



HAL
open science

Etude des interactions de la protéine PMP22 avec les intégrines dans la pathogénie de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A

Maxime Jouaud

► **To cite this version:**

Maxime Jouaud. Etude des interactions de la protéine PMP22 avec les intégrines dans la pathogénie de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0096 . tel-01665810

HAL Id: tel-01665810

<https://theses.hal.science/tel-01665810v1>

Submitted on 17 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ECOLE DOCTORALE Biologie-Santé n°524

Equipe d'accueil n°6309 : Maintenance myélinique et neuropathies périphériques

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue par

Maxime Jouaud

Le 16 décembre 2016

**Etude des interactions de la protéine PMP22
avec les intégrines dans la pathogénie
de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A**

Thèse dirigée par le Professeur Franck Sturtz et par le Docteur Anne-Sophie Lia

Rapporteurs

Dr. Jean-Claude Monboisse, MCU-PH, Service de Biochimie, Université de Reims

Dr. Frédéric Favreau, MCU-PH, Service de Biochimie, CHU de Poitiers

Examineurs

Pr. Franck Sturtz, PU-PH, EA6309, Université de Limoges

Dr. Anne-Sophie Lia, MCU-PH, EA6309, Université de Limoges

Pr. Benoît Funalot, PU-PH, Département de Génétique, CHU Henri-Mondor

Pr. Laurent Magy, PU-PH, EA6309, Université de Limoges

À Raphaël et Etienne,

Remerciements

Ce doctorat de trois ans n'a pas été un travail solitaire. J'ai appris et été soutenu en de nombreuses occasions et par un grand nombre de personnes, sans qui ce travail de recherche n'existerait pas.

Je tiens donc à remercier, dans un premier temps, tous les membres du jury d'avoir accepté de juger cette thèse, qui, je l'espère, aura su éveiller son intérêt. Soyez assurés de mon profond respect.

Je remercie également mes deux rapporteurs, monsieur le Docteur Jean-Claude Monboisse et monsieur le Docteur Frédéric Favreau d'avoir bien voulu accepter d'évaluer ce travail. Merci également d'accepter de le juger aujourd'hui. Soyez assurés de ma reconnaissance.

Un grand merci, aussi, à ceux qui m'ont encadré, et je sais que cette tâche n'a pas été toujours évidente.

Je tiens à remercier très chaleureusement le professeur Benoît Funalot qui a permis l'initialisation de ce projet, et qui malgré son départ, a toujours été présent pour moi en tant que soutien ou en tant que conseiller. Merci d'avoir conclu ce projet en acceptant la présidence du jury, c'est pour moi un honneur et un plaisir.

Mes remerciements très sincères à madame le Docteur Anne-Sophie Lia qui m'a accompagné et guidé avec patience tout au long de ce travail. Un grand merci pour m'avoir appris la rigueur dans la rédaction et le travail scientifique. Je suis arrivé auprès de toi en tant que néophyte concernant beaucoup de sujets, merci de m'avoir fait grandir.

Je remercie chaleureusement monsieur le professeur Franck Sturtz, pour la confiance qu'il m'a accordée. Merci pour tous ces moments d'échanges lors de l'écriture de mes thèse et articles, ils m'ont énormément apporté dans mon cheminement parfois laborieux.

Un grand merci à ceux qui ont su m'enseigner ce qu'ils savaient tout au long de ces trois ans. Je pense tout particulièrement à madame le docteur Laurence Richard pour sa bonne humeur et son expertise en microscopie électronique, à madame Claire Carrion pour sa gentillesse et son accompagnement en microscopie confocale et à monsieur le Professeur Jean-Michel Vallat pour m'avoir permis de collaborer avec lui au cours d'études passionnantes.

Une pensée à Chloë en rappel de nos soutiens mutuels et nos échanges. Je ne l'oublierai pas.

Merci à tous mes collègues et amis qui ont été un soutien moral et technique sans faille tout au long de ces 3 ans.

Merci à tous pour votre confiance.

Merci à toute l'équipe EA6309, à tous mes collaborateurs du service de neurologie et de l'animalerie.

Je remercie aussi tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à l'accomplissement de mon travail. Ces années ont été ponctuées de superbes rencontres et de vrais moments de partage.

Et enfin merci à ma famille et plus particulièrement mon épouse, qui a, plus que jamais su me témoigner son soutien et son amour.

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne :

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
DROITS D'AUTEURS	4
SOMMAIRE	5
INTRODUCTION	7
SITUATION DU PROBLEME ET ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	10
<i>CHAPITRE 1. SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE ET CMT1A</i>	11
1.1. Le système nerveux périphérique	11
1.2. Structure générale du nerf périphérique	13
1.3. Les composants des nerfs périphériques	16
1.4. Les constituants moléculaires de la gaine de myéline	25
1.5. La dynamique de la myéline	29
<i>CHAPITRE 2. PMP22</i>	34
2.1. Le gène PMP22	34
2.2. Epissage alternatif de PMP22	35
2.3. La protéine PMP22	35
2.4. Les interactions de PMP22	39
2.5. Les pathologies du système nerveux périphérique liées à la protéine PMP22	40
2.6. Les modèles animaux de neuropathies impliquant PMP22	45
<i>CHAPITRE 3. LES INTEGRINES</i>	51
3.1. Généralités sur les intégrines	51
3.2. Les intégrines dans le SNP	55
3.3. Les intégrines liées à des désordres du SNP	61
<i>CHAPITRE 4. INTERACTION DE PMP22 AVEC LES INTEGRINES</i>	64
4.1. Les souris déficientes en PMP22 présentent une myélinisation retardée et une altération des interactions entre les CS et la lame basale	65
4.2. Une diminution de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ dans le nerf sciatique des souris déficientes en PMP22	65
4.3. PMP22 est en complexe avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et les laminines.	65
4.4. PMP22 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans l'initialisation de la myélinisation	66
<i>CHAPITRE 5. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE</i>	68
PARTIE EXPERIMENTALE	69
<i>ARTICLE 1 : PMP22 OVEREXPRESSION IS ASSOCIATED WITH A SHIFT FROM $\alpha 6\beta 4$ TOWARD $\alpha 6\beta 1$ INTEGRIN EXPRESSION IN CMT1A RATS</i>	70
Avant-propos de l'article 1	71
Discussion concernant l'article 1	94
<i>ARTICLE 2 : CONGENITAL HYPOMYELINATING NEUROPATHY DUE TO THE ASSOCIATION OF A TRUNCATING MUTATION IN PMP22 WITH THE CLASSICAL HNPP DELETION.</i>	95
Avant-propos de l'article 2	96
Discussion concernant l'article 2	103
<i>ARTICLE 3 : RODENT MODELS WITH ALTERED EXPRESSION OF PMP22 RELEVANCE TO DEMYELINATING CMT AND HNPP</i>	104
Avant-propos de l'article 3	105
Discussion concernant l'article 3	141
<i>ARTICLE 4 : STRUCTURAL ELUCIDATION OF THE CALCIUM-SENSING RECEPTOR EXTRACELLULAR DOMAIN: 3D MAPPING OF MUTATION OBSERVED IN HYPER- AND HYPOCALCEMIC PATIENTS</i>	142
Avant-propos de l'article 4	143
Discussion concernant l'article 4	181
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	183
<i>CHAPITRE 1. ETUDE DE PMP22 ET DES INTEGRINES SUR UN MODELE ANIMAL</i>	184
1.1. Le modèle de rats CMT1A	184
1.2. La difficulté d'obtenir des animaux homozygotes	185
1.3. Interaction de PMP22 avec les intégrines	187
1.4. Utilisation d'autres modèles	194
<i>CHAPITRE 2. A PARTIR DU MODELE TRIDIMENSIONNEL DE PMP22</i>	196

2.1. Une cartographie des mutations de PMP22.....	196
2.2. Ajout d'une membrane lipidique au modèle tridimensionnel de PMP22.....	197
2.3. Autre utilisation de ce modèle	199
<i>CHAPITRE 3. VERS DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (IPS) DE RATS CMT1A ET DE PATIENTS CMT1A.....</i>	<i>202</i>
3.1. Modèles cellulaires utilisés dans l'étude du CMT1A	202
3.2. Le modèle cellulaire à partir de cellules souches pluripotentes induites.....	202
CONCLUSION.....	204
BIBLIOGRAPHIE	207
ANNEXES	219
TABLE DES ILLUSTRATIONS	242
TABLE DES TABLEAUX	244

Introduction

Introduction

Le système nerveux périphérique (SNP) est une partie du système nerveux composée des ganglions et des nerfs à l'extérieur du cerveau et de la moelle épinière. Les nerfs périphériques relient les organes du corps (dont les muscles) au système nerveux central (moelle épinière et cerveau). C'est par eux que l'information circule. Ces nerfs peuvent être moteurs (transmettant l'ordre aux muscles de se contracter), sensitifs (transmettant les sensations de toucher, chaleur, position du corps jusqu'au système nerveux central) ou mixtes (sensitifs et moteurs). La connaissance en anatomie du système nerveux périphérique a permis la compréhension des divers processus pathologiques, qui peuvent léser ce système nerveux à chacun des niveaux qui le constituent et qui conduisent à différents types de neuropathies.

Le phénotype le plus fréquent est une neuropathie démyélinisante héréditaire, de transmission autosomique dominante, dite CMT1 (Charcot-Marie-Tooth de type 1). Elle se manifeste par une force musculaire diminuée et une fonte des muscles au niveau des extrémités des jambes (pieds et mollets) et plus tardivement, des mains et des avant-bras. Des troubles de l'équilibre et une diminution de la sensibilité (au toucher, à la chaleur, au froid...) au niveau des pieds et des mains sont aussi possibles. La CMT1 débute la plupart du temps dans l'enfance ou chez le jeune adulte par des difficultés à la marche ou des déformations des pieds. La CMT1 est de forme démyélinisante, c'est-à-dire que la neuropathie trouve son origine dans l'altération de la gaine de myéline, qui joue un rôle d'isolant autour de l'axone permettant l'augmentation de la vitesse de l'influx nerveux.

La forme de CMT1 la plus fréquente est la CMT1A, impliquant le gène *PMP22*. Elle représente 30 % des personnes atteintes de CMT qui concerne 1 personne sur 2500, soit environ 30 000 personnes en France. La CMT1A se transmet de façon autosomique dominante. Elle est provoquée par une duplication du gène *PMP22*. Ce même gène, lorsqu'il est délété, va entraîner une neuropathie héréditaire avec une hypersensibilité à la pression (HNPP) qui est une neuropathie sensitivomotrice, héréditaire, focale et récurrente. Les symptômes cliniques classiques sont une hypersensibilité à la pression transitoire sans douleur, mais avec des symptômes de déficits moteurs et sensoriels au niveau d'un seul nerf ou du plexus brachial. Ces symptômes peuvent être accompagnés de faiblesses et d'atrophies musculaires. La plupart des épisodes sont précédés par une petite compression directe du nerf qui est affecté, ou bien par un croisement prolongé des jambes. Une mutation ponctuelle sur le gène *PMP22* va, quant à elle, entraîner soit une HNPP, soit un CMT1 sévère.

La protéine PMP22 est une glycoprotéine avec un rôle supposé primordial dans la myéline du système nerveux périphérique. Sa mauvaise expression peut entraîner les neuropathies citées précédemment. Cependant, la fonction exacte de la protéine PMP22 dans la membrane des cellules de Schwann (SC) est encore mal connue. Les observations faites chez les patients ou les animaux modèles suggèrent une implication de PMP22 dans la formation de la myéline, sa maintenance et sa stabilité. Cependant, peu de partenaires d'interaction de la protéine PMP22 ont été mis en évidence. En 2006, Amici et ses collaborateurs ont montré que la protéine PMP22 était, chez un individu sain, fixée sur le l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. Les intégrines sont des protéines ayant des fonctions de récepteurs de surface, permettant l'adhérence des cellules avec d'autres cellules ou avec la matrice extracellulaire. Toutes les intégrines sont présentes sous forme d'hétérodimères $\alpha\beta$. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ joue un rôle important dans la différenciation des CS et dans la myélinisation. Elle interagit avec des constituants de la matrice extracellulaire tels que les laminines.

Plusieurs questions se posaient alors concernant l'expression de la protéine PMP22 chez les patients / animaux modèles ayant des anomalies d'expression de PMP22 et le comportement des intégrines lors de la sur-expression de la protéine PMP22 chez les patients CMT1A.

Pour toutes ces raisons, il nous est apparu intéressant d'étudier l'interaction de PMP22 avec les différentes intégrines afin de mettre en évidence un rôle éventuel de ces protéines dans la physiopathologie de la maladie de Charcot Marie Tooth de type 1A.

Après la partie bibliographique rappelant les particularités du SNP, de la protéine PMP22 et des intégrines, nous présenterons nos travaux montrant l'impact de la sur-expression de PMP22 sur les intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ dans les nerfs périphériques de rats.

Situation du problème et étude bibliographique

Chapitre 1. Système nerveux périphérique et CMT1A

1.1. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux est un acteur important dans les événements de communication et de régulation des signaux de l'organisme. Conjointement au système endocrinien, il régule et maintient l'homéostasie corporelle. Contrairement au système endocrinien qui achemine lentement son message aux effecteurs par l'intermédiaire d'hormones sécrétées dans le sang, le système nerveux fait appel à des signaux électriques rapides et spécifiques qui entraînent, dans la majorité des cas, des réponses immédiates via les effecteurs glandulaires ou musculaires.

Le système nerveux fonctionne généralement en trois temps.

Premièrement, il recueille les fluctuations de l'information sensorielle de l'organisme, engendrées par des modifications corporelles internes et externes, acheminées par l'intermédiaire de millions de récepteurs sensoriels qui sont retrouvés à l'intérieur du système nerveux périphérique.

Deuxièmement, il intègre ces messages au niveau du système nerveux central afin de déterminer les changements à apporter.

Troisièmement, il fournit une réponse motrice pour activer les différents effecteurs (muscles ou glandes) et restaurer l'homéostasie.

Du point de vue anatomique, le système nerveux est divisé en deux composantes principales. Le système nerveux central (SNC) (en rouge sur la Figure 1), qui comprend l'encéphale et la moelle épinière, et le système nerveux périphérique (SNP) (en bleu sur la Figure 1) qui, situé à l'extérieur de la cavité crânienne et du canal rachidien, est constitué des nerfs issus de ces premières structures.

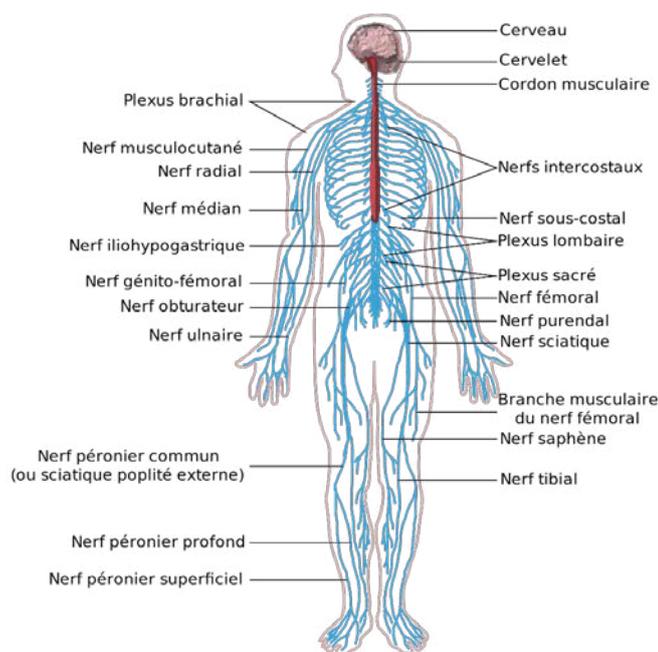


Figure 1 : Représentation schématique du système nerveux

Le SNP est classiquement divisé en deux ensembles fonctionnels : le système nerveux autonome, qui contrôle les fonctions végétatives et le système nerveux somatique, qui contrôle les fonctions conscientes. Le SNP autonome, également nommé le système nerveux viscéral, involontaire ou végétatif, innerve les organes internes, les vaisseaux sanguins et les glandes. Comme son nom l'indique, il régule les fonctions végétatives (Figure 2). Ainsi, ses actions s'opèrent de façon involontaire

et plus ou moins consciente. Les fibres sensorielles autonomes transmettent des informations concernant des fonctions végétatives, telles la fréquence cardiaque ou le taux d'oxygène dans le sang vers le SNC. Les fibres motrices autonomes, quant à elles, transmettent des ordres moteurs en provenance du SNC. Agissant ainsi sur la fréquence des battements du cœur, la sécrétion d'enzymes digestives ou encore la contraction des muscles lisses des vaisseaux sanguins.

L'activité du système nerveux autonome est elle-même régulée par l'intermédiaire de deux systèmes appelés sympathique et parasympathique (Figure 2). 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 SNP somatique innerve la peau, les articulations, les tendons et les muscles squelettiques. Il achemine d'une part, les informations sensorielles recueillies au sein de ces structures jusqu'au SNC via des neurones sensoriels. D'autre part, il transmet, via des neurones moteurs ou motoneurones, les commandes motrices émanant du SNC. Celles-ci concernent les mouvements volontaires et les mouvements réflexes.

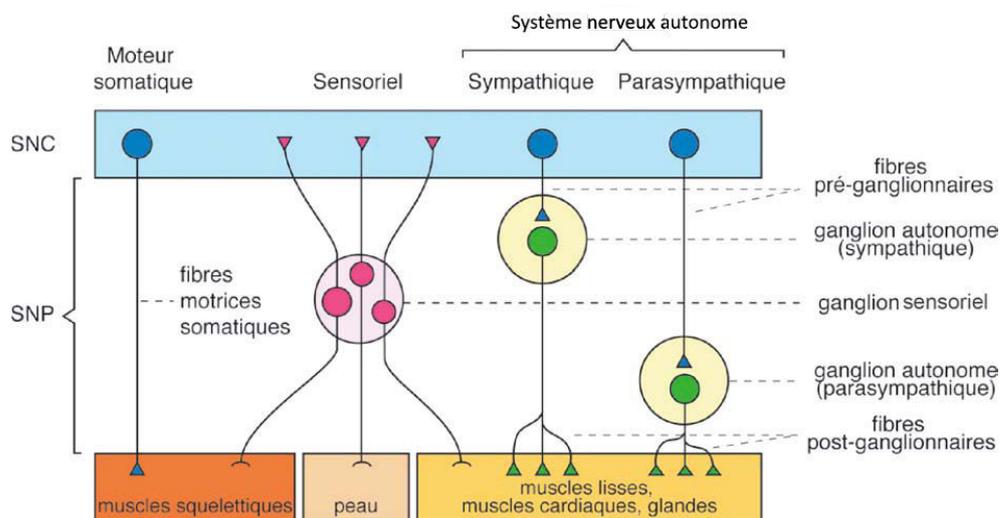


Figure 2 : Organisation schématique du système nerveux périphérique (D'après Neurosciences, Exploring the brain, 2nd édition, 2001)

Sur cette représentation schématique, sont représentés de gauche à droite :

- Les neurones moteurs somatiques, dont les corps cellulaires sont situés au sein du SNC et qui projettent en périphérie (muscles squelettiques et tendons).
- Les neurones sensoriels, dont les corps cellulaires sont regroupés au sein des ganglions sensoriels crâniens et qui projettent d'une part dans le SNC et d'autre part en périphérie (leurs cibles varient en fonction du type de neurones).
- Les neurones moteurs autonomes des voies sympathique et parasympathique. Le système nerveux autonome contrôle ses organes cibles par une voie bi-synaptique. Les neurones moteurs, dont les corps cellulaires sont situés au sein des ganglions autonomes, projettent vers les organes internes et les glandes et reçoivent des afférences du SNC. Les ganglions autonomes sont retrouvés dans les plexus comme le thorax l'abdomen ou le pelvis.

1.2. Structure générale du nerf périphérique

Les neurones ont deux propriétés physiologiques : l'excitabilité, c'est-à-dire la capacité de répondre aux stimulations et de convertir celles-ci en impulsions nerveuses, et la conductivité c'est-à-dire la capacité de transmettre les impulsions.

Leurs extrémités sont morphologiquement et fonctionnellement spécialisées dans le but de collecter des informations provenant d'autres neurones ou de terminaisons sensorielles ainsi que de véhiculer et transmettre une réponse adaptée à la cellule cible.

1.2.1. Architecture des neurones

Les neurones possèdent les organites nécessaires à leur homéostasie énergétique et leur synthèse protéique. Ils sont plus ou moins développés selon leur nature et leur fonction. Leur taille varie considérablement. Ainsi, un neurone en grain du cervelet est globulaire et très compact (diamètre < 10 μm), alors qu'un motoneurone projetant à grande distance est stellaire et volumineux (diamètre = 25-70 μm).

Leur structure se compose de différents éléments (Figure 3) :

- Le corps cellulaire, contenant un noyau interphasique volumineux entouré d'un péricaryon de taille variable renfermant le réticulum endoplasmique granuleux (corps de Nissl), l'appareil de Golgi et des mitochondries transportées vers les dendrites et l'axone.

- Les dendrites sont plus ou moins nombreuses et présentent une arborisation dichotomique. La présence de ribosomes indique l'existence d'une synthèse locale de protéines. Généralement, les dendrites ont pour rôle de transmettre l'information jusqu'au corps cellulaire.

- L'axone, est en général unique et dépourvu de ribosomes. Cependant, il est capable de synthèse protéique locale, notamment lors de la régénération nerveuse via des mécanismes de recrutement en urgence de ribosomes et d'ARNm sur le site de la lésion (Willis and Twiss, 2006). Qu'ils soient myélinisés ou non, les axones des nerfs périphériques sont toujours entourés par des cellules de Schwann.

- Les terminaisons présynaptiques : les axones dialoguent avec leurs cellules effectrices par le biais de leurs terminaisons. La majorité de ces connexions sont de type chimique et font intervenir des neurotransmetteurs, mais il existe également des synapses électriques correspondant à des jonctions de type « communicantes ». Le bouton synaptique est doté des mêmes constituants que le corps cellulaire, en particulier de nombreuses mitochondries et un grand nombre de vésicules synaptiques, mais peu de ribosomes et pas de lysosomes.

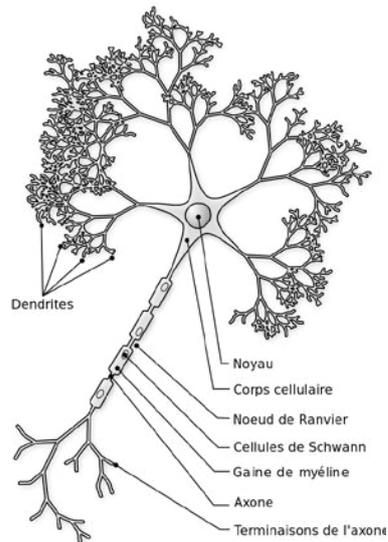


Figure 3 : Structure d'un neurone typique

Un nerf périphérique est constitué d'un ensemble de fascicules au sein desquels se distribuent les fibres nerveuses (l'axone et ses CS satellites) (Figure 4).

Le fascicule est limité par le périnèvre, constitué de couches de cellules périneurales de type fibroblastique. Les fascicules sont séparés 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.

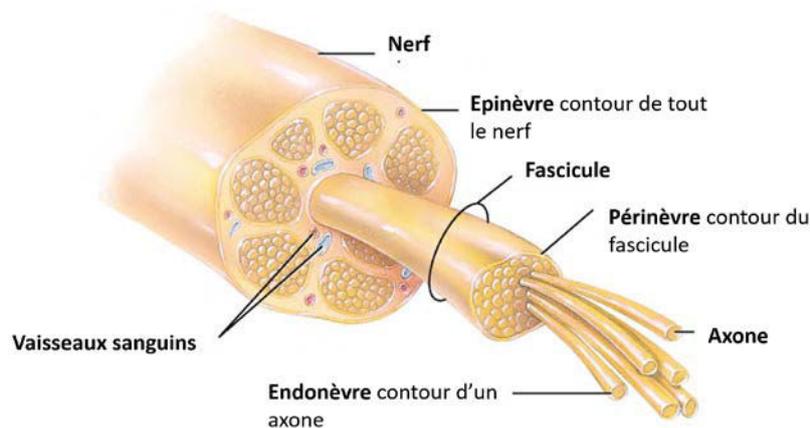


Figure 4 : représentation schématique de la structure d'un nerf (D'après Neurosciences, Exploring the brain, 2nd édition, 2001)

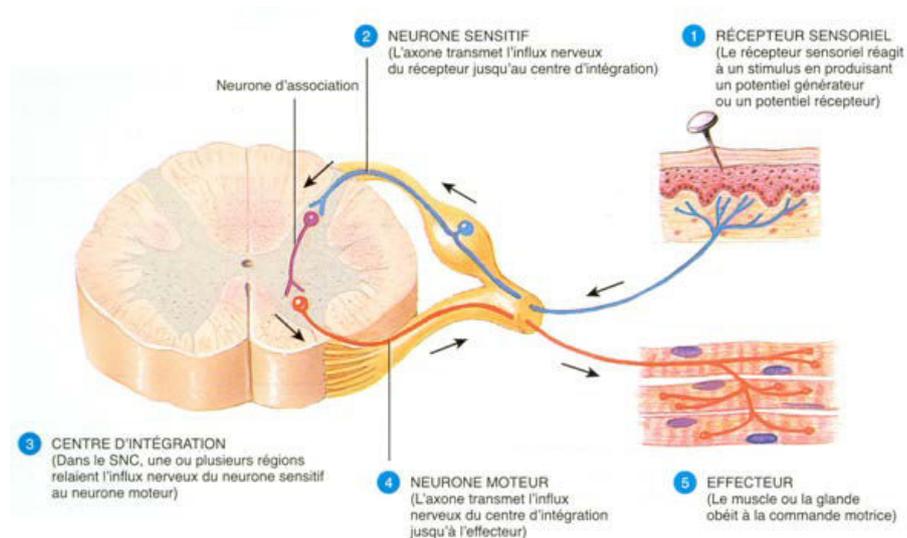


Figure 5 : Direction de la propagation des influx nerveux moteurs et sensoriels (Tortora and Grabowski, 2001)

1.2.1.1. Les neurones sensoriels

Les neurones sensoriels primaires trouvent leur origine dans les cellules de la crête neurale. Leurs corps cellulaires localisés dans les ganglions de la racine dorsale (ou ganglions rachidiens) sont entourés de petites cellules gliales, les cellules satellites. D'un point de vue morphologique, les neurones sensoriels sont pseudo-unipolaires, constituant une sous-classe de neurones bipolaires. Leur axone possède deux branches : l'une se projette à la périphérie et sa terminaison forme un récepteur sensoriel, l'autre se projette dans la moelle épinière et achemine l'information au SNC (Figure 5).

Il existe plusieurs types de fibres, organisées en contingents, qui véhiculent des informations de modalités spécifiques provenant des organes sensoriels : les fibres *Ia* et *Ib* sont de gros axones fortement myélinisés. Ces fibres possèdent une vitesse de conduction très rapide (70 à 120 m/s). Les fibres *Ia* relaient les informations proprioceptives du fuseau neuromusculaire : c'est un mécanorécepteur constitué de fibres musculaires modifiées. Il est disposé parallèlement aux fibres du muscle et est sensible à l'allongement de celui-ci, il traduit un stimulus mécanique en un message nerveux. Les fibres *Ib* relaient des informations proprioceptives de l'organe tendineux de Golgi. Ce sont des corpuscules encapsulés qui contiennent des fibres de collagène en série avec 15-20 fibres musculaires. Ce sont des récepteurs sensitifs proprioceptifs. Quand les fibres musculaires se contractent, il y a allongement de la jonction musculotendineuse avec rapprochement des fibres de collagène dans l'organe tendineux de Golgi, ce qui comprime les terminaisons nerveuses et provoque la stimulation des fibres afférentes type *Ib*.

Les fibres *Aβ* sont des fibres myélinisées à conduction rapide (30 à 70 m/s) qui véhiculent les informations tactiles extéroceptives (toucher, vibration). Elles pénètrent dans la moelle via le cordon spinal latéral. Les fibres *Aδ* sont faiblement myélinisées (30 à 50 m/s), les fibres *C* sont amyéliniques (0,5 à 2 m/s). Elles véhiculent les informations provenant des terminaisons libres de type extéroceptives (sensations provoquées par des stimuli extérieurs) non discriminatives, thermiques et nociceptives. Elles entrent dans la moelle par le faisceau spinal-latéral.

1.2.1.2. Les motoneurones

Les motoneurones (ou nerfs moteurs) sont des cellules nerveuses dont le corps cellulaire est localisé dans la racine ventrale de la moelle épinière et dont les fibres axonales forment des projections

hors de la moelle épinière pour contrôler les muscles (directement ou indirectement) (Figure 5). Les motoneurons sont des nerfs efférents. Ils véhiculent le signal nerveux de la moelle épinière aux muscles afin de produire le mouvement. Un seul motoneurone peut innervé de nombreuses fibres musculaires (cellules musculaires). Ils sont caractérisés par leur très grande taille. Leur axone est myélinisé et possède un fort calibre. Les neurones moteurs sont cholinergiques, c'est-à-dire qu'ils utilisent l'acétylcholine comme neurotransmetteur pour médier la contraction des muscles. L'acétylcholine est synthétisée par l'enzyme choline acétyltransférase et est concentrée dans des vésicules synaptiques par un transporteur vésiculaire. L'acétylcholine est libérée dans l'espace synaptique suite à une stimulation assez forte pour induire un potentiel d'action. Cette stimulation est le résultat de synapses reliant les neurones moteurs avec d'autres neurones du SNC, dont notamment les neurones moteurs supérieurs (transmission glutamatergique).

