à E18,5 et P1.

Cette analyse est en cours de réalisation et se poursuit par le séquençage complet des ARNm *Krox20*. La plateforme transcriptomique de l'IBENS s'est dotée récemment d'un séquenceur haut débit. Cette acquisition représente aussi une grande opportunité dans notre thématique, car elle permettrait non seulement de séquencer le(s) ARNm *Krox20* présent(s) dans les CS, mais aussi d'appréhender les modifications de l'ensemble du transcriptome des CS, et ainsi de mettre en lumière d'autres acteurs de cette régulation.

La thèse d'un rôle d'ISE et MSE dans la régulation post-transcriptionnelle de *Krox20* est aussi corroborée par la prédiction par les bases de données bioinformatiques, de l'existence de plusieurs transcrits différents (8 au total chez la souris d'après Ensembl). De plus, certains d'entre eux présenteraient des sites d'initiation de transcription distincts, mettant ainsi en lumière un

système de promoteur alternatif, compatible avec l'intervention d'enhancers différents.

## 2) Les protéines Quaking

Un autre acteur potentiel de cette régulation a été décrit dans les CS. Il s'agit des protéines Quaking (QKI), dont existent plusieurs isoformes, variants d'épissage d'un même transcrit primaire : QKI-5, -6, et -7 (105). Les protéines Quaking sont des protéines de liaison à l'ARN qui appartiennent à la famille STAR (Signal Transduction And RNA control)(106-107).

Dans les CS, Quaking exerce une régulation post-transcriptionnelle du gène *MBP* via une séquence analogue (QRE) située en 3'UTR (108), retrouvée dans les ARNm *Krox20* (106).

Le rôle de Quaking dans la myélinisation du SNC, par les oligodendrocytes est connu. Dans le SNP, son rôle n'a pas été prouvé *in vivo*, malgré sa présence dans les CS. Il a été montré que les isoformes QKI-6 et -7 sont des régulateurs positifs de la myélinisation. Leur inactivation inhibe la maturation des CS, et entraîne une diminution significative des ARNm *Krox20*. Il est possible qu'au moment de la maturation des CS en CS myélinisantes, un équilibre entre les isoformes de Quaking, d'abord en faveur de QKI-5, soit déplacé vers QKI-6 et -7 (106).

L'ensemble de ces données oriente vers une action de QKI sur la stabilité des ARNm *Krox20*: dans un premier temps QKI-5 induirait la dégradation des ARNm *Krox20*, puis dans un deuxième temps QKI-6 et -7, augmenteraient leur stabilité, ce qui se traduirait par l'augmentation de la protéine *Krox20*, observée à la naissance. Au vu de nos derniers résultats, cette action ne peut

contribuer que faiblement à la régulation de *Krox20*: en effet, seule, elle n'induirait aucun découplage entre ARNm et protéine. Une autre action de QKI a été démontrée sur les ARNm *MBP* dans les CS: elle consiste à réguler leur export nucléaire, la traduction n'étant possible que lorsque les ARN messagers sont dans le compartiment cytoplasmique. Ainsi les protéines QKI semblent avoir une action multimodale sur leurs ARNm cibles, portant sur divers paramètres tels que la localisation subcellulaire et la stabilité.

### **3) Les microARN**

Les microARN sont des ARN double brin de petite taille (environ 22 nucléotides) qui jouent un rôle crucial dans la régulation des ARNm chez les Eucaryotes. La maturation finale des microARN est médiée par un complexe contenant Dicer, une ribonucléase de type III qui clive les précurseurs des microARN (environ 60 nucléotides) en fragment de 22 nucléotides. Les miARN sont ensuite chargés dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), et fonctionnent comme des sondes qui repèrent la région 3' non traduites de leurs ARN messagers cibles. Ils agissent sur eux en régulant négativement le niveau de la traduction et aussi en induisant leur dégradation. Du fait du rôle crucial de Dicer, sa délétion aboutit à la suppression de l'activité des miARN. Plusieurs études ont appliqué cette stratégie pour tester l'importance des miARN dans certains tissus. Il a été montré que la perte de Dicer empêche la différenciation des CS et la synthèse de myéline en modifiant l'équilibre entre les facteurs stimulateurs et inhibiteurs du processus de myélinisation (109). Dans les CS déficientes en Dicer, la synthèse de la protéine *Krox20* tout comme la plupart des protéines de myéline sont considérablement diminuées. A l'inverse, l'expression de facteurs inhibiteurs de la myélinisation tels que *Sox2*



est significativement augmentée. Ainsi la suppression des miARN passerait par une levée de l'inhibition des facteurs antimyélinisants, contribuant à l'inhibition secondaire de l'expression de *Krox20*.

Peut-être aussi que d'autres microARN auraient une action négative sur l'expression de *Krox20* avant la naissance. Cette inhibition serait ensuite levée du fait d'une modification de la structure des ARNm *Krox20* ou des microARN eux-mêmes.

De toutes ces hypothèses, celle de l'implication des enhancers ISE et MSE semble la plus séduisante. En effet, dans ce cas, le déficit d'Egr2 dans les CS du patient décédé pourrait aussi être secondaire à la réactivation d'ISE, dont l'ARNm serait soumis à une régulation post-transcriptionnelle négative.