Les neurones moteurs sont séparés en 3 catégories : les motoneurons α , les motoneurons β et enfin les motoneurons γ .

Les motoneurons α innervent les fibres musculaires extrafusales localisées tout le long du muscle (fibres musculaires contractiles sur toute leur longueur). Leurs corps cellulaires sont situés dans la corne antérieure de la moelle. En plus de la contraction volontaire des muscles squelettiques, les neurones moteurs α contribuent au tonus musculaire (force continue générée par les muscles non contractés pour s'opposer à l'étirement). Quand un muscle est étiré, les neurones sensoriels à l'intérieur du fuseau neuromusculaire détectent le degré d'étirement et envoient un signal vers le système nerveux central. Le système nerveux central, à son tour, active les motoneurons α dans la moelle épinière, qui contractent les fibres musculaires extrafusales afin de résister à davantage d'étirement. Ce processus est aussi nommé le réflexe d'étirement.

Les motoneurons β innervent les fibres musculaires intrafusales (plus fines que les fibres musculaires squelettiques).

Les motoneurons γ innervent les fibres intrafusales présentes dans le fuseau neuromusculaire. L'activation des neurones γ contracte les fibres musculaires accélérant ainsi le réflexe d'étirement et activant les neurones sensoriels.

1.3. Les composants des nerfs périphériques

1.3.1. Les axones

D'un point de vue anatomique, les axones sont la première ligne de transmission du système nerveux et vont former des faisceaux de nerfs. Certains axones peuvent avoir des tailles dépassant 1 mètre, tandis que d'autres ne vont mesurer qu'un millimètre. Les axones les plus longs du corps humain sont ceux que l'on retrouve au sein du nerf sciatique. Ils partent de la base de la moelle épinière et finissent au niveau du gros orteil de chaque pied. Le diamètre des axones est lui aussi variable. Pour la plupart, les axones ont, tout de même, des dimensions microscopiques (typiquement autour d'un micromètre de diamètre) et transmettent des signaux sous forme de potentiels d'actions, qui sont de légères impulsions électrochimiques voyageant rapidement le long de l'axone en partant du corps cellulaire pour finir là où l'axone forme des contacts synaptiques avec les cellules cibles.

La caractéristique définissant son potentiel d'action est qu'il répond au mécanisme du « tout ou rien », chaque potentiel d'action généré par un axone a essentiellement la même taille et la même forme de signal. Cette caractéristique de « tout ou rien » permet au potentiel d'action d'être transmis tout au long de l'axone à un autre sans aucune réduction d'amplitude.

Au repos, le potentiel transmembranaire est d'environ -70mV : c'est le potentiel de repos. Le potentiel d'action est constitué d'une succession d'événements :

- Une dépolarisation transitoire et locale de cet état de repos, d'une amplitude spécifique de $+100\text{mV}$, le potentiel de la membrane interne passant de -70 à $+30\text{mV}$.
- Une repolarisation de la membrane interne dont le potentiel repasse à -70mV
- Une hyperpolarisation, où le potentiel diminue plus qu'à l'état basal (-80mV), pour ensuite retourner à -70mV . Durant ce temps on ne peut plus induire d'autre potentiel d'action, c'est la période réfractaire.

Lorsqu'un potentiel d'action apparaît à un endroit donné de l'axone, la portion voisine qui lui a donné naissance entre en période réfractaire, ce qui l'empêche d'être excitée à son tour. Cette période réfractaire est expliquée par la désensibilisation des canaux sodiques dépendant du voltage.

En revanche, la portion voisine qui n'a pas encore présenté de potentiel d'action commence à être excitée. Cette excitation provient de petits courants électriques très locaux qui s'établissent entre portion excitée et portion non encore excitée. De proche en proche se créent donc les conditions de naissance d'un potentiel d'action à côté de la portion qui est en train de réaliser le potentiel d'action (propagation régénérative). Ainsi, la période réfractaire explique l'unidirectionnalité de l'influx nerveux, depuis le cône d'émergence jusqu'à ses extrémités, les terminaisons synaptiques.

Quand un potentiel d'action atteint un terminal présynaptique, il active le processus synaptique de transmission. La première étape consiste en l'ouverture rapide des canaux calciques situés dans la membrane de l'axone permettant ainsi aux ions calcium de se déverser brutalement à l'intérieur de la synapse. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium provoque la fusion des vésicules (de petits containers entourés par une membrane lipidique) remplies de neurotransmetteurs chimiques avec la membrane axonale, leur permettant ainsi de déverser leur contenu dans l'espace extracellulaire (Figure 6). Le neurotransmetteur est libéré par l'axone présynaptique par exocytose.

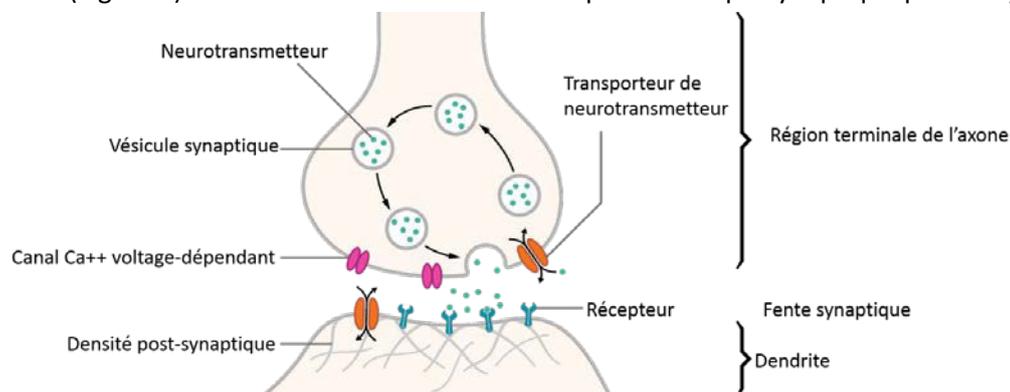


Figure 6 : Structure typique d'une synapse chimique (Image dérivée d'une image de Thomas Spletstoesser)

Ce neurotransmetteur diffuse alors jusqu'aux récepteurs membranaires de la cellule cible, permettant leur activation. En fonction du neurotransmetteur libéré et des récepteurs activés, les effets sur la cellule cible vont être, soit activateur, soit inhibiteur, soit une modification de son métabolisme. Cet ensemble d'événements se produit en moins d'un millième de seconde, après quoi un nouvel ensemble de vésicules est mis en position aux abords de la membrane présynaptique dans l'attente d'une libération lors du potentiel d'action suivant.

Il existe deux types d'axones dans le système nerveux central et le système nerveux périphérique : les axones myélinisés et non myélinisés. La myéline est une couche isolante formée par les cellules gliales, les CS (SNP) ou les oligodendrocytes (SNC).

1.3.2. La glie

Outre les neurones, le SNP comme le SNC comportent d'autres types cellulaires, la majorité étant des cellules gliales. Ces cellules sont définies comme des cellules de soutien établissant un contact direct avec les neurones. Leur fonction de soutien à l'égard des neurones comprend à la fois un rôle nourricier et un rôle protecteur. Les cellules gliales exercent de multiples fonctions durant le développement, dans le traitement et la transmission de l'information (Allen and Barres, 2009; Rouse and Robitaille, 2006). Le SNP compte plusieurs types de cellules gliales : les cellules satellites, les cellules des capsules frontières et les CS (Jessen and Mirsky, 2005). Les cellules satellites sont des cellules gliales associées aux corps cellulaires des neurones sensoriels et sont présentes uniquement dans les ganglions sensoriels. Les cellules des capsules frontières constituent une population gliale présente de manière temporaire à l'interface SNC/SNP, aux points d'émergence des nerfs crâniens et des racines des nerfs spinaux (Maro *et al.*, 2004).

Les CS sont les principales cellules gliales du SNP (Lobsiger *et al.*, 2002). Leur rôle premier est la formation de myéline autour des prolongements des neurones périphériques, comme le font les oligodendrocytes dans le SNC. Par contre, comme tous les axones du SNP ne sont pas entourés d'une gaine de myéline, les CS peuvent être myélinisantes ou non, mais sont toujours en association étroite avec les axones. Les CS non myélinisantes sont des CS matures qui ne forment pas de gaine de myéline. Elles entourent les axones de petit calibre et les isolent les uns des autres par leur cytoplasme. Une CS non myélinisante entoure de multiples petits axones non myélinisés. Pour les axones plus larges, il s'agit de CS myélinisantes qui vont s'associer avec l'axone dans une relation 1:1 pour former une gaine de myéline multilamellaire. Les CS myélinisantes entourent chacune un seul axone (relation 1:1) et s'enroulent en spirale multicouches autour de lui, formant ainsi une gaine de myéline qui isole l'axone du milieu extérieur (Figure 7). Une spirale serrée, composée d'une double épaisseur de membranes plasmiques fusionnées se forme, le cytoplasme de la CS étant éliminé de la plupart des espaces existants entre les couches membranaires. La zone de transition entre les gaines de myéline de deux CS adjacentes porte le nom de nœud de Ranvier.

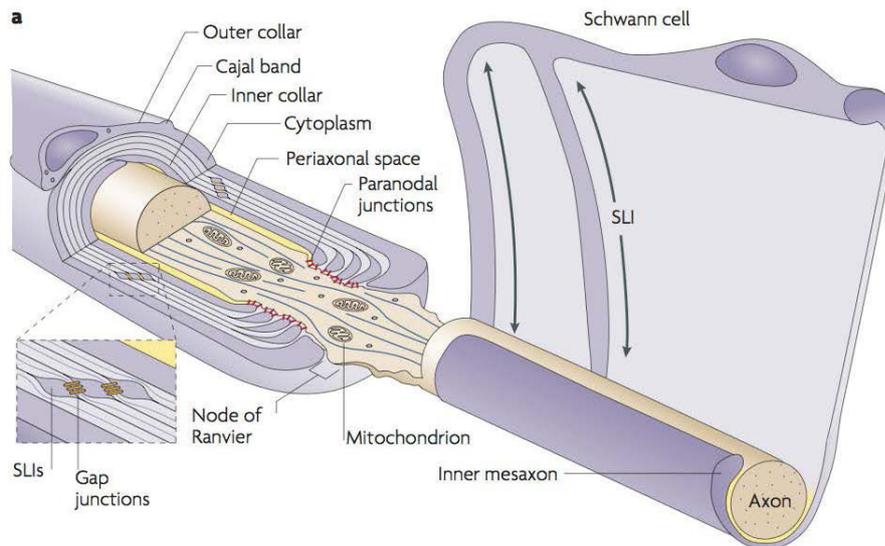


Figure 7 : Cellule de Schwann formant une gaine de myéline (Nave, 2010)

La myéline compacte (en violet clair) sert d'isolant tandis que la partie non compacte (violet foncé) est en continuité avec le cytoplasme de la cellule gliale permettant d'amener les nutriments au plus près du péri axone (jaune). Les incisures de Schmidt-Lanterman correspondent à des zones de myéline non compacte superposées et reliées par des jonctions communicantes (gap junctions)

En situation normale, l'influx électrique se propage le long de l'axone myélinisé en « sautant » d'un nœud de Ranvier au suivant (la gaine de myéline ayant une fonction d'isolant électrique). En imposant une conduction saltatoire à l'influx nerveux, la gaine de myéline permet la propagation plus rapide des potentiels d'action sur l'axone qu'elle entoure. L'épaisseur de la gaine de myéline dépend du nombre de couches (ou lamelles) enroulées autour de l'axone, qui peut présenter jusqu'à 300 couches de membrane (Nave, 2010).. La membrane plasmique de ces cellules contient des lipides et des protéines. La distinction entre les CS matures formant ou non une gaine de myéline semble être régulée par le calibre de l'axone avec lequel elles sont en contact. En effet, des CS non myélinisantes peuvent être dirigées vers la myélinisation par des axones de gros calibre en régénération (Aguayo *et al.*, 1976; Weinberg *et al.*, 1975). Chaque CS possède une lame basale externe nette qui la sépare de l'endonèvre

1.3.2.1. La lame basale

La Lame basale entourant les cellules de Schwann fait partis des composants de la matrice extracellulaire. La lame basale est entourée d'une matrice fibrillaire externe. L'ensemble lame basale et matrice fibrillaire externe est appelé membrane basale. La lame basale est constituée d'hétérodimères de laminine, de collagènes, de nidogènes et de protéoglycanes. Les cellules de Schwanns myélinisantes et non myélinisantes sont entourées par la lame basale. La lame basale joue un rôle important dans les mécanismes d'initialisations de la myélinisation et dans les processus de myélinisations (Court *et al.*, 2006). Les constituants de la lame basale évoluent de manière très précise conjointement aux différentes étapes de différenciations des cellules de Schwann et semblent aussi en être les régulateurs (Podratz *et al.*, 1998).

1.3.2.2. Structure de la gaine de myéline

La gaine de myéline est organisée en domaines fonctionnels responsables de la propagation saltatoire du potentiel d'action et de l'interaction entre l'axone et les CS. On distingue les régions nodale, paranodale, juxtaparanodale et internodale (Figure 8).

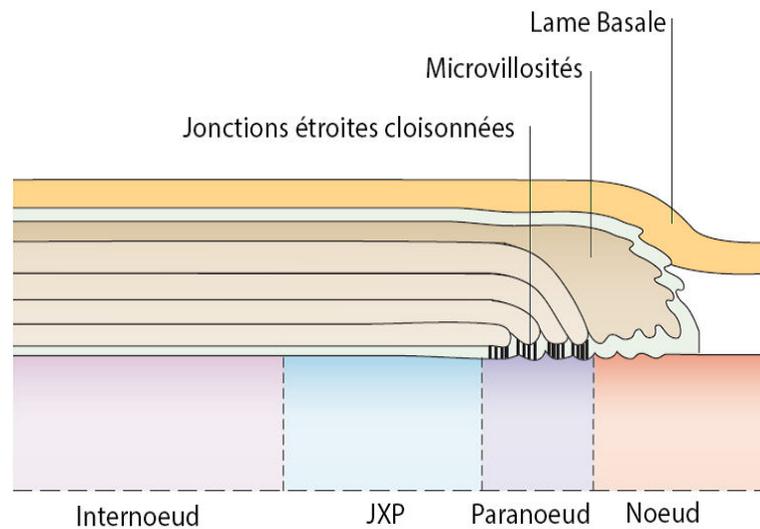


Figure 8 : Coupe longitudinale schématique d'une fibre myélinisée autour du nœud de Ranvier (Poliak and Peles, 2003)

L'internœud, le juxtaparanœud (JXP), le paranœud, et le nœud sont représentés respectivement en mauve, bleu, violet et orange. Le nœud est en contact avec les microvillosités des CS. Les fibres myélinisées du SNP sont entourées par une lame basale. La région paranodale forme des jonctions étroites cloisonnées avec l'axone. La région juxtaparanodale est située entre la myéline compacte et le paranœud. La région internodale s'étend à partir de la région juxtaparanodale sous la myéline compacte.

La gaine de myéline correspond à l'empilement de multiples couches de membrane plasmique gliale. La gaine est formée par enroulement de la cellule de Schwann autour de l'axone, et sa composition est donc essentiellement lipidique (environ 70 %).

1.3.2.3. La région nodale

Dans les fibres nerveuses myélinisées, chacun des bords latéraux d'un segment de myéline compacte est encadré par une interruption courte de la gaine de myéline correspondant à la région nodale. Cette zone permet aux CS de relier leur cytoplasme périnucléaire avec la couche la plus interne de la myéline (Figure 8). La couche la plus externe de la myéline, grâce à ses villosités, plonge au sein du nœud, et entre en contact avec les couches les plus internes de la myéline. La taille de la région nodale varie en fonction du diamètre de la fibre axonale selon une relation curviligne qui est alors optimisée pour des vitesses de conduction nerveuse maximales (Salzer, 1997). La taille du nœud de Ranvier est comprise entre 1 et 2 μm alors que la région internodale peut être supérieure à 1,5 millimètre de long. 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 Na^+ voltages dépendants, dépassant les 1200 unités/ μm^2 (Poliak and Peles, 2003).

L'espace nodal est occupé par des microvillosités issues de la partie externe de la cellule de Schwann. Les microvillosités de deux cellules adjacentes sont reliées par des jonctions serrées (Poliak et al., 2002), même s'il existe une certaine perméabilité à ce niveau.

1.3.2.4. La région paranodale

Les régions paranodales sont localisées directement de part et d'autre du nœud de Ranvier et correspondent à des boucles de membrane gliale contenant du cytoplasme, s'enroulant en spirale autour de l'axolème auquel elles sont étroitement connectées. Les jonctions observées à ce niveau sont régulièrement espacées. Les jonctions paranodales se mettent en place relativement tard au cours de la myélinisation, tout d'abord par interaction de la boucle correspondant à la couche de myéline la plus externe avec l'axone, les autres boucles s'attachant ensuite graduellement (Tao-Cheng and Rosenbluth, 1983). On y retrouve des structures comme les boucles paranodales, correspondant aux extrémités latérales des couches membranaires internodales et formant des sacculs cytoplasmiques interagissant entre eux et avec l'axone.

1.3.2.5. La région juxtapanodale

Le juxtapanodé correspond à la région jouxtant la zone interne des domaines paranodaux. On y a caractérisé la présence d'hétéromultimères de canaux K^+ de la famille Shaker (Wang *et al.*, 1993), qui colocalisent au niveau de l'axolème juxtapanodal avec Caspr2, un second membre de la famille Caspr (Poliak *et al.*, 1999), et Tag1, une protéine CAM de la famille des contactines (Traka *et al.*, 2002).

La concentration de canaux K^+ au niveau juxtapanodal pourrait assurer un maintien du potentiel de repos de la membrane axonale internodale et peut-être de protéger les axones en évitant des excitations indésirables de l'axone (Chiu and Ritchie, 1984; Vabnick *et al.*, 1999). Ces canaux permettraient aussi de médier la communication axogliale (Altevogt *et al.*, 2002; Fields and Stevens-Graham, 2002).

1.3.2.6. L'internœud

Au niveau internodal, la myéline est essentiellement de type compact, c'est-à-dire que cette zone est dépourvue de cytoplasme et que les couches membranaires adjacentes forment des contacts étroits assurant la compaction de la gaine.

Au sein de la gaine de myéline compacte internodale existent par ailleurs des zones de myéline non compacte, nommées incisures de Schmidt-Lanterman (Figure 9).

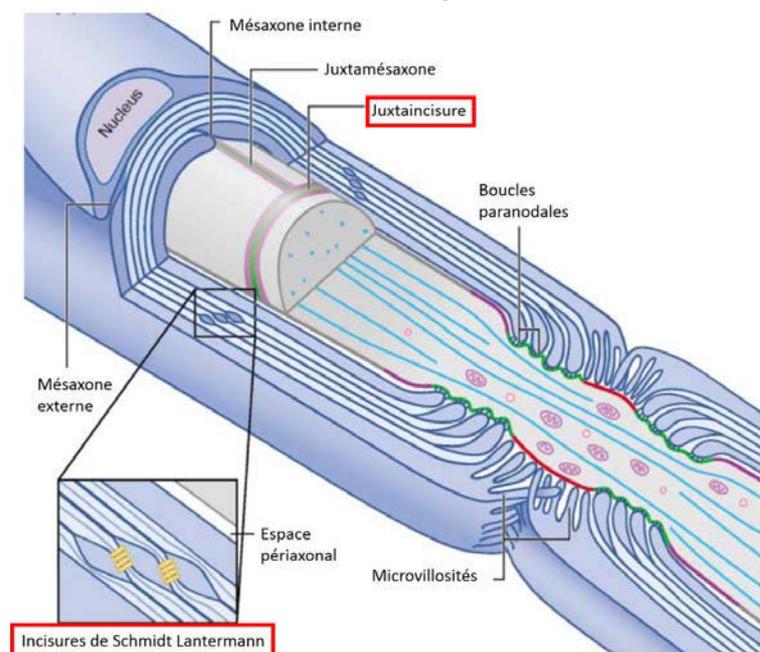


Figure 9 : Schéma de sections longitudinales et transversales de fibres myélinisées

On retrouve face au mésaxone interne le juxtamésaxone et face aux incisures de Schmidt-Lanterman, la juxtaincisure au niveau axonal (Salzer, 2003).

Ces incisures forment des canaux de cytoplasme traversant l'épaisseur de la gaine de myéline. Elles se mettent en place lors de la formation de la gaine de myéline, et assurent ainsi l'existence d'une voie de diffusion reliant la zone périaxonale de la cellule gliale avec sa région périnucléaire (Arroyo and Scherer, 2000).

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 (Fannon *et al.*, 1995) (Figure 10A). Elles sont basées sur l'interaction homotypique d'E-cadhérine, molécule dépendante du calcium. Au niveau intracellulaire, la E-cadhérine interagit avec la β -caténine qui la connecte au cytosquelette, plus particulièrement aux filaments d'actine. Le deuxième type de jonctions présentes à ce niveau de la myéline correspond aux jonctions serrées (Tetzlaff, 1982) (Figure 10B), qui favorisent l'existence de domaines membranaires spécialisés au niveau des cellules épithéliales en limitant la fluidité de la membrane. Elles assurent également une perméabilité sélective aux molécules. Les protéines impliquées dans ces jonctions sont les claudines, dont plusieurs membres de cette famille de protéines transmembranaires sont impliqués dans les différentes structures de la myéline non compacte (Poliak *et al.*, 2002). Le dernier type de jonctions autotypiques observé est la jonction communicante localisée au niveau des incisures et des boucles paranodales (Tetzlaff, 1982) (Figure 10C). Elle est composée de deux connexons formant un canal entre les deux compartiments cytoplasmiques adjacents, favorisant les échanges d'ions et de diverses molécules de faible poids moléculaire. Chaque jonction communicante est un ensemble de 6 connexons composé de connexines pour les jonctions communicantes au niveau des CS (Scherer *et al.*, 1995).

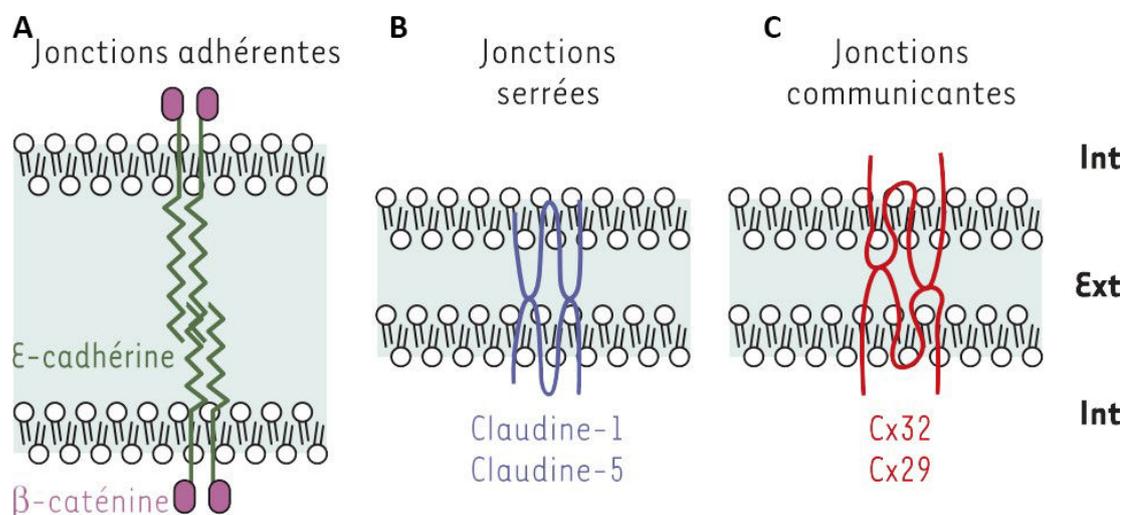


Figure 10 : Les trois types de jonctions autotypiques de la myéline non-compacte, les jonctions adhérentes, serrées et communicantes font intervenir la E-cadhérine interagissant respectivement avec la β -caténine, les claudines et les connexines. D'après Oguievetskaia *et al.*, 2005

Les internœuds représentent 99 % des zones d'interaction entre axones et CS. L'interaction axogliale y est relativement uniformément répartie, avec une séparation de 15 nm entre la membrane plasmique de la cellule de Schwann et l'axolème.

De plus, il existe deux structures spécialisées au niveau de l'axone, liées à la présence des zones de myéline non-compactes : le juxtamésaxone et la juxtaincisure.

Le mésaxone interne est en continuité avec la spirale paranodale. Le juxtamésaxone serait donc la continuation internodale des régions para et juxtapanodales. De même, la juxtainscisure est une structure en anneau reproduisant l'organisation moléculaire des incisures de Schmidt-Lanterman (Arroyo *et al.*, 1999).

L'organisation extrêmement stéréotypée des fibres myélinisées suggère une régulation fine du processus de myélinisation au cours du développement des nerfs. La voie de différenciation des CS permettant d'aboutir à la formation des gaines de myéline comprend différentes étapes nécessitant notamment un dialogue avec les axones et une régulation complexe de l'expression génique des cellules gliales.

1.3.3. Les autres cellules de l'endonèvre

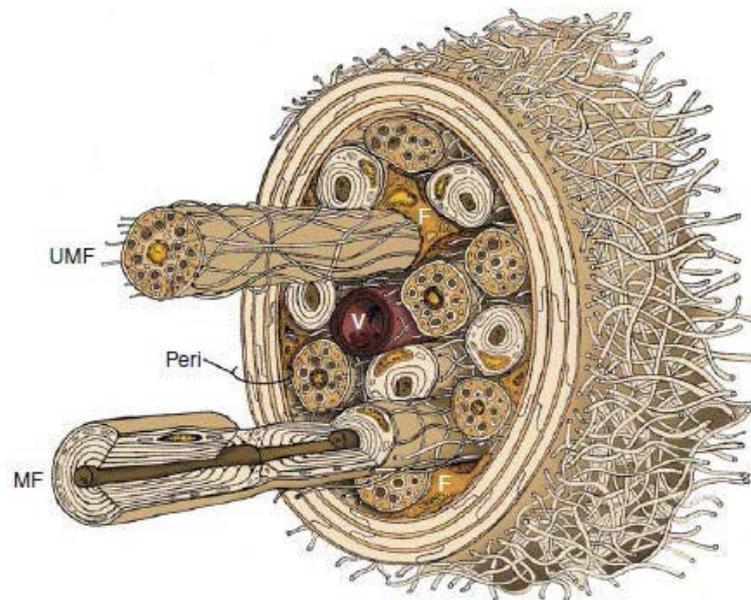


Figure 11 : Constituants cellulaire de l'endonèvre d'un nerf périphérique (Mizisin and Weerasuriya, 2011)

Un fascicule de nerf entouré par le périnèvre (Peri). Ce fascicule est constitué de fibres myélinisées (MF) et de fibres amyéliniques (UMF), de vaisseaux (V) et de fibroblastes (F). On ne voit pas sur cette figure les péricytes, les macrophages résidents ni les mastocytes.

1.3.3.1. Les macrophages

Le nerf périphérique normal possède une population de macrophages résidents représentant environ 2 à 9 % de la population totale des cellules du nerf (Griffin *et al.*, 1993). Dans un nerf intact, près de la moitié de la population des macrophages résidents subirait un remplacement par les macrophages hématogènes tous les 3 mois (Mueller *et al.*, 2003). Ces macrophages résidents assurent une surveillance immunitaire du milieu endoneurial. Lors d'une lésion, ils produisent différentes molécules inflammatoires qui stimulent leur prolifération et l'entrée de macrophages hématogènes dans le nerf (Mueller *et al.*, 2001).

1.3.3.2. Les cellules endothéliales des parois des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins ont un rôle d'irrigation en sang des nerfs du SNP. Les cellules endothéliales des parois des vaisseaux sanguins représentent environ 7 % du total des cellules de l'endonèvre (Murinson, 2005).

1.3.3.3. Les mastocytes

Comme les macrophages résidents, à l'image de la microglie du SNC, les mastocytes sont des patrouilleurs pouvant initier la réponse inflammatoire innée à la suite d'un traumatisme physique ou d'une infection du SNP.

1.3.3.4. Les fibroblastes endoneuraux

Les fibroblastes mettent en place la matrice de collagène qui soutient les cellules et les axones. Ils procurent de la souplesse et une force de résistance aux nerfs face aux pressions mécaniques. Ils sont situés entre les fibres nerveuses, à proximité des vaisseaux sanguins, sous le périnèvre et parallèlement aux cellules périneurales (Figure 12). Leur corps cellulaire présente un aspect fuselé, avec de longs et fins prolongements cytoplasmiques. Ils ne sont pas associés aux axones et n'ont pas de lame basale continue, ce qui les distingue des CS et des cellules périneurales.