#### **E) Analyse qualitative et quantitative de MSE chez 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth**

L'analyse de MSE sur un échantillon ciblé de 76 patients présentant des formes démyélinisantes de CMT, sévères et de survenue précoce n'a révélé aucune délétion de grande taille emportant tout ou partie de MSE.

Un nouveau variant consistant en une délétion ponctuelle de la thymine en position 64,532,000 (GRCh37/hg19 ; Février 2009) a été découvert à l'état hétérozygote chez 5 patients non apparentés: se pose alors la question de la corrélation entre ce variant et le phénotype des patients qui en sont porteurs.

Dans la famille du patient index atteint de la neuropathie amyélinisante congénitale, la délétion emportant la totalité de MSE n'est pathologique qu'à

l'état homozygote, et serait donc une anomalie récessive. En effet, les deux parents, consanguins, tous deux porteurs d'une délétion hétérozygote sont indemnes de la pathologie et ne présentent aucun signe électrophysiologique infraclinique. Cependant, une surveillance neurologique pourrait détecter chez eux une apparition retardée des signes cliniques (Funalot et al, soumis). De plus, chez la souris l'inactivation d'un seul allèle *Krox20* ne perturbe pas le développement du SNP.

Enfin, ce variant n'est situé sur aucun des sites de liaison aux facteurs de transcription Sox10 et Oct6.

Si ce variant a réellement un effet inactivateur de la fonction enhancer de MSE, il serait caractérisé comme une mutation récessive or il n'a pas été détecté à l'état homozygote.

A l'inverse il serait intéressant de tester un effet gain de fonction de ce variant. Il a été démontré que la régulation de l'expression des gènes codant les protéines de myéline (notamment *PMP22*) est extrêmement fine. Une surexpression se traduit aussi par un défaut de myélinisation comme dans le cas de la duplication de *PMP22* dans les CMT1A. S'il était prouvé un tel effet dans notre cas, ce variant serait considéré comme une mutation dominante. Pour cela, il faudrait étudier les conséquences de ce variant sur la quantité des ARNm *Egr2* et de la protéine *Egr2* produits dans les CS d'un patient muté.

Afin de poursuivre l'analyse de la corrélation génotype-phénotype de ce nouveau variant, il serait intéressant d'étudier les parents des patients mutés, ainsi que la fréquence de ce variant chez une population contrôle, indemne de cette pathologie.

Pour avoir une idée de la prévalence globale d'anomalies concernant MSE telles qu'une délétion, il serait utile d'étudier un échantillon assez large de patients atteints de formes sévères de CMT démyélinisantes.

Le rendement diagnostique d'anomalies concernant MSE pourrait être sensiblement amélioré grâce à l'apport de l'histologie. En effet, l'étude histologique sur biopsie nerveuse est rarement réalisée depuis l'apparition des tests moléculaires. Elle est utile pour écarter un diagnostic différentiel de CMT dans les cas sporadiques, ainsi que dans les formes familiales lorsque les principales investigations génétiques n'ont pas été contributives (76). L'étude histologique pourrait ici s'avérer utile pour sensibiliser la recherche des atteintes de MSE dans les cas où la séquence codante d'*Egr2* n'est pas mutée. Elle permettrait de rechercher les stigmates histologiques d'une déficience pour *Egr2* en mettant en évidence un blocage des CS au stade promyélinisant, une quasi-absence de myéline, une hyperplasie des CS et une transgression de la frontière SNC/SNP par des cellules gliales centrales.

Dans les situations où aucune anomalie n'est détectée au niveau de MSE:

- il serait intéressant de se pencher sur les différents « partenaires » d'*Egr2* dans les situations évocatrices d'une dysfonction à son niveau. Les protéines Nab1 et Nab2 sont de bons candidats étant donné qu'ils sont des agonistes importants de son activité transcriptionnelle, stimulatrice comme inhibitrice, sur ses cibles. Oct6, de par sa position directement en amont d'*Egr2* est aussi une piste privilégiée.

- le rôle précis d'ISE, tout comme sa séquence, n'ont pas été caractérisés à ce jour. Etant donné que les périodes d'activation d'ISE et MSE se succèdent avec un très court overlapping, l'étude de la nature de leurs interactions pourrait permettre une meilleure compréhension de l'expression d'*Egr2*. Il est possible que ces deux enhanceurs s'antagonisent mutuellement: l'extinction d'ISE représenterait dans ce cas une condition obligatoire à l'activation de MSE, et sa suractivation aboutirait à une hypomyélinisation du SNP par inactivation d'*Egr2*.

**CONCLUSION**

Nos résultats chez la souris suggèrent fortement que le gène *Krox20* est soumis à une régulation post-transcriptionnelle au cours du développement du SNP chez la souris. En effet, l'analyse semi-quantitative des ARNm *Krox20* et des protéines *Krox20*, à E18,5 et P1, a confirmé l'existence d'un découplage entre leur cinétiques, révélant une régulation post-transcriptionnelle, d'abord négative jusqu'à la naissance, puis positive. Parmi les hypothèses sur le mécanisme de cette régulation, les enhancers ISE et MSE sont de bons candidats dans la mesure où leur activation est synchronisée avec les phases négative et positive de la régulation, respectivement. L'étude de la relation entre ISE/MSE et cette régulation mérite d'être poursuivie. Dans cette direction, l'étude de la structure du(des) ARNm *Krox20* observé(s) au cours du développement du SNP pourrait nous fournir des réponses intéressantes.

L'établissement formel d'une relation entre les 2 enhancers et la régulation post-transcriptionnelle de *Krox20* serait très intéressant. En effet, cela rendrait probable l'hypothèse selon laquelle la délétion homozygote de MSE entraîne une réactivation d'ISE, (de manière similaire à ce qui est observé au cours des expériences de dégénérescence Wallerienne dans les nerfs de souris (92)), et donc la transcription d'un ARNm soumis à une régulation post-transcriptionnelle négative.

La position centrale occupée par MSE dans la régulation d'*Egr2* nous a conduit à évaluer la pertinence de son exploration chez 76 patients atteints de CMT qui ne portent pas de mutation dans la séquence codante du gène.

Nous avons à cette occasion mis au point une technique d'analyse semi-quantitative de MSE fiable et reproductible.

L'analyse n'a montré aucune anomalie quantitative de MSE, mais a pu mettre en évidence un nouveau variant: une délétion ponctuelle de la base T en position 64,532,000 (GRCh37/hg19 ; Février 2009) à l'état hétérozygote, dont l'analyse de la corrélation génotype-phénotype reste à poursuivre, même si son caractère pathogène est peu probable.

L'introduction de MSE dans l'algorithme diagnostique des CMT démyélinisantes précoces et sévères pourrait améliorer le conseil génétique des familles touchées par cette pathologie. Elle pourrait aussi permettre d'approfondir la compréhension des interactions entre MSE et les autres acteurs de la régulation de l'expression d'*Egr2*, ouvrant la voie à des thérapeutiques ciblées ayant la capacité de moduler le niveau d'expression de ce gène clé.

Enfin, l'exemple du patient décédé de la neuropathie nous rappelle que l'analyse des seules régions codantes des gènes candidats de maladies héréditaires ne permet pas d'éviter des impasses diagnostiques.

**BIBLIOGRAPHIE**



1. Arroyo EJ, Scherer SS. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol.* 2000 Jan;113(1):1-18.
2. Eichberg J. Myelin P0: new knowledge and new roles. *Neurochem Res.* 2002 Nov;27(11):1331-40.
3. Shy ME, Jani A, Krajewski K, et al. Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain.* 2004 Feb;127(Pt 2):371-84.
4. Shy ME, Gabel CA, Vietorisz EC, et al. Characterization of oligosaccharides that bind to human anti-MAG antibodies and to the mouse monoclonal antibody HNK-1. *J Neuroimmunol.* 1986 Oct;12(4):291-8.
5. Martini R, Mohajeri MH, Kasper S, et al. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J Neurosci.* 1995 Jun;15(6):4488-95.
6. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Sep;63(17):1945-61.
7. Gow A, Friedrich VL, Jr., Lazzarini RA. Myelin basic protein gene contains separate enhancers for oligodendrocyte and Schwann cell expression. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(3):605-16.
8. Campagnoni AT, Pribyl TM, Campagnoni CW, et al. Structure and developmental regulation of Gollmbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain. *J Biol Chem.* 1993 Mar 5;268(7):4930-8.
9. Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, et al. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet.* 1995 Nov;11(3):274-80.
10. Fannon AM, Sherman DL, Ilyina-Gragerova G, et al. Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J Cell Biol.* 1995 Apr;129(1):189-202.
11. Blank WF, Jr., Bunge MB, Bunge RP. The sensitivity of the myelin sheath, particularly the Schwann cell-axolemmal junction, to lowered calcium levels in cultured sensory ganglia. *Brain Res.* 1974 Mar 8;67(3):503-18.
12. Tetzlaff W. Tight junction contact events and temporary gap junctions in the sciatic nerve fibres of the chicken during Wallerian degeneration and subsequent regeneration. *J Neurocytol.* 1982 Oct;11(5):839-58.
13. Poliak S, Matlis S, Ullmer C, et al. Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J Cell Biol.* 2002 Oct 28;159(2):361-72.
14. Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, et al. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci.* 1995 Dec;15(12):8281-94.
15. Neuhaus IM, Dahl G, Werner R. Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32. *Gene.* 1995 Jun 9;158(2):257-62.
16. Salzer JL, Holmes WP, Colman DR. The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol.* 1987 Apr;104(4):957-65.
17. Collins BE, Yang LJ, Mukhopadhyay G, et al. Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):1248-55.
18. May AP, Robinson RC, Vinson M, et al. Crystal structure of the N-terminal domain of sialoadhesin in complex with 3' sialyllactose at 1.85 Å resolution. *Mol Cell.* 1998 Apr;1(5):719-28.
19. Lai C, Watson JB, Bloom FE, et al. Neural protein 1B236/myelin-associated glycoprotein (MAG) defines a subgroup of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Rev.* 1987 Dec;100:129-51.
20. Kursula P, Tikkanen G, Lehto VP, et al. Calcium-dependent interaction between the large myelin-associated glycoprotein and S100beta. *J Neurochem.* 1999 Oct;73(4):1724-32.