Figure 12 : Biopsie de nerf humain normal. (Richard et al., 2012)

Les fibroblastes endoneuraux sont des cellules fusiformes éparpillées entre les fibres nerveuses (flèche). Microscopie électronique coupe transversale.

Lors d'une lésion du nerf, les CS reçoivent un signal provenant des fibroblastes, leur apportant ainsi l'impulsion nécessaire pour former un amas de cellules au niveau de l'extrémité nerveuse lésée (Parrinello *et al.*, 2010). Lors d'une lésion axonale ou démyélinisante, il a été observé que les fibroblastes endoneuraux peuvent se différencier en cellules phagocytaires. Les observations de Schubert et Friede (Schubert and Friede, 1981) et celles de Stevens *et al.* (Stevens *et al.*, 1989) suggèrent que les fibroblastes endoneuraux peuvent devenir des macrophages en conditions pathologiques.

1.4. Les constituants moléculaires de la gaine de myéline

1.4.1. Les Protéines

1.4.1.1. Trois glycoprotéines principales

La myéline est constituée de 3 glycoprotéines principales ayant un rôle important dans la formation, la maintenance et dans la dégénérescence des feuillets de myéline. Deux d'entre elles, PMP22 et P0 sont des composants de la myéline compacte du système nerveux périphérique. La troisième, la glycoprotéine associée à la myéline : MAG (myelin associated glycoprotein) est localisée au sein des feuillets membranaires, différents de la myéline compacte. Elle a une fonction dans l'interaction axone-glie à la fois dans le système nerveux central et dans le système nerveux périphérique (Figure 13).

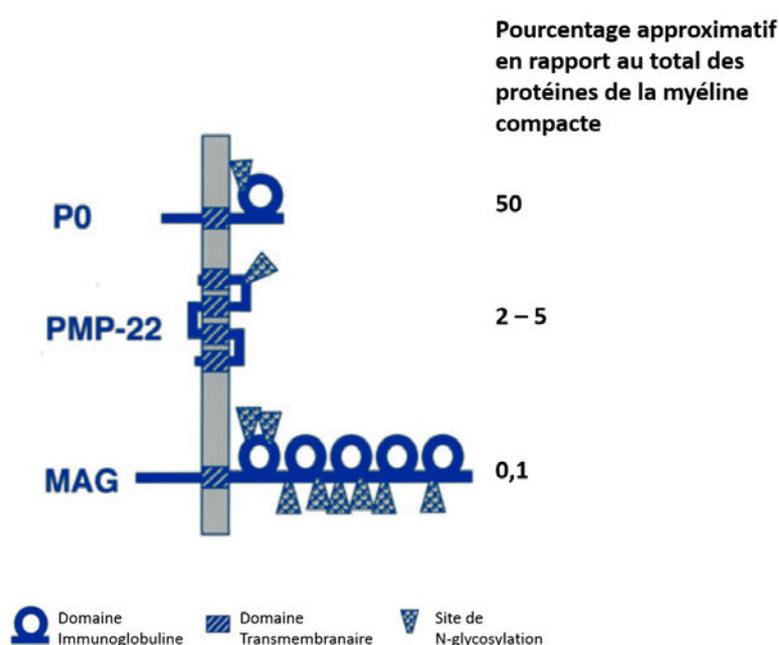


Figure 13 : Principales glycoprotéines de la myéline compacte (Quarles, 2002)

1.4.1.1.1. La glycoprotéine P0, la principale protéine de la myéline du système nerveux périphérique

P0 est une glycoprotéine de 30 kDa qui représente environ la moitié des protéines de la myéline compacte du système nerveux périphérique. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type I, avec un unique domaine « immunoglobulin-like » extracellulaire, ainsi qu'un site unique de N-glycosylation (Figure 13). Les glycanes situés au niveau de P0 sont très hétérogènes (Gallego *et al.*, 2001). Nombre d'entre eux sont sulfatés et contiennent des oligosaccharides terminés par un acide sialique ou un acide glucuronique sulfaté. L'acide glucuronique sulfaté de P0 est une partie clé de l'épitope carbohydrate HNK-1 impliqué dans les adhérences cellules-cellules (Voshol *et al.*, 1996).

PO est la protéine principale responsable de la compaction de la myéline en promouvant l'adhérence entre deux couches de myélines adjacentes (Xu *et al.*, 2000). Les souris, chez lesquelles l'expression de PO a été éliminée par recombinaison homologue, développent de sévères neuropathies démyélinisantes avec une prédominance de myéline non compactée (Katrin Adlkofer *et al.*, 1995; Martini *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2000). En effet, PO stabilise le contact entre deux feuillettes de myéline par des interactions homophiliques. Grâce à des études de cristallographies (Inouye *et al.*, 1999) et, plus récemment, par des études expérimentales (Hasse *et al.*, 2004), il a été démontré que PO peut interagir avec d'autres PO au travers de trans-interactions adhésives homophiliques.

1.4.1.1.2. MAG pour myelin associated glycoprotein

MAG est un constituant mineur de la myéline, représentant 0,1 % des protéines de la myéline du SNP. C'est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines. MAG possède deux transcrits (L-MAG et S-MAG) résultant d'un épissage alternatif. Les deux isoformes sont identiques dans leurs domaines extracellulaires et transmembranaires mais diffèrent au sein de leurs domaines cytoplasmiques. Chez les rongeurs, L-MAG est surtout exprimée lors du développement que ce soit embryonnaire ou post-natal. Son expression décline peu de temps après la fin du développement post-natal dans le SNP et le SNC. L-MAG disparaît presque complètement du SNP. Dans le SNC et le SNP, S-MAG est l'isoforme prédominante. Cette différence d'expression a d'importantes conséquences sur la transduction du signal initialisée par MAG en tant que récepteur de surface des cellules myélinisantes. MAG est requise pour l'initialisation de la myélinisation, et la maintenance de la myéline adulte (Llorens *et al.*, 2011).

MAG peut interagir avec certains types de collagènes, elle influence la formation de fibres de collagènes (Bachmann *et al.*, 1995). Sur les CS, MAG n'est détectable qu'après le premier tour de gaine de myéline autour des axones. Après la formation de la myéline, MAG n'est retrouvée que dans la région périaxonale des axones myélinisés et est exprimée dans la région paranodale des feuillettes myéliniques. MAG joue un rôle important dans la stabilisation des contacts entre les axones myélinisés et les processus gliaux (Schachner and Bartsch, 2000). MAG est aussi impliquée dans l'initialisation de la myélinisation du SNC uniquement. En effet, il a été démontré que les oligodendrocytes avaient besoin de MAG pour initialiser la myélinisation, mais pas les CS. Il a aussi été démontré que MAG joue un rôle dans la maintenance à long terme de la myéline. En effet, sur les souris invalidées en MAG, des structures en bulbe d'oignons issues de phénomènes successifs de myélinisation suivis de démyélinisations ont été observés. Les CS de ces mêmes souris ont été caractérisées comme immatures et non myélinisantes. Les mutations sur la protéine MAG sont généralement associées à des paraplégies spastiques héréditaires.

1.4.1.1.3. PMP22

PMP22 étant le sujet central de cette thèse, une partie lui est réservée. Partie 1 Chapitre 2

1.4.1.2. Autres protéines de la myéline

1.4.1.2.1. MBP

La protéine MBP (myeline basic protein) est majoritairement exprimée dans le SNC. Cependant, elle représente entre 5 et 15 % des protéines de la myéline du SNP (Benjamins and Morell, 1978). Cette protéine est exprimée dans la région compacte de la myéline. On pense que MBP participe, avec la glycoprotéine PO, à la maintenance et à la compaction de la myéline du SNP (Martini *et al.*, 1995). MBP n'est exprimée que de manière tardive lors de la myélinisation (Garbay *et al.*, 1989). Ce n'est qu'à la fin de l'étape de promyélinisation, lorsque les CS synthétisent une grande quantité de membrane destinée à former la gaine de myéline mature, qu'il y a accumulation de MBP (en même temps que PMP22 et PO). Les niveaux d'expression des ARNm de PMP22, PO et MBP au cours de la myélinisation au sein du nerf sciatique de souris sont très similaires (Notterpek *et al.*, 1999). Au cours du développement du nerf sciatique de la souris, le ratio entre une isoforme de MBP de 14-kDa et celui d'une autre de 18,5-kDa passe de 0,13 au 3^{ème} jour après la naissance à 1,25 chez l'adulte. Ceci montre que le mécanisme d'épissage alternatif, par lequel les différentes isoformes de MBP sont produites, est régulé lors du développement, et suggère que ces deux isoformes ont un rôle différent lors de la myélinisation (Matthieu *et al.*, 1973).

1.4.1.2.2. P2

« Peripheral myelin protein 2 » : PMP2 (également nommée P2 ou Fabp8) fait partie des composants majeurs de la myéline. Cependant, son rôle demeure inconnu. Les niveaux d'expression de cette protéine sont très variables, que ce soit entre les espèces, mais aussi entre des fibres pourtant du même organisme, et même entre des fibres isolées provenant du même nerf. Le gène *PMP2* est constitué de 4 exons codant une petite protéine de 14,8-kDa (Narayanan *et al.*, 1991) composée d'un tonneau de feuillet β de 10 brins antiparallèles servant de cœur hydrophobique pour la fixation de ligand, le tout entouré d'une surface hydrophile. La cavité permettant la fixation du ligand est recouverte d'un couvercle « hélice-boucle-hélice » (Majava *et al.*, 2010) qui dépasse partiellement au-dessus de la surface de la membrane (Ruskamo *et al.*, 2014). Il a été démontré que PMP2 est capable de fixer le cholestérol, l'acide oléique et le rétinol (Maddalo *et al.*, 2010; Sedzik and Jastrzebski, 2011; Uyemura *et al.*, 1984). PMP2, tout comme MBP, est une petite protéine membranaire périphérique basique de la myéline. Des études montrent que ces deux protéines de la myéline pourraient avoir une fonction similaire, voire même interagir entre elles afin de compacter les membranes myéliniques (Suresh *et al.*, 2010). PMP2 a un profil d'expression unique en comparaison des autres protéines de la myéline du SNP. Premièrement, elle a été identifiée comme présente uniquement dans certaines CS (Trapp *et al.*, 1979). Puis elle a été identifiée dans le cytoplasme des CS. Enfin, il a été démontré que PMP2 est exprimée avant MPZ et MBP après un « crush » du nerf périphérique (LeBlanc and Poduslo, 1990). Dans les feuillettes de la myéline, PMP2 est plus fortement exprimée dans la myéline associée à des axones de larges diamètres en comparaison de la myéline associée à des axones de diamètre moins important (Zenker *et al.*, 2014).

1.4.1.2.3. La connexine 32 (Cx32)

A l'origine, la connexine de 32 kDa n'avait pas été identifiée comme une protéine myélinique. Ce n'est que lorsque la mutation du gène de Cx32 sur le chromosome X humain a été associée à une neuropathie périphérique héréditaire (la maladie Charcot-Marie-Tooth de type X) qu'un rôle de la Cx32 dans la formation et la maintenance de la myéline périphérique a été proposé (Bergoffen *et al.*, 1993).

La Cx32 est exprimée dans de nombreux tissus, y compris dans le système nerveux (Kumar and Gilula, 1996; Spray and Dermietzel, 1995). La Cx32 est une protéine transmembranaire avec 4 domaines hydrophobes (Bennett *et al.*, 1991; Bruzzone *et al.*, 1996). Ces protéines sont des composants des jonctions Gap (ou jonctions communicantes). La jonction communicante est un assemblage de quelques dizaines à quelques milliers de canaux qui traversent les deux membranes cellulaires, en formant des plaques jonctionnelles. Toutes les molécules solubles dans l'eau, inférieures à 1 200 Da peuvent la traverser : c'est la taille d'exclusion des jonctions communicantes (Bruzzone *et al.*, 1996). Des analyses immunohistochimiques ont montré que la Cx32 est principalement exprimée dans la myéline du système nerveux périphérique, au sein de la région paranodale et au sein des incisures de Schmidt-Lanterman (Miyazaki *et al.*, n.d.; Scherer *et al.*, 1995). En se fondant sur cette localisation, la Cx32 a été proposée comme protéine constituante des jonctions Gap entre les différents feuilletts myéliniques générés par les cellules de Schwann procurant un raccourci au travers des régions non compactes de la myéline. Un autre rôle possible de la Cx32 dans la formation du SNP est la formation de jonctions Gap entre les axones myélinisés et les cellules de Schwann, ceci pouvant jouer un rôle dans la régénération nerveuse suivant une transection (Dezawa *et al.*, 1998).

1.4.1.2.4. Les intégrines de la myéline

Les intégrines représentent un sujet central de cette thèse, un chapitre leur est donc réservé au chapitre 4.

1.4.2. Les lipides

Chez les mammifères et les non mammifères, les lipides représentent entre 72 et 78 % de la masse sèche de la myéline du SNP. Durant la phase active de myélinisation, les cellules de Schwann génèrent une quantité énorme de lipides durant une période de temps relativement court. La membrane de la myéline est unique en son genre. Cependant, ce ne sont pas les espèces lipidiques qui la composent qui la rendent originale mais plutôt les proportions de ces espèces lipidiques (Table 1).

Pourcentage en lipide par rapport aux lipides totaux

Lipides	Myéline	Membrane plasmique du foie	Membrane plasmique du globule rouge	Membrane de mitochondrie (membrane interne et externe)	Réticulum endoplasmique	Bactérie E. coli
Cholestérol	22	17	23	3	6	0
Phosphatidyléthanolamine	15	7	18	28	17	70
Phosphatidylsérine	9	4	7	2	5	Traces
Phosphatidylcholine	10	24	17	44	40	0
Sphingomyéline	8	19	18	0	5	0
Glycolipides	28	7	3	Traces	Traces	0
Autres	8	22	13	23	27	30
		Membranes externes		Membranes internes		
		Eucaryotes			Procaryotes	

Table 1 : composition approximative en lipides de différentes membranes cellulaires de *Molecular biology of the cell* (Garland Science 2008)

Les lipides les plus importants de la myéline sont le cholestérol et les glycolipides. Ces lipides sont capables de former une organisation serrée permettant la compaction de la myéline.

Le cholestérol représente entre 20 et 30 % du total des lipides du système nerveux périphérique. Dans les nerfs sciatiques de souris et de lapin, le cholestérol s'accumule continuellement à partir de la néomyélinisation et durant les différentes périodes de la maturation myélinique (Juguelin *et al.*, 1986; Yates and Wherrett, 1974). Cette accumulation est corrélée au rôle de ce lipide dans la stabilisation et la compaction des membranes myéliniques multilamellaires. En effet, le cholestérol est impliqué dans une grande quantité de processus intracellulaires requérant une dynamique de membrane particulière comprenant la formation de « raft » ou des transductions de signal. Dans le système nerveux périphérique, les CS synthétisent tout le cholestérol dont elles ont besoin pour la myélinisation (Fu *et al.*, 1998). Des niveaux élevés de cholestérol sont indispensables pour l'expression de gènes codant des protéines indispensables pour la myélinisation et sa compaction comme P0 (Saher *et al.*, 2009). Parmi les glycolipides de la myéline, les galactosylcéramides et les sulfatides, avec de longues chaînes d'acides gras, sont les lipides les plus typiques de la myéline. Un défaut sur la voie de synthèse de ces lipides peut induire une neuropathie héréditaire sensorielle et autonome de type 1 (HSAN-1), il s'agit d'une neuropathie axonale conduisant à une perte de sensibilité progressive et de sévères ulcères (Bejaoui *et al.*, 2001). Quand les galactosylcéramides et les sulfatides sont incorporés dans les feuillettes de la myéline, ils sont stabilisés par de multiples interactions dans toutes les directions possibles (Fitzner *et al.*, 2006). Pourtant, la myéline est fluide. En effet, les lipides doivent pouvoir se déplacer de manière latérale jusqu'à rejoindre des régions riches en cytoplasme, où l'endocytose est possible et où le transport vésiculaire est initialisé. En effet, l'enzyme lysosomale, responsable du catabolisme des galactosylcéramides et des sulfatides, n'est pas présente dans la myéline elle-même, mais au sein des corps cellulaires des oligodendrocytes les lipides doivent faire un long trajet en arrière avant leur dégradation. Ces deux lipides paraissent jouer le rôle de stabilisateur de la myéline (Schmitt *et al.*, 2014).

1.5. La dynamique de la myéline

1.5.1. Origine embryonnaire

Les CS myélinisantes et non myélinisantes sont dérivées des cellules de la crête neurale à partir de précurseurs se différenciant en CS matures myélinisantes et non myélinisantes (Figure 14). Les facteurs de croissance, les molécules d'adhérence et les facteurs de transcription sont associés à chaque stade du développement (Jessen and Mirsky, 2005; Woodhoo *et al.*, 2009).

Le développement des CS passe par différentes étapes liées en grande partie aux interactions avec les axones (Figure 14). Le rôle des CS n'est pas restreint à l'enrobage de l'axone mais implique aussi la production de la matrice extracellulaire (MEC) entourant chaque axone et composant les nerfs. Les CS sécrètent de la laminine ainsi que plusieurs collagènes, notamment de types I, III et IV, et cette sécrétion produit la membrane basale qui entoure chaque axone (Bunge and Bunge, 1986). Elles sont aussi responsables de la formation et du maintien des nœuds de Ranvier, ainsi que de l'intégrité de l'axone (Martini, 2001). Elles jouent aussi un rôle très important lors de la régénération du SNP (Terenghi, 1999).

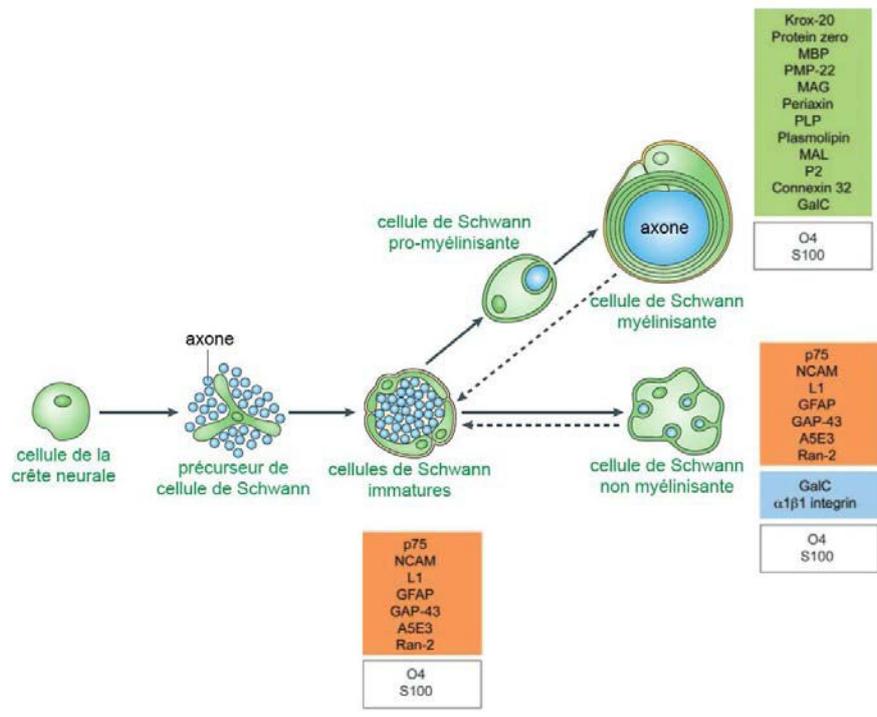


Figure 14 : Schéma du processus de maturation des CS (Mizisin and Weerasuriya, 2011)

Le développement embryonnaire des CS comprend plusieurs stades : les cellules de la crête neurale, les précurseurs de CS et enfin les CS immatures. Le destin de ces cellules dépend du diamètre de l'axone auquel elles sont associées et de facteurs neuronaux. La différenciation est réversible lorsque l'interaction neurone/Schwann est perdue (flèches en pointillé).

L'encadré vert indique les marqueurs des CS myélinisantes, l'orange présente ceux des CS non myélinisantes, le bleu, les facteurs spécifiques aux CS non myélinisantes. Le passage du stade cellule de Schwann immature à cellule de Schwann myélinisantes se fait grâce à un équilibre dans la régulation des facteurs.

1.5.1.1. Des CS embryonnaires aux CS matures

Durant la myélinisation, les protéines Krox-20, MAG, P0, MBP, PMP22, plasmolipine et galactocérobroside sont fortement exprimées par les cellules de Schwann myélinisantes (Figure 14). Le passage au dernier stade de différenciation est aussi caractérisé par l'inhibition de l'expression des molécules exprimées au stade des CS immatures, telles que L1, NCAM et le récepteur des neurotrophines p75. Ces molécules demeurent cependant exprimées dans les CS non myélinisantes. Les CS immatures se différencient en CS matures myélinisantes et non myélinisantes en fonction des axones auxquelles elles sont associées. En effet, toutes les CS immatures sont considérées comme ayant un potentiel équivalent à myéliniser ou non (Jessen and Mirsky, 2005; Nave and Salzer, 2006). L'engagement dans le processus de myélinisation est dicté par les axones.

Le signal de myélinisation est porté par les axones eux-mêmes. La molécule clé de ce signal est NRG1. NRG1 type III est présente à la surface des axones et la quantité exprimée, elle-même dépendante du diamètre axonal, dicte le devenir des CS associées aux axones. Les axones exprimant un fort niveau de NRG1 (les axones moteurs et une partie des axones sensoriels) sont myélinisés par les CS, tandis que les axones exprimant un faible niveau de NRG1 ne le sont pas (Taveggia *et al.*, 2005). D'autre part, l'épaisseur de la gaine de myéline est elle aussi fonction du diamètre axonal. Et c'est encore NRG1 qui contrôle ce paramètre. Le taux de NRG1 pourrait en effet être un indicateur permettant aux CS de sonder la taille de l'axone et de former une gaine de myéline conséquente (Michailov *et al.*, 2004).

1.5.2. Etablissement de la myéline

1.5.2.1. Initialisation de la formation de la gaine de myéline

Le passage de cellules de la crête neurale en CS myélinisantes se déroule en plusieurs étapes impliquant des variations d'expression de nombreuses protéines de la myéline. (Snipes and Suter, 1995). L'expression de certains facteurs de transcription est indispensable pour une bonne initiation de la formation de la gaine de myéline (Figure 15).

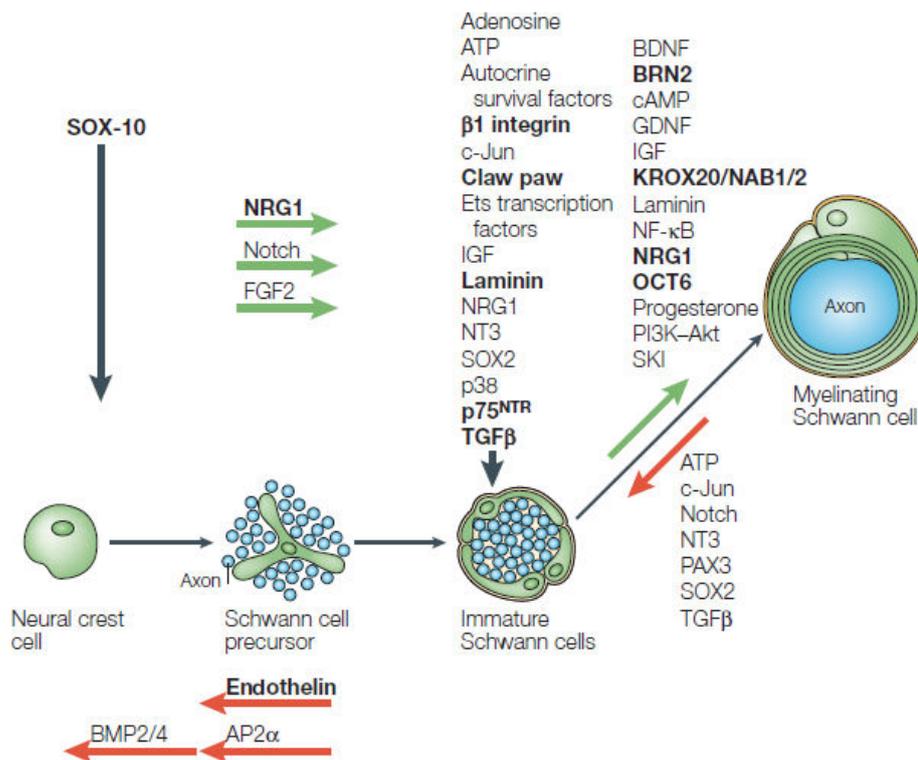


Figure 15 : Facteurs influençant la différenciation des CS vers un phénotype myélinisant (Jessen and Mirsky, 2005)

L'expression du facteur de transcription Krox 20 est notamment impliquée dans cette maturation des CS puisque son inactivation va empêcher l'enroulement des CS autour des axones et bloquer l'expression des protéines de la myéline inhibant la formation de celle-ci (Topilko *et al.*, 1994). Le diamètre axonal est aussi un signal clé pour la myélinisation par les CS. Le diamètre seuil est assez invariable et se situe autour de 1 μ m, tout comme l'est le ratio *diamètre de l'axone / (diamètre de l'axone + myéline)*. Cette valeur est appelée « g ratio » et est approximativement de 0,68. De plus, l'expression des gènes liés à la myéline est contrôlée par les principaux régulateurs de la transcription que sont SOX 10, KROX20/Egr2, OCT6/Pou3f1 (Birmingham *et al.*, 1996; Finzsch, Schreiner, Kichko, Reeh, Ernst R Tamm, *et al.*, 2010; Topilko *et al.*, 1994). Cependant, plus récemment, il est devenu évident que leurs activités sont aussi associées à des voies de régulations impliquant des remodelages de la chromatine, des modifications d'histones, et de la méthylation de l'ADN (Liu and Casaccia, 2010). Par ailleurs, le taux de transcription de gènes impliqués dans la myéline et l'abondance des protéines correspondantes ne sont pas forcément corrélés, comme si des régulateurs des ARN affectaient la stabilité des ARNm (Barca-Mayo and Lu, 2012). Ensemble, ces études ont mis en lumière que le programme des cellules pour la myélinisation implique à la fois des activations de transcription de

gènes liés à la myéline et une dépression simultanée des facteurs empêchant leur transcription (Liu and Casaccia, 2010; Swiss *et al.*, 2011).

1.5.2.2. Engagement dans le processus de myélinisation

L'engagement dans le processus de myélinisation est sous le contrôle de deux réseaux transcriptionnels antagonistes régulés par les signaux axonaux (Figure 16) (Jessen and Mirsky, 2005; Svaren and Meijer, 2008), l'un « myélinisant » et l'autre « démyélinisant ».

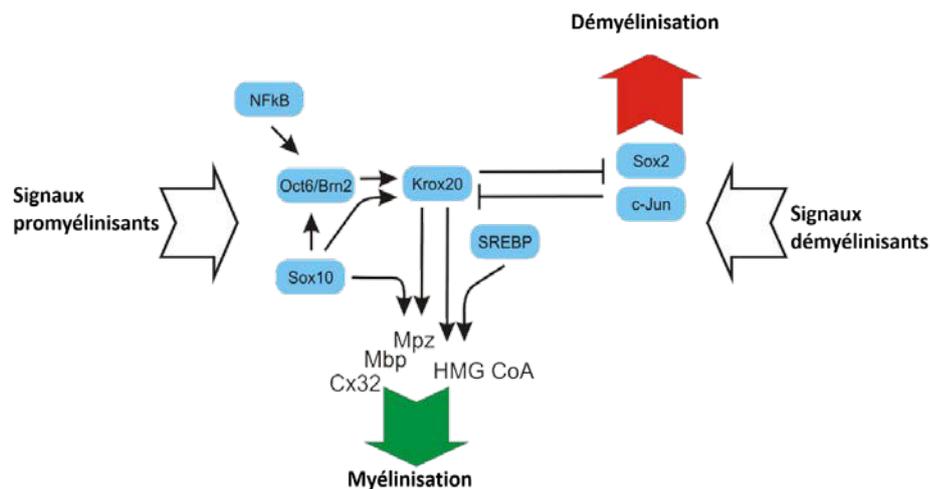


Figure 16 : Deux programmes transcriptionnels s'affrontent au sein des CS pour le contrôle de l'engagement dans la myélinisation (Svaren and Meijer, 2008)

Les facteurs de transcription principaux activant ou inhibant le processus de myélinisation, ainsi que leurs relations les uns par rapport aux autres sont représentés sur ce schéma. Les signaux promyélinisants et démyélinisants émanent, pour la majorité d'entre eux, des axones eux-mêmes.

Ainsi OCT-6/SCIP, BRN2 et SOX10 (régulant Krox- 20/EGR2) appartiennent au « circuit myélinisant » et constituent la colonne vertébrale du circuit de régulation de la myélinisation, alors que le circuit antagoniste de la régulation de Krox-20/EGR2 (aboutissant à la démyélinisation) est sous le contrôle de c-jun et SOX2 (Cosgaya *et al.*, 2002). OCT-6 et BRN2 sont des membres de la famille des protéines POU, protéines de transcription ayant conservées un homéodomaine, c'est à dire un groupe d'acides aminés capable de fixer l'ADN. L'acronyme POU est dérivé du nom de trois facteurs de transcription : Pituitary-specific (PIT1), Octamer transcription factor proteins OCT-1 and OCT-2, and Neural Unc-86 [149]. L'expression d'OCT-6 est elle-même régulée par des signaux en provenance de l'axone, telle la neuroréguline-1 de type III (Brückner, 2011).