21. Jaramillo ML, Afar DE, Almazan G, et al. Identification of tyrosine 620 as the major phosphorylation site of myelin-associated glycoprotein and its implication in interacting with signaling molecules. *J Biol Chem*. 1994 Nov 4;269(44):27240-5.
22. Gillespie CS, Sherman DL, Blair GE, et al. Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron*. 1994 Mar;12(3):497-508.
23. Dytrych L, Sherman DL, Gillespie CS, et al. Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J Biol Chem*. 1998 Mar 6;273(10):5794-800.
24. Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, et al. Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2001 Feb;68(2):325-33.
25. Srivastava S, Osten P, Vilim FS, et al. Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. *Neuron*. 1998 Sep;21(3):581-91.
26. Gillespie CS, Sherman DL, Fleetwood-Walker SM, et al. Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron*. 2000 May;26(2):523-31.
27. Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, et al. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron*. 2001 Jun;30(3):677-87.
28. Oguievetskaia K, Cifuentes-Diaz C, Girault JA, et al. [Cellular contacts in myelinated fibers of the peripheral nervous system]. *Med Sci (Paris)*. 2005 Feb;21(2):162-9.
29. Poliak S, Peles E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Dec;4(12):968-80.
30. Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*. 2003;4(3):207.
31. Sherman DL, Tait S, Melrose S, et al. Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron*. 2005 Dec 8;48(5):737-42.
32. Spencer T, Domeniconi M, Cao Z, et al. New roles for old proteins in adult CNS axonal regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2003 Feb;13(1):133-9.
33. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Sep;6(9):671-82.
34. Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, et al. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst*. 2008 Jun;13(2):122-35.
35. Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1861-7.
36. Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays*. 2000 Nov;22(11):987-96.
37. Scherer SS, Xu T, Crino P, et al. Ezrin, radixin, and moesin are components of Schwann cell microvilli. *J Neurosci Res*. 2001 Jul 15;65(2):150-64.
38. Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 1993 Oct;3(5):805-9.
39. Morris JK, Lin W, Hauser C, et al. Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron*. 1999 Jun;23(2):273-83.
40. Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, et al. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*. 2005 Sep 1;47(5):681-94.
41. Nave KA, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol*. 2006 Oct;16(5):492-500.
42. Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, et al. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol*. 2002 Jan 7;156(1):199-209.
43. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, et al. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol*. 2005 Feb 14;168(4):655-66.
44. Bermingham JR, Jr., Shearin H, Pennington J, et al. The claw paw mutation reveals a role for *Lgi4* in peripheral nerve development. *Nat Neurosci*. 2006 Jan;9(1):76-84.
45. D'Antonio M, Droggiti A, Feltri ML, et al. TGFbeta type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *J Neurosci*. 2006 Aug 16;26(33):8417-27.

46. Syroid DE, Maycox PJ, Soilu-Hanninen M, et al. Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. *J Neurosci.* 2000 Aug 1;20(15):5741-7.
47. Parkinson DB, Bhaskaran A, Droggiti A, et al. Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J Cell Biol.* 2004 Feb 2;164(3):385-94.
48. Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, et al. The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev.* 2003 Jun 1;17(11):1380-91.
49. Le N, Nagarajan R, Wang JY, et al. Analysis of congenital hypomyelinating *Egr2*<sup>Lo/Lo</sup> nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 15;102(7):2596-601.
50. Maurel P, Salzer JL. Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci.* 2000 Jun 15;20(12):4635-45.
51. Atanasoski S, Notterpek L, Lee HY, et al. The protooncogene *Ski* controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron.* 2004 Aug 19;43(4):499-511.
52. Bunge RP, Bunge MB, Bates M. Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination. *J Cell Biol.* 1989 Jul;109(1):273-84.
53. Martini R, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 1):2439-48.
54. Notterpek L, Tolwani RJ. Experimental models of peripheral neuropathies. *Lab Anim Sci.* 1999 Dec;49(6):588-99.
55. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, et al. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000 Jun;61(3):267-304.
56. Fu Q, Goodrum JF, Hayes C, et al. Control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells. *J Neurochem.* 1998 Aug;71(2):549-55.
57. Fewou SN, Bussow H, Schaeren-Wiemers N, et al. Reversal of non-hydroxy:alpha-hydroxy galactosylceramide ratio and unstable myelin in transgenic mice overexpressing UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase. *J Neurochem.* 2005 Jul;94(2):469-81.
58. Melendez-Vasquez CV, Einheber S, Salzer JL. Rho kinase regulates schwann cell myelination and formation of associated axonal domains. *J Neurosci.* 2004 Apr 21;24(16):3953-63.
59. Fernandez-Valle C, Gorman D, Gomez AM, et al. Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with Schwann cell myelination. *J Neurosci.* 1997 Jan 1;17(1):241-50.
60. Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, et al. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science.* 2004 Apr 30;304(5671):700-3.
61. Tolwani RJ, Cosgaya JM, Varma S, et al. BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res.* 2004 Sep 1;77(5):662-9.
62. Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM, et al. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron.* 2004 Jul 22;43(2):183-91.
63. Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Sep;6(9):683-90.
64. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature.* 1994 Oct 27;371(6500):796-9.
65. Nagarajan R, Svaren J, Le N, et al. *EGR2* mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron.* 2001 May;30(2):355-68.
66. Parkinson DB, Dickinson S, Bhaskaran A, et al. Regulation of the myelin gene periaxin provides evidence for Krox-20-independent myelin-related signalling in Schwann cells. *Mol Cell Neurosci.* 2003 May;23(1):13-27.
67. Jang SW, LeBlanc SE, Roopra A, et al. In vivo detection of *Egr2* binding to target genes during peripheral nerve myelination. *J Neurochem.* 2006 Sep;98(5):1678-87.