Krox-20/EGR2 est un membre de la famille des gènes EGR (early growth factor). Dans les cellules de Schwann embryonnaires (à l'initiation du processus de myélinisation), il est co-exprimé avec Krox-24/EGR1. En revanche, un mois après la naissance, il n'est plus exprimé qu'au niveau des cellules de Schwann myélinisées, Krox-24/EGR1 n'étant plus exprimé qu'au niveau des cellules de Schwann non myélinisées (Wegner and Stolt, 2005). EGR1 pourrait ainsi réguler l'expression de p75NTR (exprimé par les cellules de Schwann non myélinisées), un autre élément crucial à l'obtention d'une myélinisation optimale (Monuki *et al.*, 1993). Krox-20/EGR2 représente une cible majeure de OCT-6 et de BRN2, et l'activation de Krox-20 est rendue possible par le biais du mSCE (myelin-associated Schwann cell enhancer) (Peirano *et al.*, 2000).

SOX10 est une molécule appartenant à la classe des E des facteurs SOX (Schlierf *et al.*, 2002) ; elle est exprimé à toutes les étapes du développement des cellules de Schwann (Phillips and Luisi, 2000). SOX10 active Krox-20, mais active également OCT6 et BRN2 qui jouent le rôle à leur tour, d'activateurs d'expression du gène Krox-20/EGR2 (Cosgaya *et al.*, 2002). Toutefois, OCT-6 pourrait également se comporter comme un « limitateur de fonction » d'autres protéines exprimées dans la myéline, comme MPZ (myelin protein zero) et MBP (Myelin basic protein) (Jurevics and Morell, 1994). D'ailleurs, SOX10 est également requise pour l'expression embryologique du gène MPZ, et porte plusieurs sites promoteurs de ce gène (Verheijen *et al.*, 2003).

Un autre élément fondamental dans le processus de myélinisation est la coordination de la synthèse intra-nerveuse des lipides, puisque ces derniers sont présents en quantité abondante pour former la structure de la gaine de myéline. Ainsi, la plupart du cholestérol requis n'est pas exogène, mais est tout simplement produit sur place (Melcangi *et al.*, 1999). Par ailleurs, lors d'un processus de myélinisation ou après lésion nerveuse, il a été établi que la biosynthèse des lipides était tout à fait coordonnée dans le nerf (Magnaghi *et al.*, 2007). Certains facteurs connus pour réguler la biosynthèse des acides gras et du cholestérol, comme SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein), sont également exprimés dans les cellules de Schwann lors du processus de myélinisation. SREBP est requis pour la myélinisation (Magnaghi *et al.*, 2001).

Chapitre 2. PMP22

La protéine PMP22 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée au niveau des internœuds de la myéline. Elle représente 2 à 5 % du total des protéines de la myéline du SNP (Snipes, 1992; Welcher *et al.*, 1992). Son importance fonctionnelle est mise en évidence par le fait qu'une duplication du gène de *PMP22* va entraîner un désordre héréditaire du nerf appelé maladie de Charcot-Marie-Tooth et qu'une délétion de *PMP22* va entraîner une neuropathie héréditaire avec hyper sensibilité à la pression (HNPP). Cependant le rôle de *PMP22* n'est toujours pas clairement établi et on ne comprend pas bien sa pathogénie dans les CMT et les HNPP.

2.1. Le gène PMP22

Au sein du génome humain, *PMP22* est localisé sur le chromosome 17q11.2 (Figure 17 A) Il s'agit d'un gène de 40 kb composé de 6 exons conservés chez les humains comme chez les rongeurs dont 4 sont codants et 2 sont non-codants (Figure 17 C).

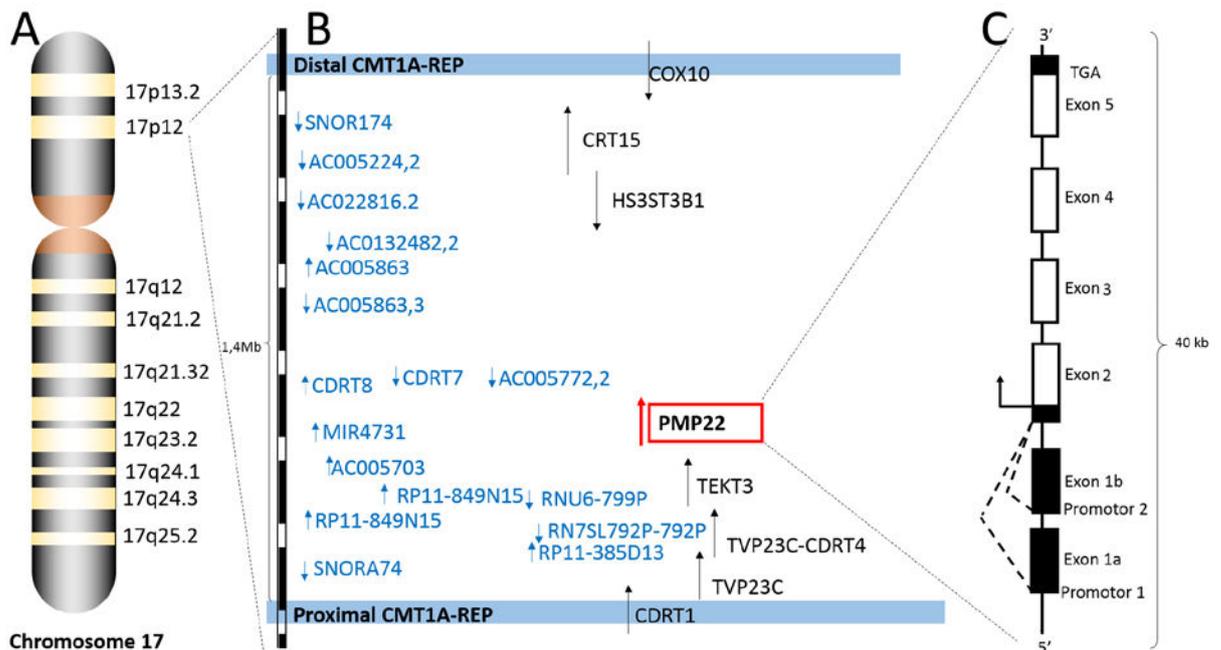


Figure 17 : Le chromosome 17, la région entourant PMP22, le gène PMP22

A) Représentation schématique du chromosome 17 humain contenant le gène *PMP22*.

B) Zoom sur la région de 1,4 Mb entourant *PMP22* (en bleu les gènes produisant des ARN non codants et en noir les gènes codants).

C) Structure détaillée du gène *PMP22*, l'exon 1a contient un promoteur exprimé majoritairement au sein des SC, l'exon 1b contient un promoteur exprimé dans les cellules non neurales.

L'induction de *PMP22* est régulée par plusieurs facteurs de transcription, notamment par Egr2 (early growth response 2), élément clé de la régulation des gènes de la myéline lors du développement embryonnaire (Decker *et al.*, 2006). Sox 10 quant à lui, est nécessaire lors de plusieurs étapes de développement des cellules de Schwann pour activer le gène *PMP22*. (Finzsch, Schreiner, Kichko, Reeh, Ernst R. Tamm, *et al.*, 2010).

Il existe en amont du gène de *PMP22* des régions critiques à sa régulation. En effet, une région intronique de 11kb, qui est dirigée à la fois par Egr2 et Sox 10 a été mise en évidence (Jones *et al.*, 2012).

2.2. Epissage alternatif de PMP22

A ce jour, ce sont 6 variants issus d'épissages alternatifs qui ont été mis en évidence (Tableau 1) (Suter *et al.*, 1994; Visigalli *et al.*, 2016). Le variant 1 est le plus exprimé dans l'organisme avec une très forte expression dans le SNP (Figure 18). Le variant 2 est plus ubiquitaire, on le retrouve dans le SNC mais aussi dans les reins (Suter *et al.*, 1994) (Figure 18) (Tableau 1).

Les variants 1 et 2 sont exprimés grâce à deux promoteurs qui leur sont spécifiques situés dans l'exon 1a et 1b (Figure 17 C).(Suter *et al.*, 1994). Les variants 4,5 et 6 ont été identifiés très récemment (Visigalli *et al.*, 2016). Bien que plus faiblement exprimés que le variant 1, les auteurs ont démontré qu'ils étaient spécifiques au SNP (Figure 18). Les variants d'épissage 1, 2 et 3 codent la même protéine de 18 kDa alors que les variants 4, 5 et 6 codent une nouvelle isoforme de PMP22 de 13kDa (Visigalli *et al.*, 2016).

Nom	Combinaison d'exons	GenBank	Ensembl	Taille (pb)	Tissus de la 1 ^{ère} identification
Variant 1	Ex1a–Ex2–Ex3–Ex4–Ex5	NM_000304.3	ENST00000312280	1810	Moelle épinière Matière blanche Nerf
Variant 2	Ex1b–Ex2–Ex3–Ex4–Ex5	NM_153321.2	ENST00000395938	1817	Reins Cellules HeLa Placenta Cerveau
Variant 3	Ex2–Ex3–Ex4–Ex5	NM_153322.2	ENST00000426385	1669	Non déterminé
Variant 4	Ex1a–Ex4–Ex5	KR259962	ENST00000494511	871	Hypothalamus Matière blanche
Variant 5	Ex1a–Ex2–Ex3–Ex4– Ex4.1	KR259963	ENST00000428538	565	Placenta
Variant 6	Ex1b–Ex2–Ex3–Ex4– Ex4.1–Ex5	KR259964	ENST00000395936	816	Placenta

Tableau 1 : liste des 6 variants de PMP22 humain

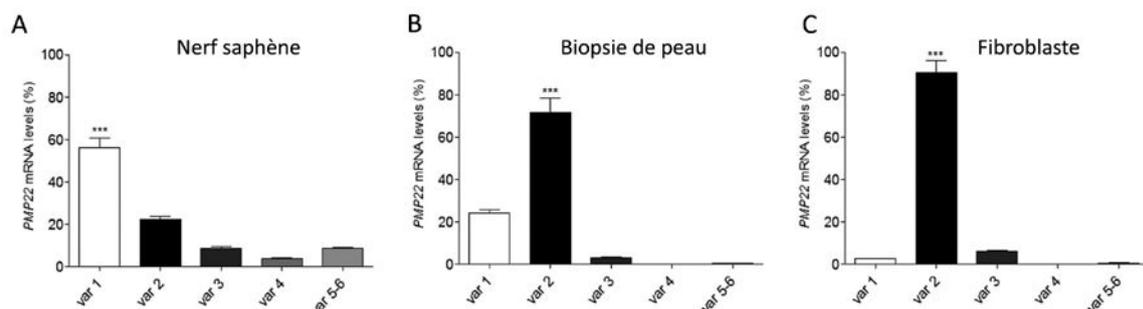


Figure 18 : Comparaison des niveaux d'expression des ARNm des 6 variants de PMP22 au sein de 3 différents tissus (Visigalli *et al.*, 2016).

2.3. La protéine PMP22

PMP22 appartient à la famille des claudines. Cette famille est associée à une large variété de processus cellulaires (Simske, 2013) tels que des récepteurs d'adhérence ou impliqués dans le trafic paracellulaire. PMP22 partage plus de 20 % d'homologie de sa séquence d'acides aminés avec celle de la claudine-1, une protéine membranaire identifiée comme un composant majeur des jonctions

étroites (Simske, 2013). Pour les variants majoritaires 1,2 et 3, PMP22 est une protéine à 4 domaines transmembranaires (comme la claudine) mais pour les variants minoritaires 4, 5 et 6, PMP22 serait alors une protéine à 2 domaines transmembranaires.

Nous allons nous intéresser au variant 1 qui représente la forme très majoritaire de PMP22. Il s'agit d'une glycoprotéine de la myéline du système nerveux périphérique. C'est aussi un constituant de jonctions intercellulaires de l'épithélium. Chez l'humain et le bovin, il s'agit d'une protéine de 160 acides aminés et 161 chez le rat. Cette protéine est hautement conservée entre les espèces. On y observe une homologie de séquence de 87 % entre humain et souris ainsi qu'entre humain et rat (Figure 19).

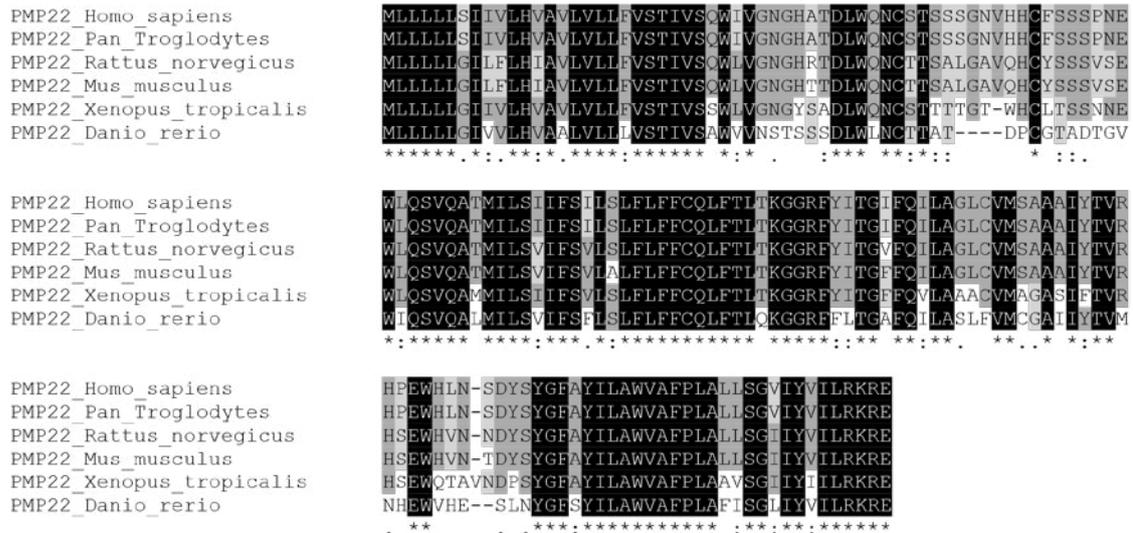


Figure 19 : Comparaison des séquences d'acides aminés de la protéine PMP22 entre différentes espèces. (Humain, Chimpanzé, rat, souris, xénope et poisson zèbre)

Les séquences ont été alignées en utilisant clustal O (1.2.1). En noir apparaissent les acides aminés conservés chez les 6 espèces, en gris foncé les acides aminés conservés chez au moins 3 espèces, en gris clair les acides aminés conservés chez au moins deux espèces.

Cependant, en ce qui concerne sa structure tridimensionnelle, la protéine PMP22 n'a, à ce jour, pas pu être cristallisée. Cependant nous connaissons tout de même sa structure putative : 4 domaines transmembranaires et deux domaines extracellulaires. Cette protéine dispose d'un segment amino-terminal hydrophobe fonctionnant comme un peptide d'initialisation de transfert permettant de diriger l'expression de PMP22 à la membrane. Ce peptide n'est pas clivé, indiquant que la protéine traverse de part en part la membrane. Les domaines transmembranaires représentent la majorité de la protéine (Figure 20).

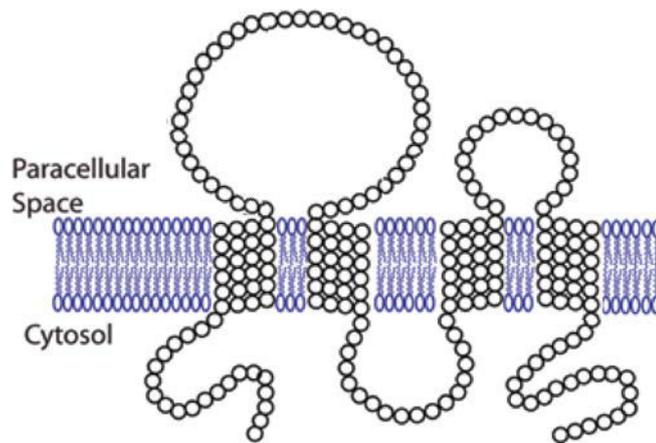


Figure 20 : Représentation topologique de la protéine PMP22 (Simske, 2013)

L'expression de PMP22 augmente au moment du contact entre l'axone et les cellules de Schwann myélinisantes (Suter *et al.*, 1992). Cette variation d'expression doit cependant être régulée avec précision. PMP22 est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, il s'agit d'une protéine précurseur de 18kDa. Juste après sa synthèse, PMP22 est temporairement retenue au sein des compartiments du réticulum endoplasmique ainsi que dans l'appareil de Golgi (Pareek *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 2002). Ces organites permettent diverses modifications post traductionnelles comme des glycosylations avant de rejoindre la membrane plasmique. Cependant, en raison de la complexité de sa N-glycosylation une large majorité de protéines PMP22 nouvellement synthétisées va être dégradée (70 % sur des cellules de Schwann de rat ou des co-cultures de cellules de Schwann de rats et neurones)(Ryan *et al.*, 2002). Donc, seule une petite proportion de PMP22 est transportée à la surface cellulaire. Il a été démontré que la glycosylation complexe de PMP22 permettait de prévenir sa dégradation et permettait son transport à la surface de la cellule (Pareek *et al.*, 1997). Au sein du réticulum endoplasmique, PMP22 est associée à la calnexine. La calnexine agit comme une chaperonne pour le bon repliement de PMP22 (Dickson *et al.*, 2002).

La protéine PMP22 est surtout exprimée dans les feuillettes de myéline compacte dont elle représente entre 2 et 5 % des protéines (Mobley *et al.*, 2007) (Figure 21). La protéine PMP22 est exprimée par les cellules de Schwann myélinisantes mais aussi par les ganglions de la racine dorsale. PMP22 est aussi exprimée au sein d'autres tissus comme les cellules de la crête neurale, des nerfs crâniens, le cœur, l'intestin et la cochlée dans lesquelles elle pourrait être impliquée dans des processus cellulaires liés au développement et à la différenciation tissulaire (Taylor *et al.*, 1995). En effet, en modulant les niveaux de PMP22 il a été montré que PMP22 jouait un rôle dans le cycle cellulaire (Zoidl *et al.*, 1995).

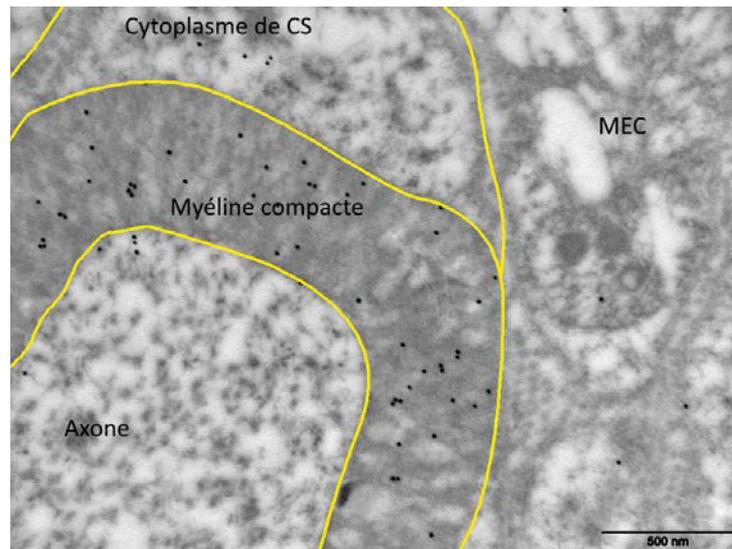


Figure 21 : Localisation de l'expression de la protéine PMP22

Coupe ultrafine de fibre nerveuse myélinisée de nerf de rat immuno-marqué spécifiquement avec un anticorps anti-PMP22 (protocole immunogold) (échelle 500 nm)

Beaucoup de domaines protéiques de PMP22 n'ont pas encore été identifiés. Le seul domaine confirmé à ce jour est le domaine de N-Glycosylation situé sur l'asparagine 41 de PMP22 les autres sont encore putatifs.

La protéine PMP22 disposerait de 2 sites de fixations de cations divalents (Myers *et al.*, 2008). Ces sites de fixations se trouveraient dans les boucles extracellulaires de PMP22. De plus, la myéline est riche en Zn(II) et en Cu(II) ; il est donc très probable que la fixation de ces ions influencerait le repliement de la protéine PMP22 au sein de la cellule. En effet, il a été montré récemment que la fixation de ces ions métalliques était thermodynamiquement couplée à la formation de la structure tertiaire des protéines (Schlebach *et al.*, 2015). Les auteurs ont aussi montré que PMP22 n'est pas correctement et complètement repliée en l'absence de ces ions. Cependant, on ne sait pas encore précisément où se trouvent ces sites de fixations sur la protéine PMP22.

Certains sites peuvent être prédits par des méthodes d'identification de motifs. Une séquence motif est une séquence d'acides aminés ayant une signification biologique.

Ces autres domaines sont listés dans le tableau ci-dessous :

Motifs	Number of motif repetition	Coordinates	Sequences
Penicillin binding motif	2	47-49, 57-59	SGN, SPN
N-glycosylation	1	41-43	NCS (confirmed)
C-glycosylation	2	39-42, 140-143	WQNC, WVAF
CRAC motif	1	147-159	LLSQVIRVILRKR
Phosphorylation by PKC motif	1	118 - 120	TVR
Phosphorylation by CK2 motif	1	57 - 60	SPNE
Multifunctional binding motif in transcription regulation	1	2-6	LLLLL
SUMOylation motifs	1	152-155	IYVI
Cleavage site of hemagglutinin	2	92-95, 157-159	KGGR, RKR
Prenylation site	1	109-112	CVMS
Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM, KTIM	1	151-156	VIYVIL

Table 2 : motifs de séquence identifiés sur la séquence de la protéine PMP22. (Sedzik et al., 2013)

2.4. Les interactions de PMP22

La protéine PMP22 est capable d'interagir avec d'autres protéines PMP22 au travers d'interactions trans-homophiliques médiées par la première boucle extracellulaire (Hasse *et al.*, 2004) (Figure 22). Cependant PMP22 est capable d'interagir avec d'autres protéines.

2.4.1. P0, La protéine de la compaction

Comme décrit précédemment, P0 est une protéine qui abonde dans le SNP. De plus, il a été démontré que PMP22 et P0 pouvaient interagir directement au travers de relations trans-homophiliques et trans-hétérophiliques (Hasse *et al.*, 2004). La relation trans-hétérophilique est médiée par la seconde boucle de PMP22 (Hasse *et al.*, 2004) (Figure 22).

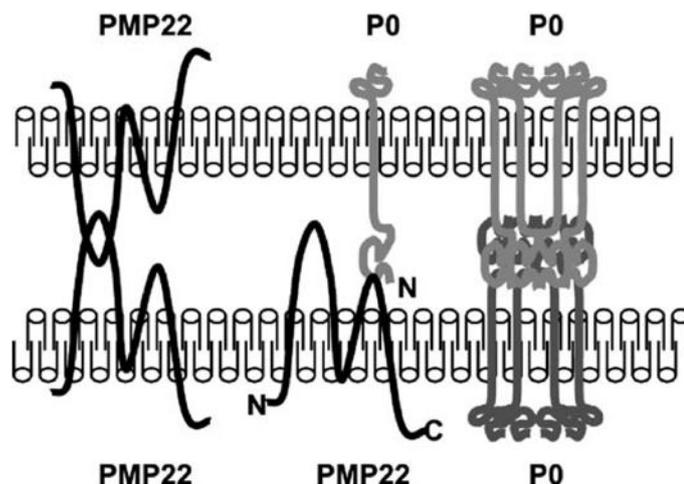


Figure 22 : représentation schématique des 3 types de trans-interactions entre PMP22 et P0 dans la myéline périphérique (Hasse et al., 2004)

Par ailleurs, dans les cellules de Schwann de souris adultes dont P0 a été inactivé, l'expression de PMP22 est diminuée tandis que les expressions de MAG et PLP sont augmentées, l'expression de MBP, quant à elle, demeure inchangée (Xu *et al.*, 2000). Ceci suggère une relation très étroite entre PMP22 et P0, dans laquelle P0 serait nécessaire à l'expression normale de PMP22.

2.4.2. Interactions de PMP22 avec les intégrines

Cette interaction de PMP22 représente un aspect central de cette thèse. Un chapitre lui est réservé. (Voir chapitre 4).

2.5. Les pathologies du système nerveux périphérique liées à la protéine PMP22

Les neuropathies dues au gène *PMP22* peuvent être subdivisées en 3 groupes. Le premier groupe est provoqué par une duplication de *PMP22*, et constitue le plus grand groupe : la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A (CMT1A). Le second groupe est provoqué par une délétion du gène *PMP22*, conduisant à une neuropathie héréditaire avec une hypersensibilité à la pression (HNPP for Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies). Le troisième groupe est composé des neuropathies dues à une mutation ponctuelle au sein du gène *PMP22*, elles sont classifiées soit en CMT1A ou CMT1E

2.5.1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) représente un groupe de maladies cliniquement et génétiquement hétérogènes, caractérisées par une atteinte des nerfs périphériques. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1886 par Charcot et Marie en France et indépendamment par Tooth au Royaume-Uni. La CMT est la maladie neuromusculaire héréditaire la plus commune. Plus de 80 gènes responsables de cette maladie ont été identifiés. Malgré une forte hétérogénéité génique, le phénotype clinique de cette maladie est assez homogène. La classification de cette maladie est fondée sur une combinaison des caractéristiques neurophysiologiques, sur la transmission, et les mutations génétiques. Fondé sur les observations neurophysiologiques, 3 sous-types de cette maladie sont distingués :

Le type démyélinisant : CMT1 défini par une vitesse de conduction moteur (MCV) du nerf médian ou ulnaire en dessous de 38 m/s. Le type axonal : CMT2 avec une MCV autour de 38 m/s et le type intermédiaire. Ce dernier terme est utilisé pour les individus avec une MCV comprise entre 30 et 40 m/s, chez les individus avec des preuves cliniques et histopathologie d'anormalités à la fois myéliniques et axonales et chez les familles dont les membres ont soit une atteinte démyélinisante ou une atteinte axonale.

La CMT peut être transmise de manière autosomale dominante, autosomale récessive ou liée à l'X. Cette atteinte entraîne principalement un manque de force musculaire, des troubles de la sensibilité des pieds et des mains et des troubles de l'équilibre. Elle débute la plupart du temps dans l'enfance ou chez le jeune adulte par des difficultés à la marche ou des déformations des pieds.

2.5.2. Le CMT1A et HNPP

2.5.2.1. Phénotype clinique

Concernant les patients atteints de CMT1A : les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement durant les 20 premières années de la vie des patients. Avant les premiers symptômes dits caractéristiques de la maladie, les patients sont souvent décrits comme des coureurs lents, ayant des difficultés en sport durant l'enfance, il arrive même qu'ils développent des déformations des pieds (orteils en marteau et pieds creux) requérant un suivi orthopédique à l'âge adulte.

Les patients CMT1A présentent différents phénotypes typiques de cette maladie comme par exemple des faiblesses de la main, suivies généralement de faiblesses dans les pieds. Ces patients présentent aussi des déficits sensoriels sur le plan large (vibration et proprioception) ainsi que sur de plus faibles plans (douleurs et température). La combinaison de la faiblesse observée dans les membres et des déficits sensoriels conduit généralement à des problèmes d'équilibre. Une large majorité des patients demeure néanmoins capable de se déplacer tout au long de leur vie. Leur espérance de vie n'est, par ailleurs, pas diminuée par la maladie. De plus, presque tous les patients CMT1A ont une absence de réflexes tendineux. Des symptômes additionnels sont retrouvés chez certains patients CMT1A incluant des tremblements des membres et des crampes musculaires. Ces phénotypes représentent les symptômes classiques du CMT1A, c'est leur sévérité qui s'avère être très variable entre les individus, y compris au sein d'une même famille. En effet, certains patients vont développer des symptômes très sévères durant l'enfance alors que d'autres ne vont présenter que de très légers symptômes et ce, tout au long de leur vie.

L'HNPP est une maladie autosomique dominante produisant une neuropathie motrice sensitive épisodique et récurrente (Li *et al.*, 2004). Les symptômes communs aux différents patients sont un engourdissement focal, une faiblesse musculaire et une atrophie usuellement présente à partir de l'adolescence. Ces différents déficits focaux sont souvent provoqués par des stress mécaniques au sein des nerfs périphériques, comme des compressions (Li *et al.*, 2004). Les symptômes des HNPP se manifestent fréquemment au niveau des sites de neuropathies canalaire comme au niveau du nerf sciatique poplité externe à travers la tête fibulaire, au niveau du nerf médian dans le poignet et du nerf cubital à travers le coude. Une activité physique fatigante peut même entraîner la paralysie des membres avec d'importantes lésions axonales, suggérant que les axones peuvent être affectés si le stress est suffisamment sévère (Horowitz *et al.*, 2004). Les examens physiques ne permettent habituellement que la mise en évidence de très légères lésions qui restent néanmoins significatives. Des pertes de sensibilité, des faiblesses et atrophies musculaires dans les mains et ou les pieds sont souvent observées chez les patients plus âgés.