68. Jang SW, Srinivasan R, Jones EA, et al. Locus-wide identification of Egr2/Krox20 regulatory targets in myelin genes. *J Neurochem*. 2010 Dec;115(6):1409-20.
69. Jang SW, Svaren J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem*. 2009 Jul 24;284(30):20111-20.
70. Taveggia C, Pizzagalli A, Fagiani E, et al. Characterization of a Schwann cell enhancer in the myelin basic protein gene. *J Neurochem*. 2004 Nov;91(4):813-24.
71. LeBlanc SE, Ward RM, Svaren J. Neuropathy-associated Egr2 mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by Egr2 and Sox10. *Mol Cell Biol*. 2007 May;27(9):3521-9.
72. Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, et al. Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem*. 2005 May;93(3):737-48.
73. Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, et al. Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J Neurosci*. 2006 Sep 20;26(38):9771-9.
74. Couplier F, Decker L, Funalot B, et al. Krox20 inactivation in the PNS leads to CNS/PNS boundary transgression by central glia. *Rev Neurol (Paris)*. 2011 Jan;167(1):51-6.
75. Vallat JM, Grid D, Magdelaine C, et al. Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2004 Sep;4(5):413-9.
76. Pareyson D, Marchesi C. Natural history and treatment of peripheral inherited neuropathies. *Adv Exp Med Biol*. 2009;652:207-24.
77. Meyer Zu Horste G, Nave KA. Animal models of inherited neuropathies. *Curr Opin Neurol*. 2006 Oct;19(5):464-73.
78. Bellone E, Di Maria E, Soriani S, et al. A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum Mutat*. 1999 Oct;14(4):353-4.
79. Timmerman V, De Jonghe P, Van Broeckhoven C. Report of the 8th annual symposium of the European Charcot-Marie-Tooth Consortium, Antwerpen, Belgium, July 2-4, 1999. *J Peripher Nerv Syst*. 1999;4(3-4):279-304.
80. Warner LE, Mancias P, Butler IJ, et al. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet*. 1998 Apr;18(4):382-4.
81. Mikesova E, Huhne K, Rautenstrauss B, et al. Novel EGR2 mutation R359Q is associated with CMT type 1 and progressive scoliosis. *Neuromuscul Disord*. 2005 Nov;15(11):764-7.
82. Pareyson D, Taroni F, Botti S, et al. Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology*. 2000 Apr 25;54(8):1696-8.
83. Yoshihara T, Kanda F, Yamamoto M, et al. A novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with late-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Sci*. 2001 Mar 1;184(2):149-53.
84. Musso M, Balestra P, Bellone E, et al. The D355V mutation decreases EGR2 binding to an element within the Cx32 promoter. *Neurobiol Dis*. 2001 Aug;8(4):700-6.
85. Arthur-Farraj P, Mirsky R, Parkinson DB, et al. A double point mutation in the DNA-binding region of Egr2 switches its function from inhibition to induction of proliferation: A potential contribution to the development of congenital hypomyelinating neuropathy. *Neurobiol Dis*. 2006 Oct;24(1):159-69.
86. Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, et al. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet*. 1999 Jul;8(7):1245-51.
87. Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, et al. Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology*. 1999 Jun 10;52(9):1827-32.
88. Swirnoff AH, Apel ED, Svaren J, et al. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol*. 1998 Jan;18(1):512-24.
89. Desmazieres A, Decker L, Vallat JM, et al. Disruption of Krox20-Nab interaction in the mouse leads to peripheral neuropathy with biphasic evolution. *J Neurosci*. 2008 Jun 4;28(23):5891-900.

90. Svaren J, Meijer D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1541-51.
91. Murphy P, Topilko P, Schneider-Maunoury S, et al. The regulation of Krox-20 expression reveals important steps in the control of peripheral glial cell development. *Development*. 1996 Sep;122(9):2847-57.
92. Ghislain J, Desmarquet-Trin-Dinh C, Jaegle M, et al. Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon-dependent regulation of Krox20 during Schwann cell development. *Development*. 2002 Jan;129(1):155-66.
93. Zorick TS, Syroid DE, Arroyo E, et al. The Transcription Factors SCIP and Krox-20 Mark Distinct Stages and Cell Fates in Schwann Cell Differentiation. *Mol Cell Neurosci*. 1996 Aug;8(2/3):129-45.
94. Bermingham JR, Jr., Scherer SS, O'Connell S, et al. Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev*. 1996 Jul 15;10(14):1751-62.
95. Zorick TS, Syroid DE, Brown A, et al. Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development*. 1999 Apr;126(7):1397-406.
96. Ryu EJ, Wang JY, Le N, et al. Misexpression of Pou3f1 results in peripheral nerve hypomyelination and axonal loss. *J Neurosci*. 2007 Oct 24;27(43):11552-9.
97. Monuki ES, Weinmaster G, Kuhn R, et al. SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron*. 1989 Dec;3(6):783-93.
98. Monk KR, Naylor SG, Glenn TD, et al. A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science*. 2009 Sep 11;325(5946):1402-5.
99. Schreiner S, Cossais F, Fischer K, et al. Hypomorphic Sox10 alleles reveal novel protein functions and unravel developmental differences in glial lineages. *Development*. 2007 Sep;134(18):3271-81.
100. Ghislain J, Charnay P. Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep*. 2006 Jan;7(1):52-8.
101. Inoue K, Shilo K, Boerkoel CF, et al. Congenital hypomyelinating neuropathy, central dysmyelination, and Waardenburg-Hirschsprung disease: phenotypes linked by SOX10 mutation. *Ann Neurol*. 2002 Dec;52(6):836-42.
102. Reiprich S, Kriesch J, Schreiner S, et al. Activation of Krox20 gene expression by Sox10 in myelinating Schwann cells. *J Neurochem*. 2010 Feb;112(3):744-54.
103. Kao SC, Wu H, Xie J, et al. Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science*. 2009 Jan 30;323(5914):651-4.
104. Blugeon C, Le Crom S, Richard L, et al. Dok4 is involved in Schwann cell myelination and axonal interaction in vitro. *Glia*. 2011 Mar;59(3):351-62.
105. Ebersole TA, Chen Q, Justice MJ, et al. The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins. *Nat Genet*. 1996 Mar;12(3):260-5.
106. Larocque D, Fragoso G, Huang J, et al. The QKI-6 and QKI-7 RNA binding proteins block proliferation and promote Schwann cell myelination. *PLoS One*. 2009;4(6):e5867.
107. Nabel-Rosen H, Volohonsky G, Reuveny A, et al. Two isoforms of the Drosophila RNA binding protein, how, act in opposing directions to regulate tendon cell differentiation. *Dev Cell*. 2002 Feb;2(2):183-93.
108. Larocque D, Pilotte J, Chen T, et al. Nuclear retention of MBP mRNAs in the quaking viable mice. *Neuron*. 2002 Dec 5;36(5):815-29.
109. Pereira JA, Baumann R, Norrmen C, et al. Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity. *J Neurosci*. 2010 May 12;30(19):6763-75.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>I) DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE DES VERTEBRES</b> .....	<b>20</b>
<b>A) Présentation générale du système nerveux périphérique</b> .....	<b>21</b>
1) Description anatomique du système nerveux périphérique .....	21
2) Architecture des nerfs périphériques .....	26
3) Aspects fonctionnels et structuraux des fibres myélinisées .....	28
4) Organisation de la région nodale .....	40
5) Contacts axogliaux au niveau des fibres myélinisées.....	41
<b>B) Développement des cellules de Schwann</b> .....	<b>43</b>
1) Les cellules de Schwann sont originaires des crêtes neurales, et leur survie et leur maturation dépendent de signaux axonaux.....	43
a) Les cellules de Schwann .....	43
b) Les signaux régulant la survie et la différenciation des cellules de Schwann .....	46
2) Les différentes étapes de la myélinisation .....	49
a) Mécanismes moléculaires préparant à la myélinisation.....	49
b) La formation de la gaine de myéline .....	52
<b>C) Rôle de <i>Krox20/Egr2</i> dans le processus de myélinisation</b> .....	<b>58</b>
1) Structure et fonction de <i>Krox20</i> .....	58
2) Des mutations ponctuelles de <i>Krox20</i> ont été identifiées dans des neuropathies humaines héréditaires.....	64
3) Régulation de l'expression de <i>Krox20</i> .....	74
a) Profil d'expression de <i>Krox20</i> .....	74
b) Séquences cis-régulatrices de <i>Krox20</i> dans les cellules de Schwann.....	75
c) Facteurs de transcription régulant l'expression du gène <i>Krox20</i> .....	77
<b>II) PROBLEMATIQUE</b> .....	<b>85</b>
<b>III) MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>90</b>
<b>A) Prélèvement des nerfs sciatiques de souris</b> .....	<b>91</b>
<b>B) RT-PCR des ARNm <i>Krox20</i></b> .....	<b>91</b>
1) Extraction des ARN .....	91
2) Rétrotranscription .....	92
3) PCR semi-quantitative des ADNc <i>Krox20</i> .....	94

4)	Analyse qualitative des ARNm <i>Krox20</i> .....	96
C)	Western Blot de <i>Krox20</i> .....	98
D)	Echantillons humains.....	99
1)	Amplification de MSE par PCR et séquençage.....	100
2)	Analyse semi-quantitative de MSE .....	103
IV)	RESULTATS .....	105
A)	Semi-quantification des ARNm <i>Krox20</i> par RT-qPCR à E18,5, P1 et P9 chez la souris .....	106
B)	Semi-quantification des protéines <i>Krox20</i> par Western Blot à E18,5 et P1 chez la souris...108	
C)	Analyse qualitative des ARNm <i>Krox20</i> chez la souris.....	112
D)	Séquençage de MSE sur les ADN génomiques de 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth .....	115
E)	Semi-quantification de MSE sur les ADN génomiques de 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth .....	117
V)	DISCUSSION.....	121
A)	Utilité d'une régulation post-transcriptionnelle de <i>Krox20</i> .....	122
B)	Leviers de la régulation post-transcriptionnelle de <i>Krox20</i> pouvant aboutir au découplage observé entre l'ARNm et la protéine chez la souris .....	123
C)	Exploration moléculaire du découplage entre les ARNm <i>Krox20</i> et la protéine <i>Krox20</i> .....	123
1)	Cas où les ARNm <i>Krox20</i> subissent une modification de leur structure.....	124
2)	Cas où la structure des ARNm <i>Krox20</i> reste inchangée.....	124
D)	Acteurs candidats de la régulation post-transcriptionnelle de <i>Krox20</i> .....	125
1)	Les enhanceurs ISE et MSE .....	125
2)	Les protéines Quaking .....	126
3)	Les microARN .....	127
E)	Analyse qualitative et quantitative de MSE chez 76 patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth .....	128
	CONCLUSION.....	132
	BIBLIOGRAPHIE.....	135



## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schema de la moelle épinière avec les composants moteurs, sensitifs et autonomes du système nerveux périphérique (d'après l'Atlas de Neurosciences humaines de Netter).....	25
Figure 2: Architecture des nerfs périphériques: Représentation schématique d'une coupe transversale d'un nerf rachidien (d'après le cours d'histologie du Pr Daniel Balas, Université Sophia Antipolis, Nice). .....	27
Figure 3: Représentation des différentes phases d'un potentiel d'action (d'après Chantal Proulx, Cours Pharmacie.com.). .....	29
Figure 4: Ultrastructure d'une fibre myélinisée du système nerveux périphérique chez une souris âgée de quatre jours, au microscope électronique à transmission (d'après (1)). .....	30
Figure 5: Organisation de la myéline compacte et non compacte, vue en microscopie électronique puis schématisée (d'après (28)). .....	38
Figure 6: Organisation moléculaire des interactions gliales autotypiques et de la connexion entre la cellule gliale et la lame basale, dans le système nerveux périphérique (d'après (28)).....	39
Figure 7: Vision schématique d'un axone myélinisé dans le SNP (d'après(1)).....	42
Figure 8: Le lignage des cellules de Schwann.....	46
Figure 9: Les différentes isoformes de la Neuréguline 1: disposition membranaire et signalisation (d'après (41)). .....	48
Figure 10: Modification de l'expression de marqueurs moléculaires lorsque les cellules de Schwann immatures se différencient en cellules de Schwann matures myélinisantes et non-myélinisantes (d'après (34)). .....	52
Figure 11: Classification des différentes formes de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth avec les différents gènes impliqués (d'après (76)). .....	66
Figure 12: Représentation schématique des différentes mutations de <i>Krox20</i> associées à des neuropathies humaines héréditaires (d'après (89)). .....	74
Figure 13: Illustration schématique du gène <i>Krox20</i> et des deux enhanceurs actifs connus dans les cellules de Schwann, ISE et MSE.. .....	76
Figure 14: Isolement de MSE dans un élément conservé de 1,3kb (d'après (91)).....	77
Figure 15: L'alignement des séquences humaines et de poulet à la séquence murine de MSE montre plusieurs sites conservés de liaison à des facteurs de transcription (d'après (99)). .....	81
Figure 16: Représentation schématique du réseau de régulation des gènes de myéline (d'après (89)). .....	82
Figure 17: Cartographie de la délétion de 11kb, emportant la totalité de MSE, observée chez le patient index à l'état homozygote, et chez ses deux parents à l'état hétérozygote .....	84
Figure 18: Illustration schématique du décalage observé entre l'activation du locus <i>Krox20</i> et la détection de la protéine <i>Krox20</i> par immunohistochimie. Vision synoptique et comparée de l'activation du locus <i>Krox20</i> , la détection de sa protéine par IHC, la myélinisation du SNP, et l'activation des deux enhanceurs ISE et MSE au cours du temps. ....	89
Figure 19: Cartographie des amorces utilisées pour la quantification des ARNm <i>Krox20</i> .....	96

Figure 20: Cartographie des amorces utilisées pour l'analyse qualitative des ARNm <i>Krox20</i> . ....	98
Figure 21: Histogramme représentant les résultats de la RT-PCR semi-quantitative des ARNm <i>Krox20</i> après normalisation avec la GAPDH et la $\beta$ -tubuline. ....	108
Figure 22: Western Blot marquant la protéine Krox20 dans des nerfs sciatiques de souris aux stades E18,5 et P1.....	111
Figure 23: Représentation des cinétiques d'évolution des ARNm <i>Krox20</i> et de la protéine Krox20 sur un graphique à deux axes en ordonnées .....	112
Figure 24: Electrophorégramme montrant la séquence nucléotidique d'un patient porteur de la délétion ponctuelle d'une thymine en position 64,532,000 (Nomenclature UCSC Genome Browser GRCh37/hg19 de Février 2009) à l'état hétérozygote au niveau de MSE.....	116
Figure 25: Electrophorégrammes représentant le fragment de référence (premier pic: 1138pb) et MSE (deuxième pic: 1218pb).....	119