2.5.2.2. Génétique du CMT1A et de l'HNPP

La CMT1A est provoquée par une duplication de 1,5 Mb sur le chromosome 17p11.2 contenant le gène *PMP22*. La délétion de cette même région entraîne l'HNPP. Cette région est définie sur la Figure 17. La duplication (pour le CMT1A) et la délétion (pour l'HNPP) sont le résultat d'un crossing-over inégal et d'une recombinaison réciproque entre des séquences homologues flanquantes de 24kb nommées CMT1A-REPS (Inoue *et al.*, 2001; Lupski, 1998) (Figure 17B).

Cette région qui entoure *PMP22* est riche en gènes mais le rôle de nombre d'entre eux demeure peu connu voir inconnu. Par exemple, le gène *CDRT1* (CMT1A duplicated region transcript 1 protein) est un gène de 1,3 kb. On sait que la protéine codée par ce gène est exprimée dans le pancréas, le cœur et dans les muscles squelettiques. Cependant son rôle dans ces organes n'est pas établi (Zody *et al.*, 2006).

Il existe des cas de CMT1A avec des tailles de duplications différentes mais ces duplications contiennent toujours le gène *PMP22* ou la région en amont de *PMP22*. Il existe 2 autres régions en amont qui, lorsqu'elles sont dupliquées provoquent des neuropathies périphériques comparables à celles des patients CMT1A avec la duplication classique de 1,4Mb (Weterman *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). La première est une région de 186kb située à 3kb en amont de *PMP22* (cette région contient *TEKT3*) (Weterman *et al.*, 2010). La seconde se trouve 9kb en amont de *PMP22* et est longue de 194 kb (Zhang *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que les 3 régions dont nous venons de parler ont des sites de fixation ayant une forte affinité pour *Egr2* ainsi que *Sox10*. Cependant il n'y a pas d'informations supplémentaires concernant ces deux régions à l'heure actuelle.

Par ailleurs, des mutations ponctuelles sur *PMP22* peuvent entraîner l'apparition des deux maladies : le CMT1E ou l'HNPP (Figure 23) (On parle de CMT1E plutôt que de CMT1A lors de mutations ponctuelles sur *PMP22*). Les symptômes cliniques, les vitesses de conceptions nerveuses et la pathologie des nerfs sont identiques pour le CMT1E et le CMT1A)

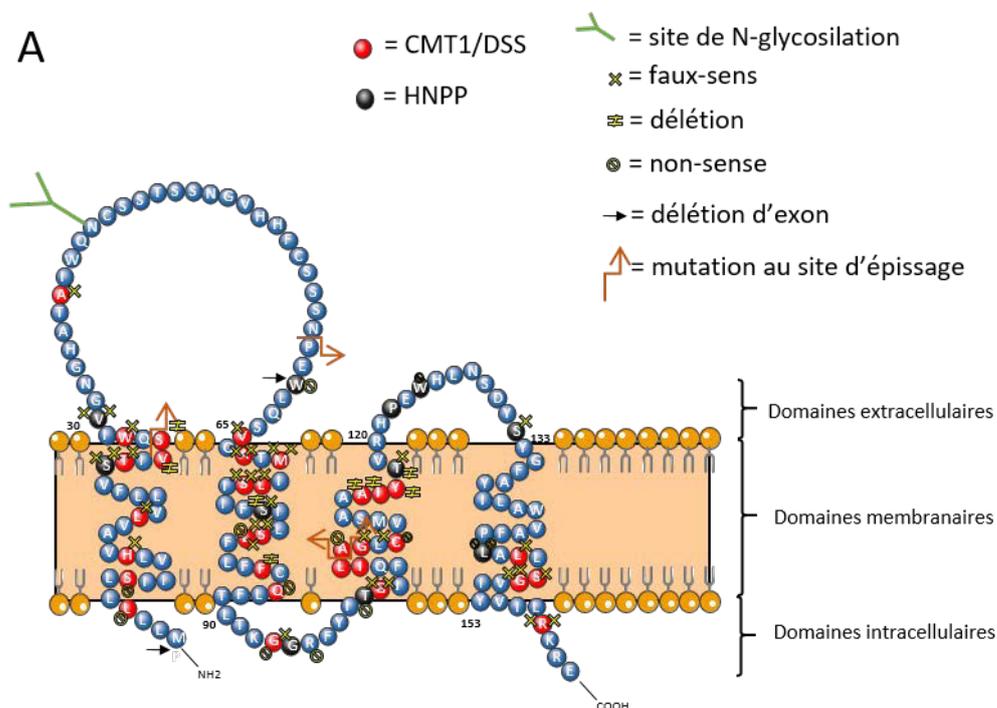


Figure 23 : Représentation de la protéine *PMP22* avec les mutations ponctuelles connues

En rouge celles associées à un CMT1A et en noir celles associées à une HNPP.

Le gène *PMP22* est dépendant de son dosage, (une augmentation du nombre de copie de ce gène augmente la quantité de protéine produite de manière proportionnelle) donc sa duplication provoque une sur-expression de la protéine PMP22 qui s'accumule alors au sein de la myéline compacte (Figure 24). Pourtant cette sur-expression de la protéine PMP22 parvient difficilement à expliquer les phénotypes du CMT1A.

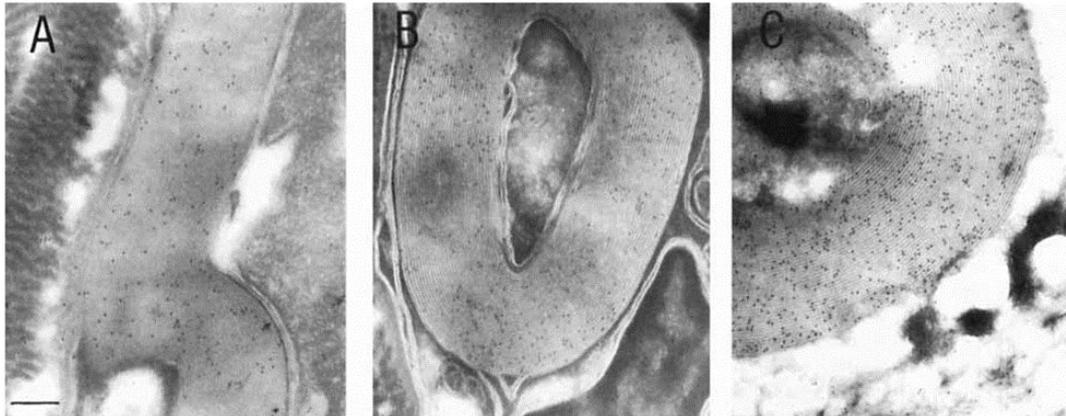


Figure 24 : Section transversale ultrafine de fibres nerveuses périphériques marquées grâce au protocole immunogold avec un anticorps anti-PMP22 (Vallat et al., 1996)

A. Patient souffrant d'une HNPP exprimant moins PMP22 que le patient contrôle

B. Patient contrôle

C. L'expression de PMP22 est plus élevée chez le patient atteint de CMT1A

Barre d'échelle = 3µm

La sur-expression de PMP22 affecte les cellules de Schwann selon différents aspects. Premièrement, la sur-expression de PMP22 provoque de l'apoptose dans différents types cellulaires, incluant les cellules de Schwann (Li *et al.*, 2013). Cependant ce mécanisme n'est sûrement pas le seul, ni le principal pour expliquer la mauvaise myélinisation des CMT1A. L'apoptose ne devient évidente que dans les cellules de Schwann âgées sur-exprimant PMP22 *in vivo*. Alors que la mauvaise myélinisation est présente dès les premiers stades du développement. Deuxièmement, la sur-expression de PMP22 semble surcharger le système de dégradation protéique, conduisant à la formation d'agrégats protéiques (Fortun *et al.*, 2003, 2006, 2007). Cette sur-expression de PMP22 activerait le système ERAD et/ou le système autolysosomal des cellules de Schwann (Fortun *et al.*, 2003). Lors de mutations ponctuelles de PMP22 dans le cas de CMT1E, la protéine PMP22 ne s'accumule pas dans le cytoplasme des cellules de Schwann mais plutôt à l'intérieur du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (D'Urso *et al.*, 1998). Ceci en raison de la mauvaise conformation de la protéine.

2.5.2.3. Physiologie du nerf de patients CMT1A et HNPP

Les patients atteints de CMT1A présentent généralement des vitesses de conduction nerveuses (NCV pour Nerve Conduction Velocities) réduites, comprises entre 7 et 40 m/s. Dans la plupart des cas de ce désordre génétique, la diminution des NCV est homogène au sein de tous les nerfs d'un même patient. Il n'y a pas de diminution des NCV non uniforme donc pas de conduction en bloc ou de dispersion temporelle des potentiels d'action musculaires. De plus, tous les patients avec un CMT1A présentent une réduction d'amplitude des réponses motrices et sensibles avec une perte du réflexe d'axone liée à une démyélinisation ou une myélinisation chronique anormale.

Ces désordres électrophysiologiques observés chez les patients sont explicables par ceux observés sur les biopsies de nerfs de patients CMT1A. Les biopsies faites sur les nerfs saphènes des patients CMT1A montrent dans la plupart des cas de larges et nombreuses structures en bulbes d'oignons autour des fibres nerveuses myélinisées (Figure 25).

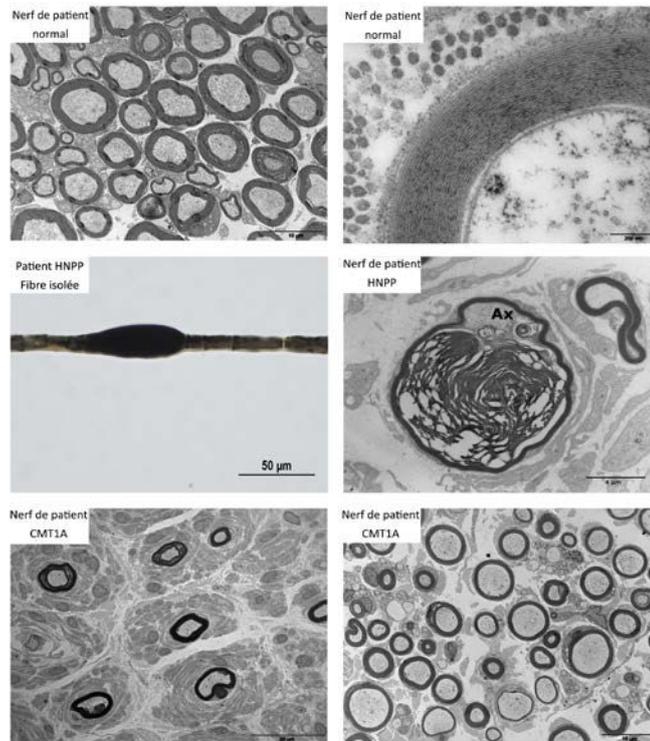


Figure 25 : Micrographie électronique de sections transversales de nerfs de patients normaux HNPP et CMT1A ainsi qu'une photo d'une fibre isolée

Nerf de patient normal : les axones de faible diamètre sont entourés par une gaine de myéline fine. Les axones de larges diamètres sont entourés d'une gaine de myéline plus épaisse. La myéline est compacte.

Fibre isolée de patient HNPP : structures-en tomacula (chapelet de saucisses)

Nerf de patient HNPP, on observe la compression de l'axone par l'excès de myéline.

Nerf de patient CMT1A : on observe des gaines de myélines anormalement fines, surtout sur les axones de large diamètre. On y observe aussi des structures en bulbe d'oignons.

Ces structures en bulbes d'oignons sont multicouches, et consistent en la prolifération de processus Schwanniens et/ou plus rarement de lames basales entourant les axones présentant, par ailleurs, une gaine de myéline trop fine. Ces processus anarchiques sont dus à des phénomènes de dé- et remyélinisations successifs. La prolifération de ces membranes Schwanniennes et de ces tissus connectifs pourrait induire une hypertrophie du nerf (Robertson *et al.*, 1997, 2002). À un stade avancé de la maladie, comme dans toutes les neuropathies démyélinisantes chroniques, on observe une forte réduction des fibres nerveuses myélinisées. Cette perte axonale est corrélée à une réduction des amplitudes des réponses motrices et sensibles chez ces patients.

Les résultats des examens électrophysiologiques chez les patients HNPP sont très spécifiques. Les études sur la conduction nerveuse ont montré un ralentissement de la latence distale sur les nerfs moteurs au sein des sites susceptibles de recevoir des pressions mécaniques, comme le nerf médian au niveau du poignet, et du nerf sciatique poplité au niveau de la cheville. De plus, un ralentissement focal des vitesses de conduction est généralement observé au niveau des sites sujets à compression,

au niveau du nerf cubital à travers le coude ou le nerf sciatique à travers la tête fibulaire, alors que les vitesses de conduction des autres nerfs est soit normale, soit légèrement diminuée dans la plupart des cas (Li *et al.*, 2002). Ces observations sont généralement corrélées à la pathologie du nerf.

On observe généralement sur les biopsies de nerfs des patients HNPP une hypermyélinisation conduisant à la formation de tomacula (Figure 25). La présence de ces structures n'explique pas clairement les mécanismes de pathophysiologie de la maladie. On suppose tout de même que la présence de ces tomacula conduit à une forte constriction des axones (Bai *et al.*, 2010).

2.6. Les modèles animaux de neuropathies impliquant *PMP22*

Il existe de nombreux animaux modèles de CMT1A et des HNPP. Un article portant sur l'étude de certains de ces modèles animaux, et en comparaison de patients ayant des mutations proches, sera présenté dans la partie résultats. Voici cependant une liste des animaux modèles qui sont utilisés actuellement pour étudier ces deux pathologies.

Nom des modèles	Génétique des animaux	Expression des ARNm et des protéines	Phénotypes	Pathologie des nerfs	NCV (m/s) (wt = 38)	Références
Souris PMP22 Ko homozygote	Délétion de <i>PMP22</i> sur les deux allèles	Aucune expression de PMP22	Difficulté pour marcher, faible tremblements, convulsions induites par le stress	Tomacula, les axones de larges diamètres n'ont pas de myéline et de mésaxone	10	(Sancho et al., 1999; Saporta et al., 2011)
Souris PMP22 Ko hétérozygote	Délétion de <i>PMP22</i> sur un allèle	La moitié du niveau normal de PMP22	Paralysie du tronc inférieur	Myéline trop épaisse autour des axones, tomacula rares	n.a.	(Sancho et al., 1999; Saporta et al., 2011)
Souris déficientes en PMP22 lac Z	<i>PMP22</i> remplacé par un gène rapporteur Lac Z	Pas d'expression de PMP22	Signes visibles de déficits moteurs	Poches de lame basale perdues, axones sans myéline	n.a.	(Amici et al., 2006)
Souris trembler homozygotes	Mutation ponctuelle sur les deux allèles de <i>PMP22</i>	Protéine PMP22 avec une mutation faux sens p.Gly150Asp	Symptômes sévères : forts tremblements de tout le corps quadriparésie et convulsions	Absence presque complète de myéline	n.a.	(Suter et al., 1992; Garbay et al., 2000)
Souris trembler hétérozygotes	Mutation ponctuelle sur un allèle de <i>PMP22</i>	½ de protéine PMP22 normales ½ PMP22 avec faux sens P.Gly150Asp	Paralysie spastique et tremblement généralisés	Forte hypomyélinisation et bulbes d'oignons	51	(Low and McLeod, 1975; Suter et al., 1992; Garbay et al., 2000)
Souris trembler J homozygotes	Mutation ponctuelle sur les deux allèles de <i>PMP22</i>	Protéine PMP22 avec mutation faux sens p.Leu16Pro	Sévèrement affectées, incapables de marcher, meurt 18 jours après la naissance, forts tremblements et paralysie du tronc arrière	Absence presque complète de myéline, la myélinisation est bloquée à l'étape de promyélinisation	n.a.	(Robertson et al., 1999; Meekins et al., 2004; Sakakura et al., 2011)

Souris trembler-J hétérozygotes	Mutation ponctuelle hétérozygote sur le gène <i>PMP22</i>	½ protéine normale ½ protéine <i>PMP22</i> p.Leu16Pro	Symptômes moins importants que souris trembler hétérozygotes	Démyélinisation tardive	12.3	(Robertson et al., 1999; Meekins et al., 2004; Sakakura et al., 2011)
Souris Trembler Ncnp hétérozygotes	Délétion spontanée autosomique dominante de l'exon IV de <i>PMP22</i> sur un allèle	n.a.	Démarche anormale de plus en plus visible avec l'âge	Démyélinisation variable, une lame basale entoure de manière irrégulière les cellules de Schwann	n.a.	(Suh et al., 1997)
Souris Trembler Ncnp homozygotes	Mutation autosomique dominante spontanée, délétion de l'exon IV de <i>PMP22</i> sur les deux allèles	n.a.	Très affectées, incapables de marcher	Pas de myéline, myélinisation bloquée au stade promyélinisation.	n.a.	(Suh et al., 1997)
Souris Trembler M1H & M2H	Mutation ponctuelle hétérozygote sur <i>PMP22</i> (H12R et Y153TER respectivement)	n.a.	Tremblements au repos, peu d'activité locomotrice, démarche anormale et coordination moteur anormale	Hypomyélinisation, pertes axonales.	na	(Valentijn et al., 1995; Isaacs et al., 2000)
Rat CMT1A hétérozygotes	Lignée transgénique avec 3 copies supplémentaires de <i>PMP22</i> provenant du génome de la souris	Sur-expression de <i>PMP22</i> avec un effet gène dosage dépendant	Démarche maladroite et forte variabilité des phénotypes entre individus	Hypomyélinisation générale avec une faible épaisseur de gaine de myéline. Forte variabilité des phénotypes entre individus.	14.7	(Sereda et al., 1996; Fledrich et al., 2012)

Rat CMT1A homozygotes	Lignée transgénique avec 6 copies du gène <i>PMP22</i> provenant du génome de la souris en plus des deux copies de <i>PMP22</i> normales	Forte sur-expression de <i>PMP22</i> dosage dépendant	Paralyse, convulsions, hypersensibilité, faible taux de survie	Très faible épaisseur de la gaine de myéline, maximum quelques tours	na	(Sereda et al., 1996; Fledrich et al., 2012)
Souris C22	Lignée transgénique de souris avec 7 copies de <i>PMP22</i> de souris	Sur-expression de <i>PMP22</i> avec dosage gène dépendant	Faiblesse et paralysie des membres inférieurs	Démyélinisation des axones de larges diamètres. Structure en bulbe d'oignon	4	(Magyar et al., 1996; Huxley et al., 1998; Robertson et al., 1999, 2002)
Souris C61	Lignée transgénique avec 8 copies de <i>PMP22</i> de souris	Sur-expression de <i>PMP22</i> avec effet dosage dépendant	Faiblesse et paralysie des membres inférieurs	Démyélinisation des axones de larges diamètres. Structure en bulbe d'oignon	4	(Magyar et al., 1996; Huxley et al., 1998; Robertson et al., 1999, 2002)

Tableau 2 : Liste des animaux modèles avec une mutation sur le gène *PMP22* ou des variations du nombre de copies de *PMP22*.

2.6.1. Les animaux modèles du CMT1A utilisés au cours de ma thèse

Ces animaux modèles ont été générés par Michael Sereda et collaborateurs (Michael Sereda *et al.*, 1996) en augmentant le dosage du gène de PMP22. Le gène PMP22 sauvage a été cloné à partir d'un cosmide de souris d'une librairie génomique. Un fragment de restriction de 43 kb contenant l'unité de transcription de *PMP22* a été excisé, il contient 7kb en amont de l'exon 1A et 4kb en aval de l'exon 5 (Figure 26)

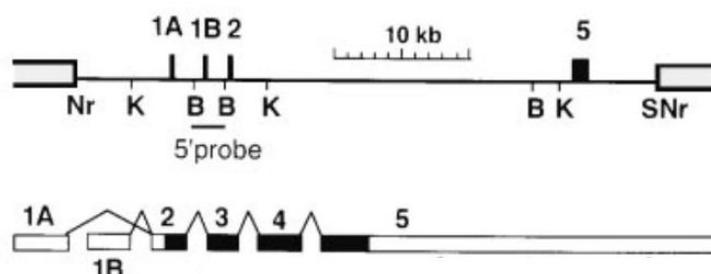


Figure 26 : Fragments du Cosmide contenant le gène PMP22

En haut l'unité de transcription murine complète (exon 1A – 5). Les régions flanquantes sont symbolisées par des boîtes ouvertes. En dessous de l'organisation exons – introns de PMP22 (la taille des introns n'est pas à l'échelle), sont indiqués les sites de restriction Nuul (Nr), KpnI (K), BamHI (B), Sall (S), PstI (P : seulement chez la souris) et NotI (N : seulement chez le rat) (Michael Sereda *et al.*, 1996)

Des micro-injections d'ADN au sein d'ovocytes fécondés de rate Sprague-Dawley ont été réalisées permettant la génération de rats transgéniques. Le nombre de copie de *PMP22* a été estimé à trois copies du gène *PMP22* provenant du génome de la souris, en plus des deux copies de rat déjà présentes.

2.6.1.1. La neuropathie des rats hétérozygotes PMP22 transgéniques

Agés de deux mois, les rats hétérozygotes présentent une démarche chancelante, ressemblant à la démarche en « steppage » des patients souffrant de CMT. Ils ne souffrent ni de tremblements, ni de crises. Ils souffrent aussi d'une perte musculaire observable lorsque les rats essaient de se redresser le long des parois de leur cage. Lorsque ces animaux marchent sur une surface plate en ligne droite, ils ont une démarche maladroite et la plupart ont leurs pattes arrière orientées vers l'extérieur. Malgré une variabilité inter individuelle des phénotypes, tous les rats hétérozygotes échouent au test d'agrippement.

2.6.1.2. Une vitesse de conduction nerveuse réduite

Agés de 2,5 mois, les rats transgéniques présentent une forte diminution de la vitesse de conduction nerveuse sur les nerfs moteurs et sur les nerfs sensitifs. La latence du potentiel d'action global du muscle (PAM) est augmentée, provoquant une vitesse de conduction nerveuse du nerf moteur de 14,7 m/s (\pm 5,1), comparée à une vitesse de 36,4 m/s (\pm 2,5) pour les animaux normaux. Concernant les potentiels d'action des nerfs sensitifs, elle s'élève à 14,9 m/s (\pm 7,2) pour les animaux transgéniques comparés aux animaux normaux dont le potentiel d'action des nerfs sensoriels se situe autour de 34,5 m/s (\pm 4,0). Ces réductions de vitesse de conduction sont très proches de celles observées chez les patients souffrants de CMT1A.

2.6.1.3. Physiologie des nerfs des rats transgéniques

L'analyse morphologique montre une perte de myéline au sein des nerfs périphériques et crâniens. Sur des coupes transversales de nerfs sciatiques, de nombreux axones ont une myéline très mince, voire complètement absente. La gravité de l'hypomyélinisation de ces rats varie selon les individus et est corrélée à la gravité du phénotype visible. A 2,5 mois, des structures ressemblant à des débuts de bulbes d'oignons issus de prolongements de cellules de Schwann et de lames basales entourent les axones amyélinisés ou hypomyélinisés. Sur les nerfs de rats âgés de 6 mois, les bulbes d'oignons sont plus étendus. La sévérité des atteintes est plus importante dans les racines des nerfs ventraux en comparaison des racines dorsales. Cette différence d'atteinte se reflète sur les nerfs périphériques : les nerfs moteurs sont plus atteints que les nerfs sensitifs.

En général, l'hypomyélinisation est plus marquée sur les fibres de large diamètre (qui sont présumées motrices), alors que les fibres de plus petit diamètre ont des gaines de myéline normales, voire une augmentation de la taille de la gaine de myéline. Des débris de myéline ne sont observés que très rarement, et aucune activité des macrophages n'a été rapportée. La quantité de collagène endoneural est augmentée. La dégénérescence axonale est un phénomène rare ne concernant que 1 % des fibres.

2.6.1.4. Cas particulier des rats homozygotes

Au cours de ce manuscrit, nous avons choisi de parler de rats normaux pour les rats homozygotes normaux et de rats homozygotes pour les rats homozygotes mutés.

Les rats homozygotes portent 8 copies du gène *PMP22* (6 transgènes de souris + 2 gènes de *PMP22* normaux). Ils présentent un phénotype bien plus grave et uniforme. Ils ne parviendront jamais à un déplacement coordonné. Ils sont paralysés 4 semaines après leur naissance. Parfois, des spasmes et des attaques sont observés. Les symptômes vont en progressant tout au long de la vie de l'animal, dont le développement est très sévèrement retardé. Très souvent ces animaux meurent précocement autour de la troisième semaine.

L'observation en microscopie électronique montre des nerfs avec une perte presque complète de la myéline dans tout le système nerveux périphérique. Les CS sont beaucoup plus nombreuses que la normale, et se sont bien associées avec les axones. Elles ont formé leur lame basale, et cependant, elles échouent dans la formation de la myéline. Il y a une très forte augmentation du collagène endoneural. Aucune anomalie n'a été observée dans le CNS.

Chapitre 3. Les intégrines

3.1. Généralités sur les intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires, et plus précisément des récepteurs d'adhérence cellulaire. L'une des extrémités, située à l'extérieur de la cellule interagit en général avec des protéines se trouvant dans la matrice extracellulaire (il existe aussi des intégrines capables d'interagir avec des protéines transmembranaires de cellules voisines). L'autre extrémité de ces intégrines interagit avec des constituants intracellulaires, notamment des molécules de signalisation contrôlant la migration, la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire.

3.1.1. Structure générale

Pour chaque intégrine, il existe un gène qui lui est propre (Tableau 3). Ces gènes sont répartis sur tout le génome. Un gène code donc une intégrine. Du point de vue de leurs structures protéiques, les intégrines sont constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Figure 27). Ce sont des hétérodimères transmembranaires. La première sous-unité est la chaîne α qui fixe des cations divalents et la seconde sous-unité est la chaîne β qui possède un domaine riche en cystéine. La structure tridimensionnelle de ces protéines est très difficile à élucider. En effet, les domaines transmembranaires ne sont, à ce jour, pas élucidables par cristallographie mais l'outil informatique (tel que la dynamique moléculaire) a apporté de nombreuses réponses ces dernières années.

On peut différencier trois domaines : l'un extracellulaire, ou ectodomaine (extrémité N-terminale), l'un transmembranaire et le dernier intracellulaire (en C-terminal). Actuellement, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β sont référencées (Tableau 3). C'est la combinaison d'une sous-unité α avec une sous-unité β qui détermine la spécificité au ligand. À ce jour, on dénombre 24 couples (dimères) $\alpha\beta$ fonctionnels (Tableau 4).

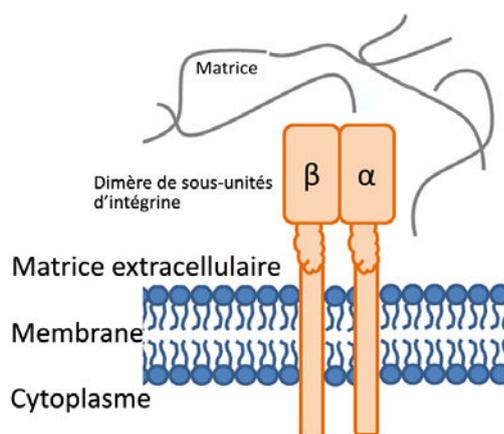


Figure 27 : structure générale d'une intégrine

Toutes les intégrines se lient aux molécules de la matrice extracellulaire (par leur région extracellulaire) et aux microfilaments d'actine via un certain nombre de protéines de liaison qui s'associent à leur région intracellulaire. Cependant, il existe une exception : le dimère $\alpha6\beta4$ qui est relié à des filaments intermédiaires et constitue des hémidesmosomes au sein des épithéliums (Hynes, 2002). Le cas particulier de ce complexe vient de la sous-unité $\beta4$ qui diffère de toutes les autres par son domaine cytoplasmique bien plus large (long de ~ 1000 acides aminés au lieu de 50) lui permettant une connexion aux filaments intermédiaires au lieu de l'actine.