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification des maladies de Charcot-Marie-Tooth par type et sous-types en fonction du mode de transmission de la maladie et des critères électrophysiologiques .....	67
Tableau 2: Liste des mutations connues dans la séquence codante d' <i>Egr2</i> avec les phénotypes correspondants. ....	70
Tableau 3: Dosage et contrôle de la qualité des ARN extraits de nerfs sciatiques de souris, à E18,5, P1, et P9.....	92
Tableau 4: Protocole de rétrotranscription des ARNm avec le kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen).....	94
Tableau 5: Protocole de qPCR des ADNc <i>Krox20</i> . ....	95
Tableau 6: Protocole de PCR qualitative des ADNc <i>Krox20</i> . ....	97
Tableau 7: Protocole de PCR du fragment MSE. ....	101
Tableau 8: Protocole de la réaction de séquence de MSE avec le kit BigDye Terminator.....	102
Tableau 9: Protocole de la PCR semi-quantitative de MSE par rapport à l'exon 5 de <i>PMP22</i> , avec des amorces marquées, en vue d'une analyse de fragment sur gel de séquenceur capillaire. ....	104
Tableau 10: Résultats de la PCR semi-quantitative de <i>Krox20</i> et normalisation avec la GAPDH et la $\beta$ -tubuline .....	107
Tableau 11: Evaluation de la PCR semi-quantitative de MSE sur 3 patients témoins (délétion hétérozygote de MSE) et 3 contrôles (non délétés) .....	118

## 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.

---

Les neuropathies de Charcot-Marie-Tooth regroupent un ensemble hétérogène de neuropathies héréditaires, parfois mortelles, dont la prévalence globale est de 1/2500 dans la population générale. On distingue classiquement les formes démyélinisantes des formes axonales. Parmi les nombreux gènes impliqués dans les formes démyélinisantes, *Krox20/Egr2* est un régulateur central du processus de myélinisation par les cellules de Schwann.

Notre travail fait suite à la découverte, chez un nourrisson décédé d'une neuropathie amyélinisante congénitale, d'un déficit en *Egr2* dans les cellules de Schwann secondaire à la délétion homozygote d'une séquence « enhancer »: Myelinating Schwann cell Element (MSE). Deux hypothèses s'affrontent pour expliquer le phénotype observé: la délétion de MSE empêcherait toute transcription d'*Egr2* dans les cellules de Schwann, ou bien elle induirait la réactivation de l'« enhancer » ISE (Immature Schwann cell Element), gouvernant la transcription d'un ARNm soumis à une régulation post-transcriptionnelle négative.

Nous avons prouvé chez la souris l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de *Krox20* qui est rattachable à l'activation de ces 2 enhancers, sur des arguments de simultanéité. Ces résultats rendent plausible la deuxième hypothèse permettant d'expliquer le phénotype pathologique du patient index.

Nous avons ensuite exploré MSE sur un échantillon de 76 patients dont la séquence codante du gène *Egr2* n'est pas mutée. Nous avons à cette occasion mis au point une technique reproductible de PCR semi-quantitative de MSE. Nous avons également identifié un nouveau variant dans sa séquence, à l'état hétérozygote, chez 5 patients non apparentés, dont l'analyse de la corrélation génotype-phénotype est en cours.

L'exploration de MSE sur une large population permettrait d'améliorer le diagnostic moléculaire et le conseil génétique des familles dans les formes sévères de CMT démyélinisantes, en identifiant de nouvelles mutations. Ce travail nous rappelle enfin que le diagnostic génétique ne doit pas se limiter à l'analyse des seules régions codantes du génome.

---

## STUDY OF THE INVOLVEMENT OF CIS-REGULATORY SEQUENCES OF *Egr2/Krox20* GENE IN DEMYELINATING FORMS OF CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASES

---

Charcot-Marie-Tooth diseases include a heterogeneous group of hereditary neuropathies, sometimes fatal, the overall prevalence is about 1/2500 in the general population. Are conventionally distinguished demyelinating forms from axonal ones. Among the many genes involved in the demyelinating forms, *Krox20/Egr2* is a central regulator of myelination by Schwann cells.

Our work follows the discovery in an infant died of congenital amyelinating neuropathy, of an *Egr2* deficiency in Schwann cells, secondary to homozygous deletion of a enhancer sequence named Myelinating Schwann cell Element (MSE). Two hypotheses may explain the observed phenotype: deletion of MSE would prevent any transcription of *Egr2* in Schwann cells, or it would lead to the reactivation of the ISE enhancer (Immature Schwann cell Element), which would govern transcription of an mRNA subject to negative post-transcriptional regulation.

We have put in evidence a post-transcriptional regulation of *Krox20* in mice, which could be linked to the activation of these two enhancers, on arguments of simultaneity. These results make plausible the second hypothesis to explain the pathological phenotype of the patient.

We then explored MSE in 76 patients whom the *Krox20* gene coding sequence is not mutated. On this occasion we developed a reproducible technique semi-quantitative PCR of MSE. We have also identified a new heterozygous variant in its sequence in five unrelated patient, whose analysis of genotype-phenotype correlation is in progress.

The exploration of MSE on a large population would improve the molecular diagnosis and genetic counseling of families in severe forms of demyelinating CMT, by identifying new mutations. Finally, this work reminds us that genetic diagnosis should not be limited to analyzing only the coding regions of the genome.

---

Doctorat de médecine, biologie médicale (spécialité Génétique)

---

Mots clés: myéline, Charcot-Marie-Tooth, *Egr2/Krox20*, myelinating schwann cell element, régulation post-transcriptionnelle, délétion, variant

---

Service de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France