De manière intéressante, chacune des intégrines possède un rôle spécifique et une fonction non redondante. Les animaux ont été utilisés pour étudier ces rôles et fonctions en inactivant les gènes des sous-unités d'intégrine. Les phénotypes de ces animaux résultant de ces inactivations de gènes sont variables :

- Blocage complet de développement ($\beta 1$)
- Défauts majeurs du développement ($\alpha 4, \alpha 5, \alpha V, \beta 8$)
- Mort périnatale ($\alpha 3, \alpha 6, \alpha 8, \alpha V, \beta 4, \beta 8$)
- Défaut dans la fonction des leucocytes ($\alpha L, \alpha M, \alpha E, \beta 2, \beta 7$)
- Inflammation ($\beta 6$)
- Hémostase ($\alpha IIb, \beta 3, \alpha 2$)
- Remodelage osseux ($\beta 3$)
- Angiogenèse ($\alpha 1, \beta 3$)
- Et bien d'autres, voir la revue (Hynes, 2002)

Sous-unités d'intégrines α (Mammifères)		
Gène	Localisation	Protéine
ITGA1	5q11.2	CD49a
ITGA2	5q11.2	CD49b
ITGA3	17q21.33	CD49c
ITGA4	2q31.3	CD49d
ITGA5	12q13.13	CD49e
ITGA6	2q31.1	CD49f
ITGA7	12q13.2	ITGA7
ITGA8	10p13	ITGA8
ITGA9	3p22.2	ITGA9
ITGA10	1q21.1	ITGA10
ITGA11	15q23	ITGA11
ITGAD	16p11.2	CD11D
ITGAE	17p13.2	CD103
ITGAL	16p11.2	CD11a
ITGAM	16p11.2	CD11b
ITGAV	2q32.1	CD51
ITGA2B	5q11.2	CD41
ITGAX	16p11.2	CD11c

Sous-unités d'intégrines β (Mammifères)		
Gène	Localisation	Protéine
ITGB1	10p11.22	CD29
ITGB2	21q22.3	CD18
ITGB3	17q21.32	CD61
ITGB4	17q25.1	CD104
ITGB5	3q21.2	ITGB5
ITGB6	2q24.2	ITGB6
ITGB7	12q13.13	ITGB7
ITGB8	7p21.1	ITGB8

Tableau 3 : Liste des sous-unités α et β des mammifères

Nom	Synonymes	Distribution	Ligands
$\alpha 1\beta 1$	VLA-1	Dans de nombreux types cellulaires : cellules myéloïdes, lymphoïdes, neurales, de peau...	Collagènes, laminines
$\alpha 2\beta 1$	VLA-2	Dans de nombreux types cellulaires : cellules myéloïdes, lymphoïdes, neurales, de peau...	Collagènes, laminines
$\alpha 3\beta 1$	VLA-3	Dans de nombreux types cellulaires : cellules myéloïdes, lymphoïdes, neurales, de peau...	Laminine-5
$\alpha 4\beta 1$	VLA-4	Cellules hématopoïétiques	Fibronectines, VCAM-1
$\alpha 5\beta 1$	VLA-5, Récepteur des fibronectines	Dans de nombreux types cellulaires : cellules myéloïdes, lymphoïdes, neurales, de peau...	Fibronectines, protéinases
$\alpha 6\beta 1$	VLA-6 Récepteur des laminines	Dans de nombreux types cellulaires : cellules myéloïdes, lymphoïdes, neurales, de peau...	Laminines
$\alpha 7\beta 1$		Muscles, gliomes	Laminines
$\alpha I\beta 2$	LFA-1	Lymphocytes T	ICAM-1, ICAM-2
$\alpha m\beta 2$	Mac-1, CR3	Neutrophiles et monocytes	Protéines du sérum, ICAM-2
$\alpha ii\beta 3$	Récepteur des fibrinogènes, gpIIb/IIIa	Plaquettes	Fibrinogènes, fibronectines
$\alpha v\beta 1$		Mélanomes oculaires, tumeurs neurologiques	Vitronectines, fibrinogènes
$\alpha v\beta 3$	Récepteur des vitronectines	Cellules endothéliales, mélanomes, glioblastomes	Vitronectines, fibronectines, fibrinogènes, ostéopontine, Cyr61
$\alpha v\beta 5$		Répondues, particulièrement dans les fibroblastes et les cellules épithéliales	Vitronectines, adénovirus
$\alpha v\beta 6$		Epithélium en prolifération particulièrement dans les glandes mammaires et poumons	Fibronectines, TGF β 1+3
$\alpha v\beta 8$		Tissus neuraux, nerf périphériques	Fibronectines, TGF β 1+3
$\alpha 6\beta 4$		Cellules épithéliales et cellules de Schwann	Laminines

Tableau 4 : Les 16 intégrines principales parmi les 24 rencontrées chez les vertébrés

A l'extérieur de la membrane, les sous-unités α et β se rapprochent et se lient, les régions N-terminales de chacune des sous-unités forment une région permettant la fixation du ligand.

Les tailles des sous-unités α et β varient mais en général, les sous-unités α et β sont constituées de respectivement 750 et 1000 acides aminés. De nombreuses revues concernant la fonction et la structure des intégrines ont été publiées (Arnaout *et al.*, 2007; Askari *et al.*, 2009; Bennett *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2007).

3.1.2. Structure des intégrines

L'ectodomaine des intégrines est dans une conformation pliée lorsque celles-ci sont inactives et au repos. Des études en microscopie électronique et des études utilisant des anticorps se fixant sur des sites de fixation avec des conformations particulières ont permis la mise en évidence d'une conformation autre que la conformation repliée (Humphries, 2004) : une conformation dite active, avec une forte affinité pour les ligands.

Les domaines transmembranaires des sous-unités α et β s'associent lorsque le complexe $\alpha\beta$ est au repos et inactif (Wegener and Campbell, 2008). Des études concernant les structures des domaines transmembranaires ont été publiées (Gottschalk, 2005; Metcalf *et al.*, 2009; Wang and Luo, 2010).

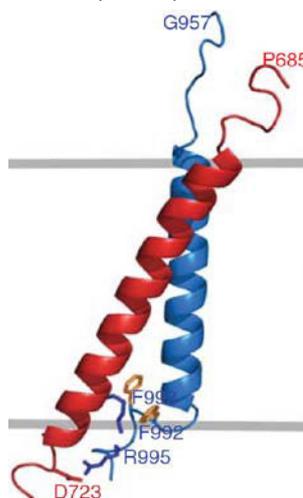


Figure 28 : structure des domaines transmembranaires des sous-unités α III (bleu) et β 3 (rouge).

La position approximative de la membrane est symbolisée par les lignes grises.

La queue cytoplasmique des intégrines interagit avec des partenaires intracytoplasmiques. Ce sont des domaines flexibles, ils peuvent former des interactions avec de nombreuses protéines (Wegener and Campbell, 2008). Ces interactions peuvent être importantes pour l'activation des intégrines à partir de l'intérieur de la cellule.

3.1.3. Activation des intégrines

Des réarrangements des domaines des intégrines sont nécessaires pour l'activation des intégrines. L'accumulation des données a tendance à supporter l'hypothèse que la séparation des domaines transmembranaires et des domaines cytoplasmiques des intégrines permettent leur activation (Gottschalk *et al.*, 2002; Wegener and Campbell, 2008; Williams *et al.*, 1994). La séparation des sous-unités α et β est nécessaire pour la signalisation des intégrines (Figure 29).

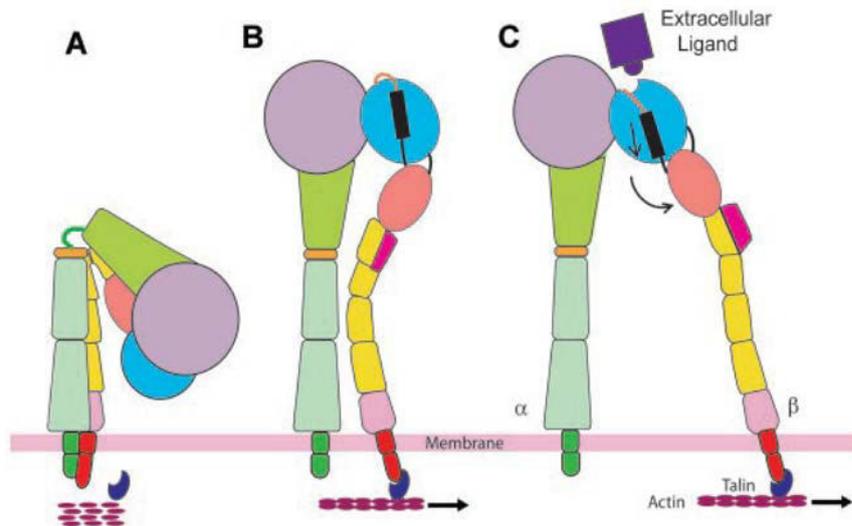


Figure 29 : Régulation de la conformation des intégrines.

- A) Structure des intégrines dans leur conformation repliée.
- B) Modèle détendu des intégrines : domaine de tête fermé
- C) Modèle détendu des intégrines : domaine de tête ouvert.

Le filament assemblé d'actine se lie au domaine cytoplasmique de la sous-unité β par l'intermédiaire de la taline. Les forces latérales transmises par le cytosquelette d'actine permettent l'extension des intégrines, augmentant fortement leur affinité pour le ligand extracellulaire.

L'activation des intégrines est couplée à des changements de conformation des domaines transmembranaires et intracytoplasmiques, plus précisément :

- 1) Séparation des deux domaines transmembranaires et des hélices cytoplasmiques.
- 2) Après la séparation, les hélices de la sous-unité α gardent une structure similaire alors que les hélices de la sous-unité β s'inclinent par l'insertion de 5-6 résidus additionnels au sein des noyaux hydrophobes des lipides de la membrane. C'est la fixation de ligands, tels que la taline dans le cytoplasme qui permet la séparation des intégrines.

Par ailleurs, en addition au mécanisme de fixation du ligand intracellulaire, l'activation des intégrines pourrait provenir de la force transmise par le cytosquelette d'actine (Zhu *et al.*, 2008). Les forces latérales exercées sur le domaine cytoplasmique de la sous-unité β , par la polymérisation d'actine, et sa contraction, vont pousser la « jambe » de la sous-unité β et l'éloigner de la « jambe » de la sous-unité α et, plus tard, ouvrir la pièce dans le domaine de tête (Figure 29C). Cette conformation étendue des intégrines a une forte affinité pour les ligands extracellulaires (Wang and Luo, 2010).

3.1.4. Fixation du ligand

Une des caractéristiques importantes des intégrines est leur habilité à fixer une large variété de ligands. Réciproquement, de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire et de protéines d'adhérence se trouvant à la surface cellulaire sont capables de fixer de multiples intégrines (van der Flier and Sonnenberg, 2001; Humphries, 2000; Plow *et al.*, 2000). C'est la fixation du ligand à l'intégrine qui termine l'activation de celles-ci (Hynes, 2002).

3.2. Les intégrines dans le SNP

Les intégrines semblent jouer un rôle crucial dans la régulation de complexes nécessaires à l'embryogénèse, le développement post-natal, l'homéostasie et la réparation du système nerveux

périphérique. Leurs implications dans ces différents mécanismes font des intégrines des acteurs clés de nombreuses pathologies et désordres du système nerveux périphérique lorsqu'elles apparaissent avec une expression ou une fonction anormale (Berti *et al.*, 2006).

3.2.1. Rôle des intégrines dans le développement du système nerveux

Lors du développement du système nerveux, les axones s'étendent au travers du milieu riche en matrice extracellulaire, ce qui permet alors leur attachement et leur croissance. Les mécanismes de guidage et de la croissance axonale durant l'embryogénèse sont proches de ceux de la régénération après une lésion du nerf, incluant la reconnaissance de molécules de la matrice extracellulaire et des cellules de Schwann par des récepteurs spécifiques se trouvant sur le cône de croissance neural (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Parmi ces récepteurs, les intégrines jouent un rôle considérable.

Les ligands des intégrines, comme par exemple les laminines et la fibronectine, interagissent avec le cône de croissance et affectent sa vitesse et sa direction de croissance (Kuhn *et al.*, 1995). Les laminines augmentent directement la motilité du cône de croissance par des signaux calciques (Kuhn *et al.*, 1998). De plus, la concentration en laminines régule la quantité d'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ exprimée à la surface des neurones sensoriels, qui en retour, affectent la motilité du cône de croissance (Condic and Letourneau, 1997). De plus, l'interaction entre les laminines et les intégrines $\alpha 1 \beta 1$ ou $\alpha 3 \beta 1$, exprimées sur le cône de croissance, agit comme un médiateur de la croissance des neurites sur des neurones de DRG chez la souris et le rat (DeFreitas *et al.*, 1995).

3.2.2. Les intégrines dans les cellules de Schwann

Dans le SNP, les intégrines sont présentes à la fois dans les neurones et dans la glie, à l'exception de l'hétérodimère $\alpha 6 \beta 4$ qui n'est exprimé que par les cellules de Schwann (Clegg *et al.*, 2003; Feltri and Wrabetz, 2005). Les intégrines sont exprimées à différents moments durant le développement des nerfs et ont des localisations d'expression différentes dans le nerf adulte (Previtali *et al.*, 2003a). L'apparition de la lignée cellulaire des cellules de Schwann coïncide avec la modification du répertoire des intégrines des cellules de la crête neurale non-différenciée.

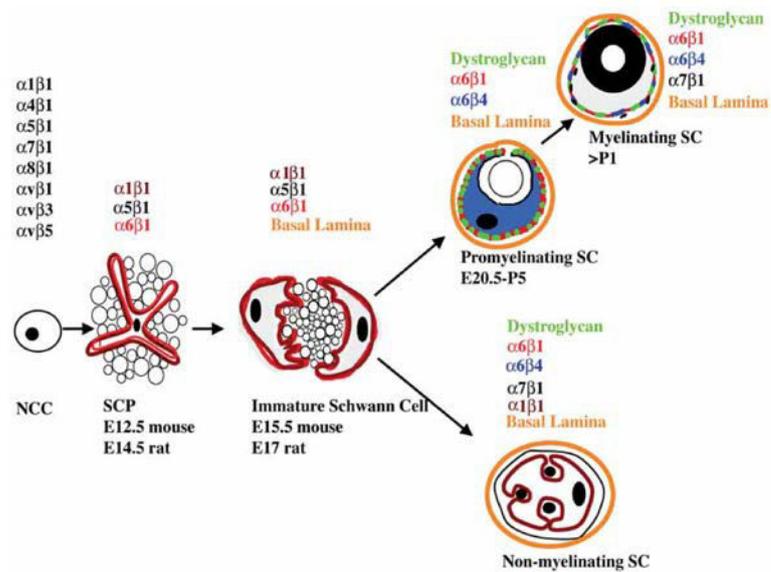


Figure 30 : Distribution des récepteurs de la matrice extracellulaire durant le développement des cellules de Schwann (Berti et al., 2006).

Les cellules de la crête neurale (NCC) expriment de nombreuses intégrines, mais dans les étapes suivantes du développement, la distribution de ses récepteurs devient plus précise. $\alpha6\beta1$ apparaît dans les précurseurs des cellules de Schwann (SCP) et dans les cellules de Schwann immatures, et demeure exprimée tout au long de la lignée cellulaire des cellules de Schwann. $\alpha6\beta4$ commence à être exprimée par les cellules de Schwann promyélinisantes, de façon très diffuse au début, puis de manière polarisée après la myélinisation. $\alpha7\beta1$ est exprimée 1 semaine après la naissance. Même s'il n'y a pas d'intégrines exprimées uniquement dans les cellules de Schwann myélinisantes, le complexe $\alpha1\beta1$ est spécifique des cellules de Schwann non myélinisantes.

Par exemple, l'intégrine $\alpha6\beta1$ n'est pas détectable *in vivo* au niveau de la surface cellulaire des cellules de la crête neurale de poulet jusqu'à ce qu'elle se différencie en cellules du système nerveux périphérique (Bronner-Fraser *et al.*, 1992). A l'inverse, le complexe $\alpha1\beta1$ n'est pas exprimé dans les précurseurs des cellules de Schwann alors qu'il est présent dans les cellules de la crête neurale (Stewart *et al.*, 1997). Il apparaît donc que les précurseurs des cellules de Schwann passent du récepteur des laminines $\alpha1\beta1$ au récepteur des laminines $\alpha6\beta1$. De plus, les intégrines maintiennent un phénotype migratoire le long des axones durant le développement. Il a été identifié plusieurs complexes comprenant la sous-unité d'intégrine $\beta1$ au sein des cellules de Schwann : $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha6\beta1$; ainsi que de très bas niveaux de $\alpha4$ et $\alpha5$ (Milner, 1997). Les mêmes auteurs ont montré que la laminine 1, la laminine 2 et la fibronectine promouvaient la migration des cellules de Schwann, et que cette migration était médiée par la sous-unité d'intégrine $\beta1$ sur les laminines et la sous unité d'intégrine αV sur la fibronectine.

Sur le rat, $\alpha1\beta1$ n'est pas exprimé de manière significative sur les précurseurs des cellules de Schwann. L'expression $\alpha1\beta1$ se produit cependant durant la seconde semaine après la naissance, et sur les nerfs adultes (Fernandez-Valle *et al.*, 1994). Elle atteint alors un niveau significatif uniquement sur les cellules de Schwann non myélinisantes. Par ailleurs, les cellules de Schwann positives à $\alpha1$ perdent l'expression de $\alpha1$ dès lors qu'elles myélinisent un axone (Fernandez-Valle *et al.*, 1994).

La myélinisation est une étape primordiale du développement du système nerveux périphérique, au cours de laquelle aux moins deux intégrines jouent un rôle majeur : $\alpha6\beta1$ et $\alpha6\beta4$ (récepteurs des laminines). La myélinisation est concomitante à l'assemblage de la lame basale (Eldridge *et al.*, 1989) ou au moins à la présence d'un de ses constituants (Podratz *et al.*, 1998). En fait, une mutation sur la

laminine 2 (le composant principal de la lame basale) chez l'homme ou la souris, entraîne une neuropathie périphérique démyélinisante (Matsumura *et al.*, 1997). Donc, les récepteurs des laminines 2 ($\alpha6\beta4$, $\alpha6\beta1$ ou les dystroglycanes) sont impliqués, eux aussi dans la myélinisation. L'expression de $\beta1$ et $\beta4$ commence à être détectable chez le fœtus humain en même temps que la formation de la lame basale (entre la 11ème semaine et la 17ème semaine de gestation) (Jaakkola *et al.*, 1993). Chez la souris, la présence de $\beta1$ se fait à 12,5 jours de gestation alors que $\beta4$ n'apparaît qu'aux alentours de la naissance. Chez le rat, les niveaux d'ARNm augmentent progressivement durant le développement postnatal du nerf périphérique en parallèle de la myélinisation (Feltri *et al.*, 1994). Par ailleurs, les niveaux d'ARNm de $\alpha6$ et $\beta1$ restent stables durant tout le processus d'embryogénèse. Au sein des nerfs adultes humains ou de rongeurs, l'expression de $\beta4$ et $\beta1$ est polarisée au niveau de la surface des cellules Schwann ab-axonale (face à la lame basale) de la myéline, alors que leur expression est diffuse au sein des cellules de Schwann non myélinisantes (Previtali *et al.*, 1998).

3.2.3. Fixation du ligand des intégrines $\alpha6\beta1$ et $\alpha6\beta4$

Dans le SNP, $\alpha6\beta1$ et $\alpha6\beta4$ sont des récepteurs hautement spécifiques des laminines. Des analyses ont montré que $\beta1$ était capable de fixer différentes régions de ce ligand. Mais aucun site actif de fixation en particulier n'a été mis en évidence, que ce soit une séquence ou un résidu. $\alpha6\beta4$ et $\alpha6\beta1$ sont des récepteur des laminines 332 et 511/521 (Nishiuchi *et al.*, 2006). Cependant, l'interaction de $\alpha6\beta4$ avec ces laminines demeure peu connue. En 2010, un épitope a été mis en évidence sur la laminine 332, cet épitope est indispensable à la fixation de l'intégrine $\alpha6\beta4$ sur cette laminine (Yamashita *et al.*, 2010).

Les laminines sont des protéines de la matrice extracellulaire. Ce sont les composants majeurs de la lame basale. Les laminines influent la migration, la différenciation, et l'adhérence cellulaire. Ce sont des protéines hétérotrimériques porteuse d'une chaîne α , β et γ . Les laminines sont nommées selon la composition de leurs chaînes. Par exemple, la laminine 332 est constituée d' $\alpha3$ de $\beta3$ et de $\gamma2$. Aujourd'hui, ce sont 40 combinaisons qui ont été identifiées *in vivo*. Les 3 chaînes s'assemblent pour former une structure ressemblant à une croix pouvant fixer des composants de la matrice extracellulaire ainsi que des protéines dans la membrane cellulaire. Dans les cellules de Schwann, on retrouve les laminines 211, 411 et 511 (Occhi *et al.*, 2005). Les laminines sont indispensables à la myélinisation par les cellules de Schwann grâce à leurs interactions avec le complexe $\alpha6\beta1$ (McKee *et al.*, 2012).

3.2.4. $\alpha6\beta1$: le complexe permettant l'initialisation de la myélinisation

$\alpha6\beta1$ est le récepteur des laminines le plus représenté au sein des précurseurs des cellules de Schwann et au sein des cellules de Schwann immatures. L'attachement des cellules de Schwann aux laminines ainsi que la myélinisation sont bloqués lors de l'inactivation de $\beta1$ (Fernandez-Valle *et al.*, 1994). Une délétion de $\beta1$ dans les cellules de Schwann entraîne aussi un blocage du tri axonal (M Laura Feltri *et al.*, 2002). La présence du complexe $\alpha6\beta1$ est nécessaire pour le tri axonal et l'initialisation de la myélinisation (Pellegatta *et al.*, 2013). Cependant, ce complexe n'est pas indispensable : son absence peut être compensée par $\alpha7\beta1$ (Pellegatta *et al.*, 2013).

3.2.5. $\alpha6\beta4$ un complexe particulier

L'intégrine $\alpha6\beta4$ est exprimée dans des tissus épithéliaux variés, dans les cellules de Schwann et dans les cellules endothéliales. La sous-unité $\beta4$ se distingue des autres intégrines par son long domaine de signalisation intracytoplasmique. Alors que les domaines cytoplasmiques des autres intégrines sont constitués de moins de 50 acides aminés, celui de la sous-unité $\beta4$ est supérieur à 1000 acides aminés (Hogervorst *et al.*, 1990; Suzuki and Naitoh, 1990). La structure de ce domaine cytoplasmique est décrite en Figure 31A. Le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta4$ est constitué de deux paires de domaines de fibronectines type III, un domaine Calx β et un segment de connexion (de Pereda *et al.*, 1999). La répétition des domaines fibronectine et du segment de connexion est nécessaire à l'assemblage des hémidesmosomes (Litjens *et al.*, 2006; Margadant *et al.*, 2008; de Pereda *et al.*, 2009). Les hémidesmosomes sont de larges complexes d'adhérences qui ancrent la membrane des cellules épithéliales à la membrane basale.

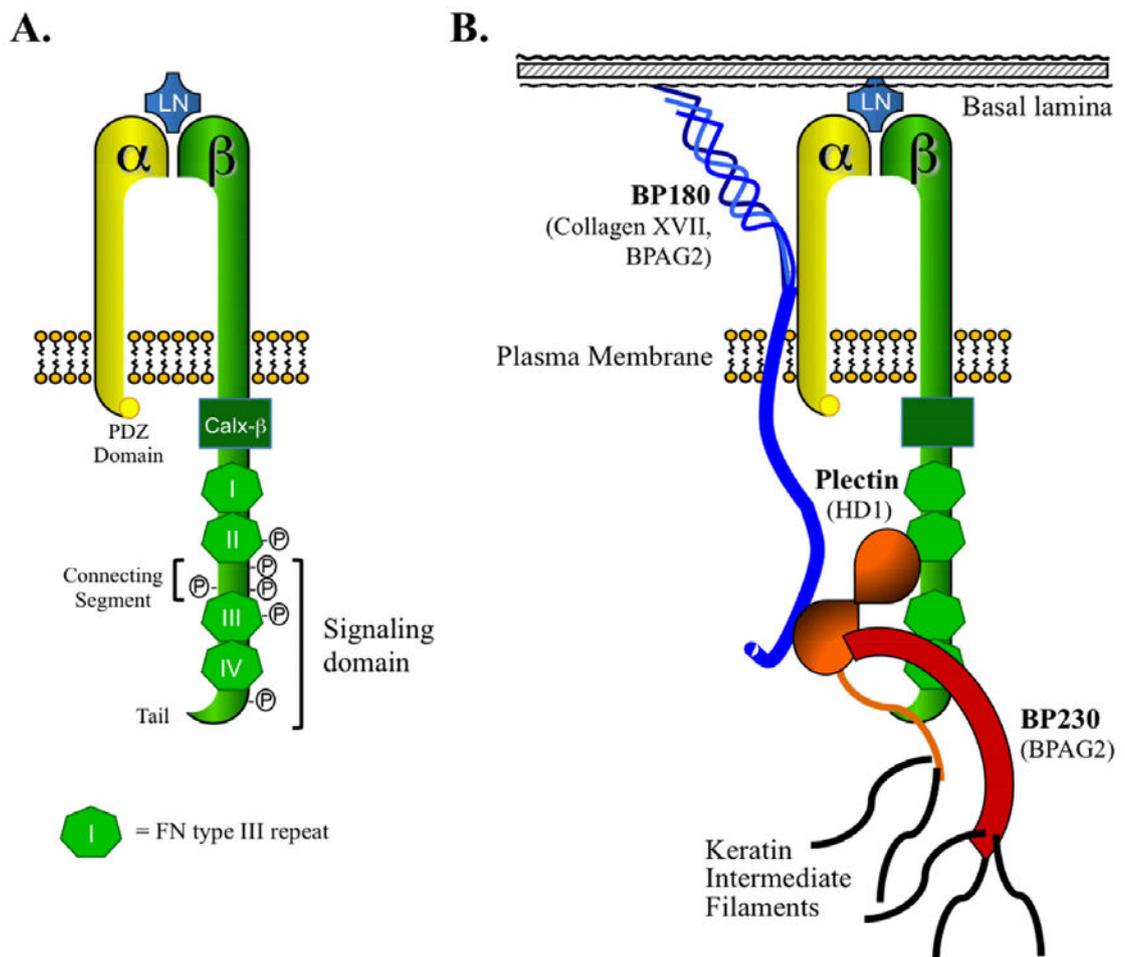


Figure 31 : La structure du complexe $\alpha6\beta4$ et l'assemblage de l'hémidesmosome (Stewart and O'Connor, 2016).

- La sous-unité d'intégrine $\beta4$ ne s'associe qu'avec la sous-unité $\alpha6$. Le long domaine cytoplasmique de $\beta4$ se distingue structurellement des autres récepteurs connus mais contient plusieurs domaines distincts comprenant un domaine Calx- β , 4 domaines répétés de fibronectine de type III, un segment de connexion et une queue C-terminale.
- L'intégrine $\alpha6\beta4$ agit dans la formation des hémidesmosomes en fixant de nombreuses protéines hémidesmosomales comprenant la plectine (HD1), BP180 (aussi connue sous l'appellation BPAG2 ou collagène XVII) et BP230 (aussi connue sous l'appellation BPAG1)

A la surface des cellules, orientées vers la membrane basale, les intégrines $\alpha 6\beta 4$ se lient aux laminines présentes dans la matrice extracellulaire facilitant ainsi une adhérence stable pour la formation des hémidesmosomes. (Litjens *et al.*, 2006; Margadant *et al.*, 2008; de Pereda *et al.*, 2009). Au niveau de ses jonctions, $\alpha 6\beta 4$ permet la connexion entre les filaments intermédiaires de cytokératines dans la cellule et les laminines dans la membrane basale au travers d'interactions avec la plectine, du collagène XVII/BP180 et BP230 comme présenté Figure 31B (Borradori and Sonnenberg, 1996; Rezniczek *et al.*, 1998).

Le complexe $\alpha 6\beta 4$ joue le rôle de stabilisateur entre la lame basale et la cellule de Schwann permettant une bonne myélinisation (Berti *et al.*, 2006). Au cours de la myélinisation, le complexe $\alpha 6\beta 4$ va remplacer petit à petit le complexe $\alpha 6\beta 1$. Il a, par ailleurs, été montré que la sous-unité $\alpha 6$ dimérise préférentiellement avec $\beta 4$ lorsque $\beta 4$ et $\beta 1$ sont disponibles. L'expression de $\alpha 6\beta 4$ va continuer d'augmenter au cours de la myélinisation (Previtali *et al.*, 2003b; Verheijen *et al.*, 2003).

L'inactivation du gène de la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ est létale, donc n'a pas pu être étudiée pendant de nombreuses années. Cependant, une étude avec des animaux portant une délétion conditionnelle de $\beta 4$ a été effectuée. Après la compression du nerf $\beta 4^{-/-}$, les axones présentent une gaine de myéline moins épaisse que les animaux normaux, cependant l'expression des laminines n'apparaît pas perturbée (Van der Zee *et al.*, 2008).

Le complexe $\alpha 6\beta 4$ est impliqué dans de nombreuses voies de signalisations cellulaires, comme par exemple, la voie PI3-K. En effet, le domaine cytoplasmique permet une activation sans intermédiaires de cette voie. Cette dernière est impliquée dans la prolifération, la survie, et la migration cellulaires, ainsi que la myélinisation (Giancotti and Tarone, 2003a).

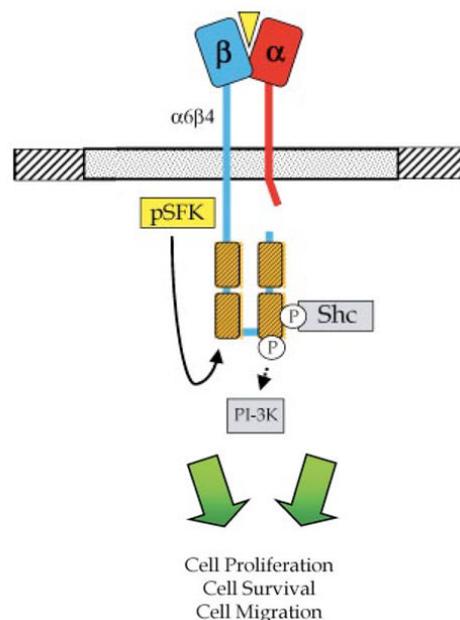


Figure 32 : activation de la voie PI3-K par $\alpha 6\beta 4$ (Stewart and O'Connor, 2016)

Dans le nerf, l'activation de PI3-K entraîne l'activation d'une voie de signalisation précise qui régule la myélinisation du système nerveux périphérique.

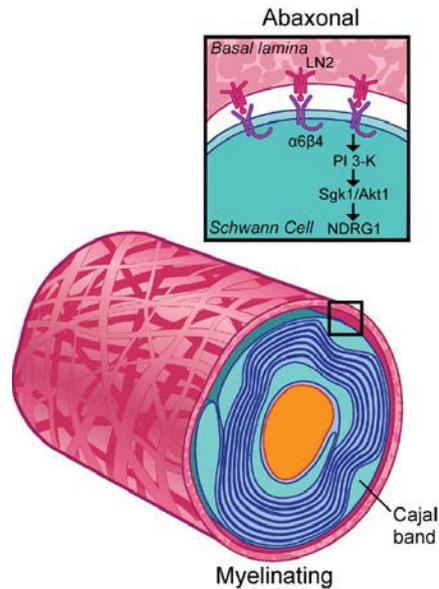


Figure 33 : Schéma de la voie de signalisation PI3-K activée durant la myélinisation

Dans les cellules de Schwann myélinisantes, le signal promyélinisant est proposé par le signal des laminines via $\alpha6\beta4$ et $SGK1$, qui active $NDRG1$ une protéine impliquée dans la maintenance myélinique à long terme.

Par ailleurs, quand $\beta4$ est inactivée de manière transitoire, les niveaux d'expression du gène de la sous-unité d'intégrine $\beta1$ augmentent afin de compenser le manque de $\beta4$ (Knyazev *et al.*, 2015).

3.3. Les intégrines liées à des désordres du SNP

Comme décrit précédemment, les intégrines sont largement exprimées dans le système nerveux périphérique et jouent un rôle central dans son développement, dans la croissance axonale, la formation des unités axone-cellule de Schwann et la myélinisation. Il n'est donc pas surprenant que l'altération de l'expression des intégrines puisse entraîner des pathologies neurodégénératives, inflammatoires ou néoplasiques du système nerveux périphérique.

3.3.1. Les intégrines dans les neuropathies axonales

La neuropathie axonale est le résultat de diverses neuropathies dégénératives dans le SNP. La lésion du nerf sciatique des rongeurs est un bon modèle de neuropathie axonale. Après la coupure ou l'écrasement, une dégénérescence Wallérienne s'installe de façon distale au site de lésion. La dégénérescence Wallérienne est la réaction élémentaire des fibres du nerf périphérique lorsque leurs continuités sont interrompues par des événements traumatiques, toxiques, dégénératifs, ischémiques ou métaboliques. Les conséquences sont alors la dégénérescence des structures axonales, l'interruption de la gaine de myéline en structures ovoïdes, la dédifférenciation des cellules de Schwann et leur prolifération. En parallèle, les macrophages envahissent le nerf blessé, phagocytent et dégradent les axones et les membranes myéliniques et stimulent la prolifération des cellules de Schwann. Finalement, après l'écrasement du nerf, l'environnement, constitué des tubes de lame basale et des cellules de Schwann, soutient la régénérescence axonale, suivie de la différenciation des cellules de Schwann en cellules de Schwann myélinisantes, permettant alors la remyélinisation et la réinnervation des organes cibles.

Le rôle des intégrines dans ces interactions en devient évident. La sous-unité d'intégrine $\beta 2$ est activement impliquée dans le recrutement des macrophages durant la dégénérescence Wallérienne et dans les processus de phagocytose (Vougioukas *et al.*, 1998). Les cellules de Schwann acquièrent de nouvelles fonctions durant la dégénérescence Wallérienne et la régénérescence. La dégradation de la myéline suit la perte du contact axonal. Les cellules de Schwann prolifèrent et deviennent phagocytotiques afin de reconstituer un tube neural pour les axones en régénérescence. Les cellules de Schwann excédantes meurent par apoptose, les cellules de Schwann restantes entourent les axones qui repoussent et vont éventuellement remyéliniser les axones de large diamètre. Nombre de ces évènements sont effectués en lien avec la lame basale, ainsi qu'en lien avec sa reformation. On observe une diminution de l'expression de $\alpha 6\beta 4$ immédiatement après la lésion. En même temps que la dégénérescence des axones, les cellules de Schwann maintiennent cependant des récepteurs $\alpha 6\beta 1$ (Feltri *et al.*, 1994). Que ce soit dans les nerfs en train de régénérer ou pour ceux qui ne régénèrent pas, le niveau d'ARNm de $\beta 4$ augmente progressivement du 8ème au 58ème jour après la lésion. $\beta 4$ forme de nouveau une expression ab-axonale polarisée au sein du nerf myélinisé complètement reformé.

Ces observations effectuées sur des animaux modèles ont aussi été remarquées sur des biopsies de nerfs de patients atteints des neuropathies axonales. Par exemple, une neuropathie humaine aiguë peut être induite par un manque d'expression polarisée de $\beta 4$ sur les cellules de Schwann myélinisantes (Stewart and O'Connor, 2016). Des nerfs dénervés chroniquement présentent une expression diffuse de $\beta 4$ le long des tubes de cellules de Schwann, alors que des neuropathies axonales associées à des phénomènes de régénérescence de fibre nerveuse avec juste un peu de myéline (indiquant une régénérescence axonale) présentent bien une expression polarisée de $\beta 4$.

3.3.2. Les intégrines dans la réparation du nerf

A l'inverse du système nerveux central, les fibres du nerf périphérique sont capables de se régénérer après une blessure. La réponse régénérative inclut plusieurs évènements qui sont principalement influencés par les cellules de Schwann et la matrice les entourant. Comme discuté précédemment, concernant la croissance axonale, les interactions axones-cellules de Schwann et la myélinisation, la plupart de ces évènements sont influencés par la matrice extracellulaire et les intégrines. En fait, aux niveaux des expressions, la plupart des intégrines et des constituants de la matrice extracellulaire qui sont régulés après une lésion, le sont de la même façon que lors du développement du système nerveux périphérique. Durant la dégénérescence Wallérienne, les cellules de Schwann se différencient, prolifèrent massivement et participent à la phagocytose. Par ailleurs, si la lésion a préservé l'intégrité du nerf, les cellules de Schwann et les constituants de la matrice extracellulaire constituent un environnement permissif aidant la croissance de l'axone, les interactions des cellules de Schwann, l'innervation de l'organe cible et la myélinisation. Les gènes des protéines cytosquelettiques (comme l' γ -actine, la tubuline α , la vimentine et la GFAP) et les molécules d'adhérence (L1, N-CAM) sont activement régulés tout au long de ces phases, tout comme le sont les protéines impliquées dans la myélinisation (comme P0, PMP22, MAG, MBP, la connexine 32 et les periaxines) (Gillen *et al.*, 1997).

Aussi, certains composants de la matrice extracellulaire et des intégrines exprimées dans le système nerveux périphérique sont modulés durant la dégénérescence et la régénérescence du nerf. Les chaînes de laminines B1 et B2 sont rapidement régulées négativement après une lésion du nerf. Elles sont de nouveau exprimées durant la régénérescence du nerf (Doyu *et al.*, 1993). La synthèse de fibronectine et de collagènes (type 1, III et IV) est augmentée au niveau du site de la lésion, avec de

plus hautes concentrations dans la région connectant les extrémités distales et proximales. Ces molécules jouent un rôle dans le remodelage de l'espace endoneurial après une lésion du nerf (Lefcort *et al.*, 1992; Siironen *et al.*, 1992).

Comme mentionné plus tôt, le complexe $\alpha 6\beta 4$, récepteur des laminines, est régulé négativement dans les cellules de Schwann après une lésion. Ce complexe est de nouveau exprimé durant la remyélinisation et l'assemblage de la lame basale complète (Feltri *et al.*, 1994). En parallèle, l'expression de $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ est induite après une lésion et exprimée au sein des cellules de Schwann. $\alpha 5\beta 1$ est aussi exprimée au niveau du cône de croissance (Lefcort *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1997). L'expression du récepteur de la fibronectine ($\alpha 5\beta 1$) facilite la régénérescence des axones au travers d'une région riche en fibronectines. Il a aussi été montré que l'utilisation d'un anticorps anti-intégrine $\alpha 1$ inhibait la régénérescence nerveuse (Toyota *et al.*, 1990). De plus, les bords proximaux et distaux de la lésion présentent une augmentation d'expression de la sous-unité d'intégrine $\beta 1$ (Taskinen *et al.*, 1995).

Chapitre 4. Interaction de PMP22 avec les intégrines

En 2006, Amici et ses collaborateurs ont mis en évidence une interaction de la protéine PMP22 avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Amici *et al.*, 2006). Pour ce faire, l'équipe a développé un modèle murin de souris LacZ déficiente en *PMP22*. Les exons 2 et 3 de *PMP22*, codant le premier domaine transmembranaire ont été remplacés par un gène rapporteur Lac Z avec un gène de « néo » sélection (Figure 34).

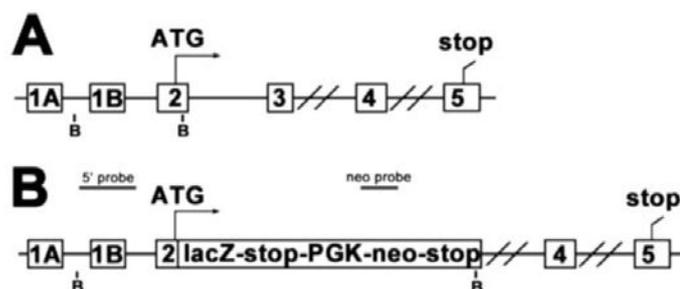


Figure 34 : Représentation schématique de l'insertion du gène rapporteur Lac -Z en remplacement des exons 2 et 3 de *PMP22* (Amici *et al.*, 2006)

A. Représentation de la structure génomique de *PMP22* de souris, montrant les exons alternatifs 1A et 1B, qui sont eux même précédés respectivement par les promoteurs 1 et 2. La double barre située entre les exons 3 et 4 et les exons 4 et 5 indiquent des séquences introniques de 16,6 et 7,0 kb respectivement.

B. Diagramme de la construction *PMP22*-LacZ. Les deux premiers exons codants de *PMP22* (exons 2 et 3) ont été remplacés par un gène rapporteur LacZ, suivi par un fort signal de terminaison de la transcription, le PGK-néo gène, et un second signal stop. Les sites de restrictions BamHI sont marqués (B). 5' probe : La localisation de la sonde de *PMP22* en 5'. Néo probe : localisation de la néo sonde.

La séquence codante entière de *PMP22* n'a pas été supprimée à cause de la difficulté de supprimer le gros intron entre les exons 3 et 4 (~17 000 pb), qui pourrait contenir des éléments de régulation et pourrait affecter l'expression du rapporteur LacZ. Dans cette construction, le gène LacZ est dirigé par les promoteurs de *PMP22*, permettant le suivi de la protéine β galactosidase au sein de l'organisme.

Phénotypiquement, les souris *PMP22* déficientes hétérozygotes sont un modèle d'hyper sensibilité à la pression (HNPP), qui est communément associé à la délétion d'une copie du gène *PMP22* (Chance *et al.*, 1993). Cependant, les souris homozygotes déficientes en *PMP22* présentent une neuropathie bien plus sévère rappelant La CMT1A (K Adlkofer *et al.*, 1995). Les souris homozygotes présentent des signes manifestes de déficit moteurs, incluant les membres postérieurs joints, des tremblements, ainsi qu'une démarche maladroite devenant visible dès deux semaines après leur naissance. A mesure du vieillissement de l'animal, la faiblesse musculaire distale progresse, aboutissant alors à une paralysie des membres inférieurs. Les souris homozygotes ne sont pas capables de se reproduire et présentent aussi une croissance très retardée. Les souris hétérozygotes, quant à elles, sont moins affectées mais présentent des sévérités de déficits moteurs très variables à partir de 5 mois.

Concernant la physiologie des nerfs de ce modèle : les souris homozygotes âgées de 21 jours présentent des structures en tomacula. Les structures en tomacula sont essentiellement retrouvées dans la région paranodale de la myéline. Cependant, un épaississement de la myéline dans la région internodale a aussi été remarqué. Agés de 3 semaines, les nerfs des souris hétérozygotes présentent

moins de structures en tomacula dans le nerf sciatique mais leur quantité augmente au cours du vieillissement de l'animal.

4.1. Les souris déficientes en PMP22 présentent une myélinisation retardée et une altération des interactions entre les CS et la lame basale

Dans un premier temps, Amici *et al.* ont démontré qu'en l'absence de la protéine PMP22, il y a une augmentation notable du nombre de CS bloquées au stade de pro-myélinisation (Figure 35). Ces CS ont entouré les axones mais n'ont pas commencé leur enroulement pour former la myéline. Au contraire, il a aussi été remarqué des axones hyper-myélinisés provoquant par la suite les structures en tomacula. De plus, sur un nerf normal, l'interaction de l'axone avec la cellule de Schwann est étroite, et chaque unité axone – cellule de Schwann est entourée par une lame basale. Cependant, chez les souris homozygotes, il a été observé des structures en poches de lame basale ainsi que des pertes de la lame basale autour des unités axone – cellules des Schwann (Figure 35).

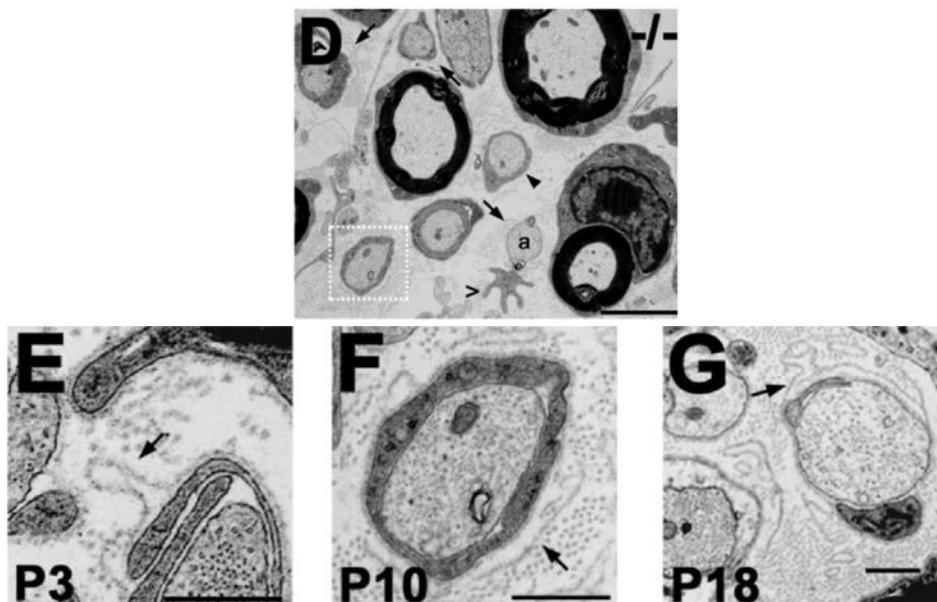


Figure 35 : Coupes ultrafines de nerfs de souris déficientes en PMP22 (Fortun *et al.*, 2006)

La figure G montre des processus d'hypermyélinisation donnant lieu à des structures en tomacula, on observe aussi beaucoup d'axone avec des cellules de Schwann au stade promyélinisation. Sur les figures EFG on observe une perte de la lame basale de ces cellules de Schwann au stade de promyélinisation.

4.2. Une diminution de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ dans le nerf sciatique des souris déficientes en PMP22

Chez les souris normales, la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ est localisée au sein de la membrane externe des CS. Cependant, dans les souris déficientes en PMP22, il a été noté une très forte diminution du marquage de $\beta 4$. Cette diminution a, par la suite, été vérifiée par Western blot.

4.3. PMP22 est en complexe avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et les laminines.

Par immuno-précipitation, Amici et ses collaborateurs ont démontré que chez les souris normales, PMP22 et $\beta 4$ sont complexées. Les mêmes résultats ont été obtenus pour $\beta 4$, $\alpha 6$ et les laminines. Ils ont, par la suite, vérifié ces résultats sur d'autres tissus et ont démontré que PMP22 et

$\beta 4$ était complexée dans d'autres types cellulaires, tels qu'une lignée cellulaire d'adénocarcinome du colon humain.

4.4. PMP22 et l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ dans l'initialisation de la myélinisation

L'absence complète de PMP22 est très rare chez l'humain et seuls quelques cas ont été présentés (Jouaud *et al.*, 2016; A. S. D. Saporta *et al.*, 2011). Chez ces patients, la myélinisation est bloquée et de nombreuses cellules de Schwann sont bloquées au stade de promyélinisation (Amici *et al.*, 2006). La microscopie électronique montre clairement que les axones qui devraient être myélinisés sont entourés par les extensions cellulaires des cellules de Schwann, qui paraissent bloquées en cet état. Ces extensions entourent l'axone de manière incomplète et ne forment pas de mésaxone permettant l'initialisation de la myélinisation (Figure 36).

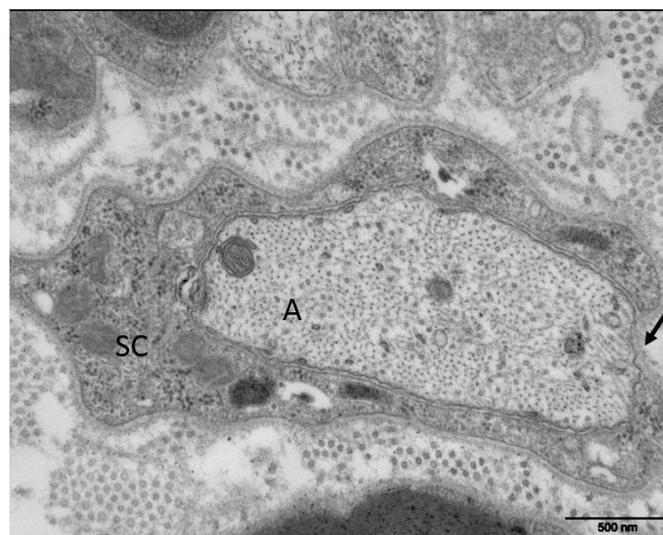


Figure 36 : Section transversale ultrafine de fibre nerveuse de souris sans PMP22

A : axone, SC : Cellule de Schwann. La flèche représente l'absence de contact entre les extensions de la cellule de Schwann.

Le processus d'initialisation de la myélinisation est régulé très précisément. Le dialogue bidirectionnel entre la cellule de Schwann et l'axone est fondamental pour la formation de la myéline durant le développement, sa maintenance, et sa remyélinisation après une blessure. De plus, en périphérie de la cellule de Schwann, la mise en place d'une lame basale est indispensable pour la myélinisation (Bunge *et al.*, 1990). Plus récemment, plusieurs molécules contrôlant la myélinisation au travers du contact axone-cellule de Schwann et cellule de Schwann lame basale ont été mises en évidence. NRG1 (neureguline 1) par exemple est un régulateur clé impliqué dans presque tous les aspects de la biologie des cellules de Schwann (Birchmeier and Nave, 2008). Sous la direction de NRG1, les cellules précurseurs se développent en cellules de Schwann immature avec une lame basale, elles acquièrent une boucle autocrine permettant d'entourer les axones et de sélectionner les axones de larges diamètres lors d'un processus complexe : le tri radial (Berti *et al.*, 2011). Donc les cellules ont besoin d'une lame basale comme prérequis à la myélinisation. La lame basale agit comme un support mécanique primordial permettant une compartimentalisation et un soutien morphologique aux cellules qui y adhèrent. Elle est composée de macromolécules comme différents types de collagènes, des fibronectines et des laminines (Rosso *et al.*, 2012). Le récepteur des laminines est le complexe $\alpha 6 \beta 4$. Il est exprimé à la surface des cellules de Schwann en direction de la lame basale et est connu

pour interagir avec les laminines qui à leur tour, sont cruciales à l'initialisation de la myélinisation au travers du tri radial. L'absence du complexe $\alpha6\beta4$ sur les cellules de Schwann conduit à une mauvaise formation des feuillets myéliniques sur les souris âgées. En 2006, Amici et ses collaborateurs ont démontré que PMP22 était complexée avec $\alpha6\beta4$. Ils ont, par ailleurs, démontré que l'absence de PMP22 altère la lame basale des cellules de Schwann et induit des anomalies de signal entre les compartiments intra et extracellulaire des cellules de Schwann (Rosso *et al.*, 2012).

Chapitre 5. Problématique et objectifs de la thèse

En conditions normales, PMP22 interagit avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ au sein de la région ab-axonale des cellules de Schwann myélinisantes. Lorsque PMP22 est absente, l'expression de la sous-unité $\beta 4$ diminue et la lame basale des cellules de Schwann est déstabilisée (Amici *et al.*, 2006). Qu'en est-il lors de la sur-expression de PMP22 que l'on constate chez les patients CMT1A ? Dans la partie expérimentale qui va suivre, nous avons cherché à caractériser l'effet de PMP22 sur les intégrines. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de ces intégrines au sein des nerfs sciatiques de rats normaux, que nous avons comparés avec les rats hétérozygotes et homozygotes. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à l'expression génique des intégrines et de PMP22 par qRT-PCR. Puis, dans un second temps, nous avons mesuré l'expression protéique de ces protéines grâce au Western Blot et à l'immunohistochimie couplée à la microscopie confocale. Enfin, nous avons étudié les modifications morphologiques de ces nerfs sur des coupes lues en microscopie électronique.

Dans une seconde partie, nous avons étudié les effets de l'absence de la protéine PMP22 chez un patient très particulier, porteur d'une suppression du gène de *PMP22* sur un allèle et porteur d'une mutation faux sens sur l'autre. Nous avons tout d'abord cherché à connaître l'expression de PMP22 grâce à la PCR quantitative en temps réel. En effet, la présence d'un codon stop prématuré est une des conditions pour lesquelles des mécanismes de dégradation de l'ARN messager peuvent intervenir. Puis, avons effectué une étude approfondie de la pathologie des nerfs de ce patient au moyen de la microscopie électronique. Pathologie que nous avons comparée soit, avec nos modèles animaux, soit avec d'autres patients porteurs, eux aussi, d'une mutation sur chacun des allèles du gène de *PMP22*.

La diversité des animaux modèles et des patients ayant une mutation de la protéine PMP22 sont aussi une source d'information importante pour l'étude des rôles de la protéine PMP22. Dans une troisième partie, avons effectué une étude comparative de quelques animaux modèles portant une mutation de *PMP22*, comparés à des patients ayant des mutations proches.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons étudié la structure protéique de PMP22 via homologie de séquence et dynamique moléculaire nous permettant alors l'élucidation d'une structure protéique sans passer par la cristallographie. Pour ce faire, j'ai rejoint un projet de l'équipe dans lequel cette méthode est utilisée. Ce projet portait sur la modélisation du domaine extracellulaire de la protéine CasR. Cette méthode nous a permis par la suite l'étude de la protéine PMP22, dont la structure tridimensionnelle ne peut pas être élucidée par cristallographie.

Partie expérimentale

Article 1 : PMP22 overexpression is associated with a shift from $\alpha6\beta4$ toward $\alpha6\beta1$ integrin expression in CMT1A rats

Authors : Maxime Jouaud, Laurence Richard, Benoît Funalot, Jean-Michel Vallat, Franck G Sturtz, Anne-Sophie Lia

Avant-propos de l'article 1

La protéine PMP22 est associée au complexe $\alpha6\beta4$ dans des cellules de Schwann myélinisantes normales (Fortun *et al.*, 2006). Mais qu'en est-il de l'expression des intégrines lors de CMT1A ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des animaux modèles de CMT1A : une lignée de rats transgéniques porteuse de transgènes de *PMP22* venant du génome de la souris. Les animaux hétérozygotes sont donc porteurs de 3 copies supplémentaires du gène de *PMP22* de souris, les animaux homozygotes sont porteurs de 6 copies supplémentaires de *PMP22* de souris.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'expression génique de *PMP22*, de l'intégrine $\alpha6\beta4$, mais aussi à l'expression génique de l'intégrines $\alpha6\beta1$. $\alpha6\beta1$ est un autre complexe récepteur des laminines dans les cellules de Schwann mais exprimé uniquement au sein des cellules de Schwann immatures ou en début de myélinisation (M. Laura Feltri *et al.*, 2002). Nous nous sommes aussi intéressés à l'expression protéique de PMP22 et de ces mêmes intégrines par Western-Blot et immunohistochimie, associés à de la microscopie confocale. Enfin, nous avons comparé ces résultats avec l'atteinte des nerfs de ces animaux à l'aide de la microscopie électronique.

Tout d'abord, nous avons observé une variation d'expression des intégrines tant au niveau de l'expression génique qu'au niveau de l'expression protéique. Une diminution de l'expression du complexe $\alpha6\beta4$ de 50 % est détectée chez les animaux hétérozygotes, et une augmentation de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\beta1$ de 60 % chez ces mêmes animaux. Par ailleurs, la diminution d'expression d' $\alpha6\beta4$ est aussi couplée à une mauvaise localisation protéique au sein des cellules de Schwann. En effet, $\alpha6\beta4$ exprimé au niveau de la membrane des cellules de Schwann chez les animaux normaux, est majoritairement observé au niveau du cytoplasme Schwannien chez les animaux hétérozygotes ou homozygotes mutés. Ce même défaut de localisation est observé pour PMP22, et la colocalisation avec $\alpha6\beta4$ semble conservée. Par ailleurs, en plus de l'expression de *PMP22* de souris présent dans le transgène, nous avons observé une augmentation du niveau d'ARN *PMP22* de rat, montrant une activation du gène de PMP22 endogène, témoignant d'une régulation active du gène *PMP22*.

L'intégrines $\alpha6\beta4$ est un marqueur de maturation des cellules de Schwann myélinisantes alors que $\alpha6\beta1$ est exprimée dans les cellules de Schwann lors de l'initialisation de la myélinisation et disparaît progressivement au cours de la progression de la myélinisation. Les cellules de Schwann des rats CMT1A présenteraient donc un retard dans leur maturation.

Title: PMP22 overexpression is associated with a downregulation of $\alpha 6\beta 4$ integrins in the peripheral nerves of CMT1A rats

Running head: PMP22 overexpression and $\alpha 6\beta 4$ integrin expression

Authors : Maxime Jouaud¹, Laurence Richard³, Benoît Funalot^{4,5}, Jean-Michel Vallat³, Franck G Sturtz^{1,2}, Anne-Sophie Lia^{1,2}

- 1- Univ. Limoges, Maintenance myéliniques et neuropathies périphériques, EA 6309, F-87000 Limoges, France
- 2- CHU Limoges, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France.
- 3- CHU Limoges, Department of Neurology, National Reference Center for Rare Peripheral Neuropathies, F-87000 Limoges, France.
- 4- Assistance-Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Henri-Mondor, Département de Génétique, F-94000 Créteil, France
- 5- Inserm U955, équipe 10, institut Mondor de Recherches Biomédicales, Université Paris-Est, Faculté de Médecine, F-94000 Créteil, France

Address to whom correspondence should be addressed: Anne-Sophie Lia, Université de Limoges, EA6309, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 2 rue du Docteur Marcland, F-87025 Limoges, France.
Tel.: 33-555-435-938; Fax : 33-555-435-885; E-mail : asliabaldini@unilim.fr

Abstract

The most frequent subtype of Charcot-Marie-Tooth disease, CMT1A, is caused by a recurrent duplication of a region of human chromosome 17 encompassing the Peripheral Myelin Protein 22 (PMP22) gene, which results in an overexpression of the PMP22 protein. This excess of wild-type PMP22 protein leads to peripheral nerve demyelination, but the precise mechanism by which PMP22 overexpression triggers demyelination is currently not well established. As a direct interaction has been described between PMP22 and the $\alpha 6\beta 4$ integrin, we aimed to study the in-vivo effects of PMP22 overexpression on the two main integrins of Schwann cells ($\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 6\beta 1$). For this purpose, we used the CMT1A rat model described by Sereda et al. We found that the levels of $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrin mRNAs and proteins are reduced respectively by 50% and 75% in CMT1A rats while the levels of $\beta 1$ integrin mRNA and protein are significantly increased (+60%). Moreover, the cellular localizations of these proteins appear to be altered. PMP22, a protein expressed at the outer SCs membrane in normal rats, is then observed within SCs cytoplasm in CMT1A rats. Importantly, although the $\beta 4$ integrin is still visible at the SCs membrane, a large amount is present within the SCs cytoplasm and is colocalized with PMP22. Integrin $\beta 1$, which is not expressed in myelinating SCs of normal rats, is reexpressed in these CMT1A SCs. Together these data indicate that the overexpression of PMP22 acts upon the integrin pathway and is associated with the replacement of $\alpha 6\beta 4$ by $\alpha 6\beta 1$ in CMT1A rat nerves. As the $\beta 4$ integrin subunit has an important signalling domain, this may contribute to the basal lamina and myelination defect.

Key words: Integrins, CMT1A, rats, PMP22, Schwann

INTRODUCTION

Charcot-Marie-Tooth disease is the most common hereditary peripheral neuropathy (Patzkó and Shy, 2011). Approximately, half of the patients belong to the CMT1A subtype which is caused in the majority of cases by the duplication of a 1.5 Mb region of human chromosome 17 containing the myelin gene *PMP22* encoding a peripheral myelin protein of 22 kDa (Fridman et al., 2015; Krajewski et al., 2000; Thomas et al., 1997). The duplication of this gene leads to an overexpression resulting in abnormal Schwann cells (SCs) myelination eventually leading to axonal loss and muscle wasting (Thomas et al., 1997). Symptoms usually start in the first decade of life and result in significant disability. A deletion of the same chromosome 17 region causes a hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP), and tomacula are the pathologic hallmark of HNPP (Gabreëls-Festen and Wetering, 1999). To the contrary of CMT1A patients, HNPP patients usually have very mild symptoms if any. They may present reversible focal sensory loss and transient weakness or palsy that often develop when peripheral nerves are challenged by mechanical stress including stretching, compression, or repetitive movement of the affected limbs (Li et al., 2004). Altogether, one can see that overexpression of *PMP22* is usually pathogenic while the lack of one copy of *PMP22* (HNPP) is not that pathogenic. However, a complete lack of *PMP22* is highly pathogenic (Jouaud et al., 2016). So, a proper expression of *PMP22* is key for a normal nerve myelination and function. Some time ago, several teams showed that *PMP22* overexpression overwhelm the protein degradation system of Schwann cells, thus inducing the formation of *PMP22* aggregates in the cytoplasm (Dickson et al., 2002; Fortun et al., 2007, 2006, 2003; Niemann et al., 2000). However, this action does not explain the pathophysiology.

Integrins $\alpha6\beta4$ and $\alpha6\beta1$ have been known to play a key role in mediating the interactions between SCs and basal lamina constituents (Previtali et al., 2001). Integrins are a family of cell surface receptors that mediate adhesion of cells to other cells or to extra-cellular matrix. All integrins are $\alpha\beta$ heterodimers expressed on many cell types (Campbell and Humphries, 2011). They are known to be laminin receptors and some are involved in Schwann cell differentiation and myelination (Feltri et al., 2002, 1994). Amici et al. studied integrin expression in a *PMP22* knock-out mouse model (Amici et al., 2006a). They showed that *PMP22* interacts with the $\beta4$ integrin subunit in normal condition. When *PMP22* is deleted, a reduction of the $\beta4$ integrin and a loss of basal lamina are observed.

The effects of *PMP22* overexpression on $\alpha6\beta4$ and $\alpha6\beta1$ integrins had never been studied. We used a CMT1A rat model developed by KA Nave's team and studied several animals carrying 3 or 6

supplementary copies of the *PMP22* gene coming from the mouse genome (M Sereda et al., 1996). The following study was performed on 3 heterozygous rats (with 5 copies of the *PMP22* gene, 2 rat and 3 mouse), 1 homozygous rat (with 8 copies of the *PMP22* gene, 2 rat and 6 mouse) and 3 normal rats on the same strain. On nerves of these animals, we performed gene expression, protein expression and immunostaining studies for PMP22, $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 6\beta 1$ integrins.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The generation of *Pmp22* transgenic CMT rats has been described. (Michael Sereda et al., 1996). This transgenic line is over expressing PMP22 protein due to an introduction of transgenic copies of the PMP22 gene coming from mouse. We used heterozygous rats carrying 3 supplementary copies of PMP22 gene from mouse, and homozygous rats carrying 2 x 3 supplementary copies of the PMP22 gene coming from mouse. We only used 7.5 months old rats in this study as this age was that of an adult rat and compatible with the ethical survival of the homozygous rat. The animal ethics committee of the University of Limoges approved all animal procedures (CREEAL n°14-2013-14).

Molecular analysis

Genotyping

Genotyping of all mutant rats was performed by qRT-PCR analysis on DNA sample. For this purpose, genomic DNA was purified from tail biopsies using the DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's guidelines. Genotype of CMT1A rats and Wild-type rats were identified by presence or absence of the transgene by qRT-PCR using PMP22 mouse-specific primers (R-5'-GACAAACCCAGACAGTTG-3' ; F-5'-CCAGAAAGCCAGGGAATC-3').

Quantification by qRT-PCR analysis

Sciatic nerves were dissected from genotyped rats. The fragments were immediately put in 1 mL of RNeasy Lysis Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) at -20°C. RNA isolation was performed using the RNeasy Plus universal Tissue Kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France) and QIAzol® lysis Reagent (Qiagen®, Courtaboeuf, France). The concentration and purity of total RNAs were measured using a Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA).

In order to obtain cDNA, reverse transcription was performed on 500 ng of RNA suspended in 3 μ l gDNA-free water, using the Quantitect reverse transcription kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France). Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was used to analyze *PMP22* and integrin gene expression on heterozygous and homozygous animals compared with normal animals. The expression of genes was normalized using two reference genes: HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) and RICTOR (RPTOR independent companion of MTOR complex 2) described as good for normalizing quantitative real-time PCR assays in injured peripheral nerves (Gambarotta et al., 2014). qRT-PCR were performed using a Rotor-gene 6000 real-time PCR cycler (RG; Corbett Life Science, Sydney, Australia) and the SYBR green RT-PCR kit (Qiagen, Germany). All primers used are listed in Table 1. Crossing points (Cp) for each vial was determined using a threshold of 10^{-1} . This value was chosen as it was clearly above the background fluorescence level. A melting curve analysis was performed which resulted in single product specific melting temperatures. No primer-dimers were generated during the applied 40 real-time PCR amplification cycles. All samples were measured in triplicate and finally analysed. All indicated values are standardized according to samples of wild type nerve.

Comparisons of total or target gene expression were done by calculating the difference in the threshold cycles (Ct). The relative expression between normal rats and heterozygous or homozygous rats was calculated by:

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

where $\Delta\Delta Ct = (Ct_{PMP22\ mRNA} - Ct_{ref\ mRNA})_{rat\ homo/het} - (Ct_{PMP22\ mRNA} - Ct_{ref\ mRNA})_{normal\ rat}$. Student's t-test was used to analyse the data and to determine the statistical significance of any difference in gene expression between wild-type, heterozygous and homozygous group.

Protein expression by Western Blot analysis

Sciatic nerves were dissected from genotyped rats. Nerve were washed and lysed in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 20 μ g/ml aprotinin) containing protease inhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics, Meylan, France). The protein level was determined using the Bradford method. Proteins (10-100 μ g) were separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France) and probed with the same antibodies used in immunostaining protocols. After incubation with secondary antibodies (Dako France S.A.S., Trappes, France and Cell Signaling Technology, Ozyme, France), blots were developed using the ECL Plus Western Blotting Detection

System (Amersham Pharmacia Biotech) and G: BOX system (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Membranes were then reblotted with anti- β -actin (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) used as a loading control. Intensity quantification of the bands was obtained using ImageJ software (Schindelin et al., 2015).

Cellular localisation (immunostaining)

Sciatic nerves were dissected from genotyped rats. Samples were frozen by immersion in liquid nitrogen- cooled N-methyl butane. Frozen sections (8 μ m) were dried for 1H on Superfrost/plus slides, followed by fixation with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. Antigenic sites were exposed by SDS 3% in PBS during 5 minutes. Samples were blocked by BSA 10% in PBS for 1 h. Primary antibodies including (Anti- α 6 integrin, sc-6597 from Santa Cruz 1:200 ; Anti- β 4 integrin, Ab 29042 from Abcam, 1:500 ; Anti-PMP22 P0078 from Sigma Aldrich 1:200; Anti- β 1 integrin Ab-52971 from Abcam, 1:200), were added in 4% BSA in PBS overnight at 4°C. The samples were rinsed during 15 min in PBS, at room temperature. Then incubated with Alexa Fluor antibodies (Donkey anti-rabbit Alexa-Fluor 594 and 488, Donkey anti-goat Alexa-Fluor 488, donkey anti-mouse Alexa-Fluor 488 all concentrated at 1: 500) in PBS for 2 h at room temperature. Coverslips were mounted by using the Dako fluorescence Mounting Medium antibodies (Dako France S.A.S., Trappes, France and Cell Signaling Technology, Ozyme, France). Samples were imaged with Zeiss LSM880 confocal microscope and imaged with ImageJ software (NIH).

Nerve morphology (electron microscopy)

Pathological examination the nerve sections included light and electron microscopic (EM) analysis. Specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide and embedded in epoxy resin. Cross-sections (1 μ m thick) were stained with toluidine blue and examined under the light microscope. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined with an electron microscopy.

RESULTS

Integrin gene expression (qRT-PCR analysis)

The effect of PMP22 duplication on integrin genes, *ITGB4*, *ITGB1* and *ITGA6*, expression has been investigated by qRT-PCR analysis (Figure 1) on mRNAs obtained from nerves of CMT1A rats, using the *RICTOR* gene as a reference (Gambarotta et al., 2014). This study was performed on 3 normal rats, 3 heterozygous rats and 1 homozygous rat. These animals were from the same litter and were 7.5 months old. First, we did not observe a significant variation between levels of expression of the 3

integrin genes of the 3 normal rats. So, we choose one of these rats as the reference. Regarding the *ITGB4* gene expression, we observed a significant reduction ($-56\% \pm 11$) of mRNA levels between normal and heterozygous rat nerves. This decrease was even larger (-92%) between normal and homozygous rat nerves. Similarly, a decrease of expression was observed for the *ITGA6* gene: RNA levels were decreased by $70\% \pm 5$ in heterozygous rats as compared to normal rats, and by 85% in the homozygous rat when compared to normal rats. At the opposite, *ITGB1* RNAs, which are nearly not detectable in normal nerves, were much more abundant in heterozygous rats nerve ($+300\% \pm 70$) and this increase was even larger ($+430\% \pm 24$) in the homozygous rat. Interestingly, one should also note that normal rats exhibited very similar integrin mRNA levels, these were much more variable in heterozygous rats.

Protein expression of PMP22 and integrins

To confirm the results obtained above, western blot analysis of integrin proteins was performed (Figure 2). Results of protein quantification appeared in accordance with those obtained by qRT-PCR. We observed a decrease of integrin $\alpha 6$ ($-76\% \pm 6$) and of integrin $\beta 4$ ($-60\% \pm 23$) protein levels in the sciatic nerve of heterozygous rats. This decrease was stronger in the homozygous rat ($\alpha 6$ integrin: -97% , $\beta 4$ integrin: -96%). At the opposite Integrin $\beta 1$ levels appear to be very low in normal adult rat nerve and much higher in heterozygous nerves. Highest levels were observed in the homozygous animal.

Immunohistochemical analysis

Cellular localization of integrins expression has been studied by immunohistochemical analysis and confocal microscopy. In normal nerve, PMP22 protein is mainly localized at the periphery of Schwann cells while, in heterozygous nerve, PMP22 is more expressed in Schwann cells cytoplasm. In homozygous nerve, the tissue disruption on frozen sections is so intense that it prevents us to conclude on a precise localization of PMP22 protein in the cells.

In normal rat nerves, integrins $\alpha 6$ and $\beta 4$ are expressed at the periphery of myelinating Schwann cells and are colocalized with PMP22 while no $\beta 1$ integrin signal is observable (Figure 3). In nerves of heterozygous rats, $\beta 4$, $\alpha 6$ and PMP22 are still slightly expressed at the periphery of Schwann cells but are also visible within Schwann cells cytoplasm. In the nerve of the homozygous rat, PMP22 and $\alpha 6$ and $\beta 4$ seem to be colocalized within Schwann cells cytoplasm.

Finally, integrin $\beta 1$ protein, which is not detectable in normal nerves, is detected in some Schwann cell cytoplasm in the nerves of heterozygous rats, where the $\beta 1$ protein appears to be colocalized

with PMP22 and $\alpha 6$. In the nerves of the homozygous rat, $\beta 1$ integrin is observable in almost all Schwann cell cytoplasm and, despite the tissue disruption, is colocalized with PMP22, $\beta 4$ and $\alpha 6$ proteins.

PMP22 genes expression

Specific (rat or mouse) *PMP22* gene expression was performed by qRT-PCR analysis on nerves obtained from CMT1A rats. Astonishingly, using primers detecting specifically the rat or the mouse or both strains of the *PMP22* gene (Figure 4), we observed that heterozygous and homozygous CMT1A rats overexpressed the rat *PMP22* gene even though these animals already overexpressed the murine transgene carrying *PMP22* genes. The overexpression is of 4 fold (+400% +/- 100) in the heterozygous rats nerves and is even stronger in the homozygous rat nerve (+800%). We checked that mouse *PMP22* mRNAs are not present in normal rat nerve and are present in heterozygous nerve rats with a double dose in homozygous rat nerves.

Nerve pathology (electron microscopy)

In the nerves of heterozygous rats, a general hypomyelination of axons is obvious (Figure 5) but the level of hypomyelination differs between individuals (data not shown). Most of the large axons present an abnormally thin myelin sheath. For smaller axons, we can observe a normal myelination. Onion bulb structures are quite rare but basal lamina proliferations are observable around large axons with a very thin myelin sheath. There is also Schwann cells cytoplasm proliferations (onion bulbs). Some myelin sheets present defect of compaction with cytoplasm pocket included in the compact myelin. Small unmyelinated axons and their Schwann cells have no apparent defect.

In nerve of the homozygous rat, myelin sheaths were almost completely absent. By looking at high magnification, we observed around some axons very thin myelin sheaths made of only few well compacted myelin lamellae which has not been described before. Onion-bulb-like proliferations of Schwann cell cytoplasm and redundant basal laminae around these axons and a few large naked axons were clearly seen. On the opposite, small axons and unmyelinated Schwann cells had no visible defect.

DISCUSSION

In the current study, the expression of $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrins subunits (*ITGA6* and *ITGB4*, respectively) were found noticeably decreased in a model of rat overexpressing PMP22, while the

expression of $\beta 1$ subunit was increased. Astonishingly, the modifications of expression of these proteins were obtained at the transcriptional level and not only at a translational level, meaning that the deficit of $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrin is not due to an altered translation of their mRNAs but to a decrease of their gene expression. Furthermore, an altered localization of $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrin subunits was also observed, i.e. these proteins were localized also within the cytoplasm of Schwann cells and not only at the membrane as seen in normal nerves. Finally, the rat *PMP22* gene expression was found to be markedly increased in CMT1A rats even though these rats were already overexpressing the mouse *PMP22*.

The CMT1A model used in this study carries a murine transgene of 3 copies of *PMP22* in heterozygous rats and 6 copies in homozygous rats (Michael Sereda et al., 1996). Despite the fact the *PMP22* genes introduced in the rat genome of this model are mouse genes and not rat genes, this model has been regularly compared to nerve pathology of CMT1A patients and reproduce the CMT1A disease with a fair precision (Fledrich et al., 2012; M Sereda et al., 1996). The overexpression of mouse *PMP22* in the heterozygous, and even more in the homozygous rats, is clear and the *PMP22* protein localizes very similarly to that of the rat *PMP22* as seen on Figure 3. Interestingly, this model allows looking at the expression of the different *PMP22* genes (rat or mouse) using specific PCR primers.

To explain the pathophysiology of the CMT disease, *PMP22* overexpression has been thought to overwhelm the protein degradation system, leading to formation of protein aggregates in the Schwann cells cytoplasm (Dickson et al., 2002; Fortun et al., 2007, 2006, 2003; Niemann et al., 2000). This is most likely true but may not be sufficient to explain all of the cellular dysfunctions. Indeed, the modifications, at the transcriptional level, of integrins expression we have found in this study have to make us dig further. However, how the overexpression of *PMP22* is associated or can induce an alteration of integrin genes expression is not an easy problem to solve. In the PNS, integrins appear to have a primary role in several processes, i.e. during embryogenesis, post-natal development, homeostasis and repair of the PNS. During radial sorting, Schwann cells express $\alpha 6\beta 1$ integrin, and during myelination they mainly express $\alpha 6\beta 4$ integrin (Chernousov and Carey, 2000; Chernousov et al., 2008; Fernandez-Valle et al., 1994). $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 6\beta 1$ interact both with laminin receptors of the basal lamina and the myelination is concomitant to the assembly of basal lamina (Eldridge et al., 1989). $\alpha 6$ dimerizes preferentially with $\beta 4$ when both $\beta 1$ and $\beta 4$ are expressed (Giancotti et al., 1992). Thus, $\alpha 6\beta 1$ is mainly expressed during myelin initiation and is gradually replaced by $\alpha 6\beta 4$ during the progression of myelination and is the main laminin receptor in mature myelin. $\alpha 6\beta 4$ appears during

myelin synthesis and its expression continues to increase in adulthood (Previtali et al., 2003; Verheijen et al., 2003).

This integrin $\alpha6\beta4$ is of particular interest. It is a major component of hemidesmosomes as it stabilizes keratinocyte cell adhesion to the epidermal basement membrane through binding to the cytoskeletal linker protein plectin and association with keratin filaments (Litjens et al., 2006). Another important point to note is that the $\beta4$ integrin subunit has the longest cytoplasmic domain (1000 aminoacids) of all integrins (usually 50 aminoacids) and this domain mediates different cellular signals. Through recruitment of Shc and PI3 kinase, $\beta4$ activates the MAPK (mitogen-activated protein kinase) and NF- κ B (nuclear factor κ B) pathways (Giancotti and Tarone, 2003). The interaction of $\alpha6\beta4$ integrin with laminin 332 and 511/521 activates Sgk1 resulting in phosphorylation of NDRG1 (N-myc downstream-regulated gene 1), a Schwann cell protein critical for myelin stability (Heller et al., 2014; Kalaydjieva et al., 2000; Okuda et al., 2004). $\beta4$ can interact with intermediate filaments such as dystocin (Litjens et al., 2003) which play an essential role in myelination (Bernier et al., 1998). $\alpha6\beta4$ integrins in epithelia cells, also amplifies neuregulin signalling (Guo et al., 2006) which is crucial at multiple stages of Schwann cell development (Nave and Salzer, 2006). Moreover, Amici et al. showed that PMP22 is a binding partner for integrin $\beta4$ in a mouse model of *PMP22* depletion (Amici et al., 2006b) and that a lack of PMP22 is associated with a decrease of $\beta4$ integrin levels and the loss of basal lamina. Altogether these findings tend to show that the presence of $\alpha6\beta4$ at the Schwann cell membrane plays a central role in the cellular pathways that initiate myelination and/or that maintain myelin.

Looking at these data, we hypothesize that PMP22 aggregates stack $\beta4$ in the cytoplasm of Schwann cells when overexpressed. This induces a reduction of $\alpha6\beta4$ levels at the outer membrane, which leads to fewer signals of the $\beta4$ cytoplasmic domain thus inducing a decrease in myelination signals (Figure 5). This hypothesis may be strengthened by results obtained on an animal with a conditional knock out of the $\beta4$ integrin (Van der Zee et al., 2008). In this study, following a nerve crush in animals in which the $\beta4$ integrin gene has been conditionally inactivated in Schwann cells, the authors showed that $\alpha6\beta4$ is not strictly required for the initiation of myelination but that its loss leads to a diminished outgrowth and reduced myelination of axons, as indicated by a higher g-ratio, during peripheral nerve regeneration. This alteration in signal transduction via $\beta4$ may be also the cause of the overexpression of rat PMP22 when the Schwann cells are already loaded in mouse PMP22. By overexpressing rat PMP22, Schwann cells are probably trying to overcome what they perceive as an insufficient myelination (Figure 4). The accumulation of PMP22 protein in Schwann cells cytoplasm

instead of in Schwann cell membrane seems to impede $\alpha 6$ integrin interaction with $\beta 4$ integrin, maintaining $\alpha 6\beta 1$ integrin complex and blocking or slowing down myelination.

Of course, these data have to be checked by a broader transcriptomic study of all genes involved in the myelination process including *EGR2* (Krox-20), *c-jun* and *ITGA7*. Ideally, a proteomic study and a metabolomic study (PI3K, MAPK, neuregulin pathways) should be done at the same time. However, these would be technically much more difficult than a transcriptomic study.

CONCLUSION

In conclusion, PMP22-integrin interactions seem to play a crucial role in CMT. We believe further work is requested to investigate the role of these interactions to better understand the mechanisms by which overexpression PMP22 is pathogenic in CMT1A patients as it may open ways to therapeutic means.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. K.A. Nave for providing us with the strain of animals used for this study.

FUNDING STATEMENT

This research was supported by the Limousin region and by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). The Authors declare no other funding sources or interest conflict.

COMPETING INTERESTS

None declared.

FIGURE LEGENDS

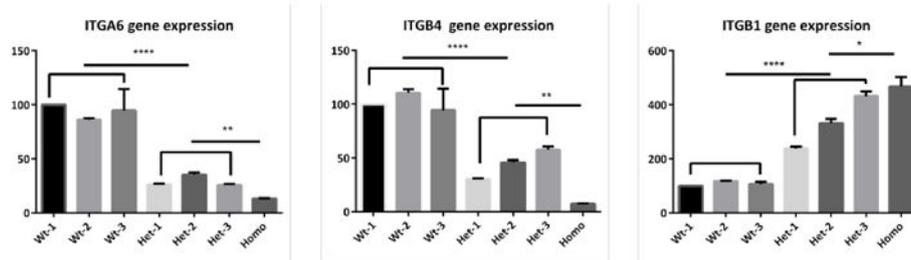


Figure 1: mRNA levels of ITGA6, ITGB4 and ITGB1 genes in nerves of CMT1A rats (Wt = wildtype, Het = heterozygous, Homo = homozygous)

qRT-PCR analysis shows that ITGA6 and ITGB4 integrin gene expression is decreased in nerves of CMT1A heterozygous and homozygous rats while ITGB1 gene expression is increased in these nerves. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

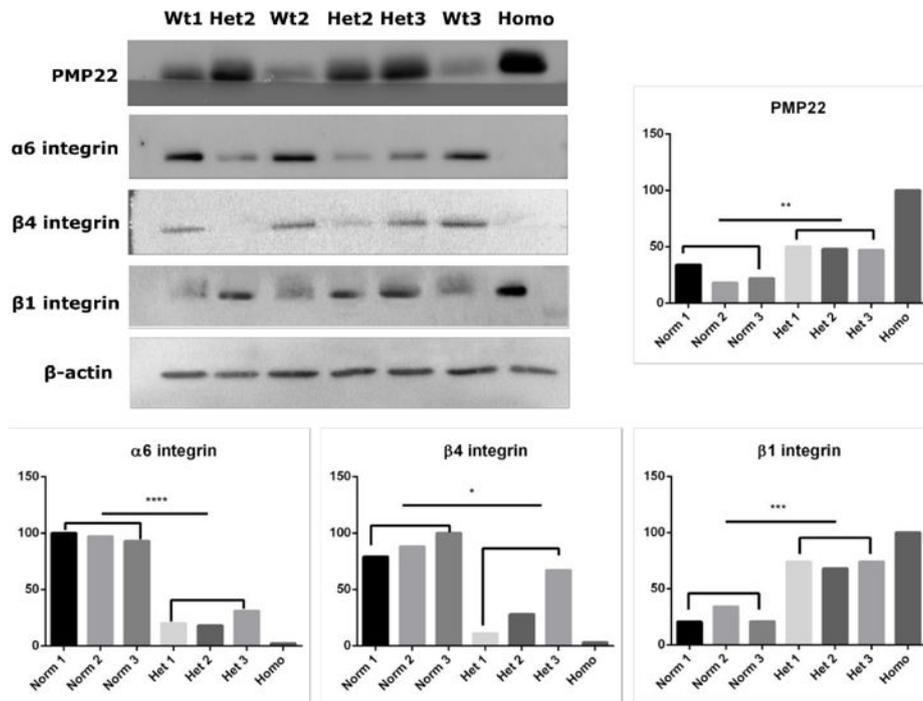


Figure 1 : Protein quantification of PMP22, α6, β4, β1 integrin in CMT1A rats (*Wt* = *wildtype*, *Het* = *heterozygous*, *Homo* = *homozygous*)

Immunoblot of PMP22, α6, β4, β1 integrin proteins. β-actin was used as loading control. Histograms represents the band density measured using Image J relative to the β-actin band density. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001

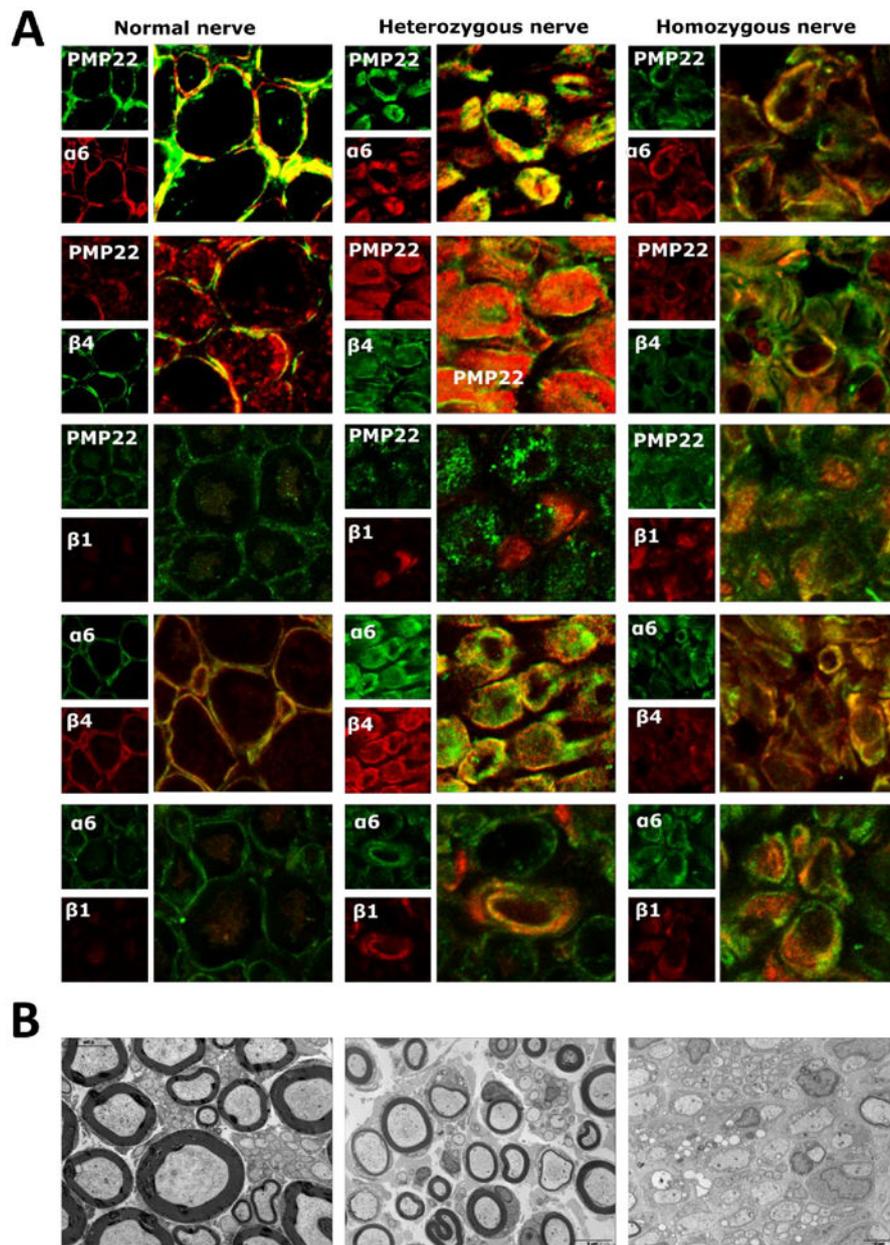


Figure 2 :

A: The distribution and expression of PMP22, $\beta 4$, $\alpha 6$ and $\beta 1$ integrins in frozen crosssections of nerve of normal rat, heterozygous nerve of CMT1A rat and homozygous nerve of CMT1A rat. Crosssections were processed for immunofluorescence and visualized by confocal microscopy. Primary antibodies are indicated in the left corner of each images.

B: Electron micrographs: transverse sections of normal, heterozygous and homozygous CMT1A rats (mettre les lettres correspondantes aux photos) sciatic nerve. Small axons of heterozygous animals are normally myelinated but large axons are surrounded by too thin myelin sheaths. In the nerves of homozygous rats, there is almost a complete lack of myelin; nevertheless a few axons present very thin myelin sheaths which are only visible by EM.

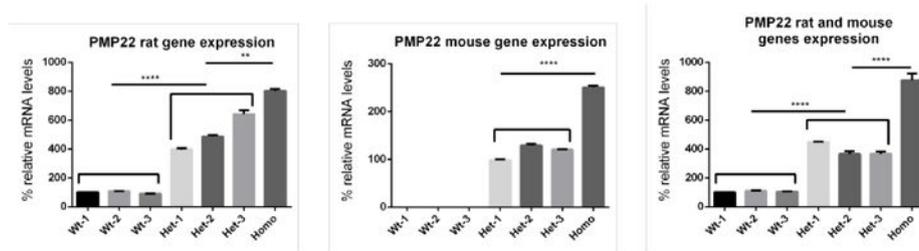


Figure 4: mRNA levels of PMP22 genes rats or/and mouse in nerves of CMT1A rats (Wt = wildtype, Het = heterozygous, Homo = homozygous)

qRT-PCR analysis shows that the PMP22 rat gene is actively activated in heterozygous and homozygous rats * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

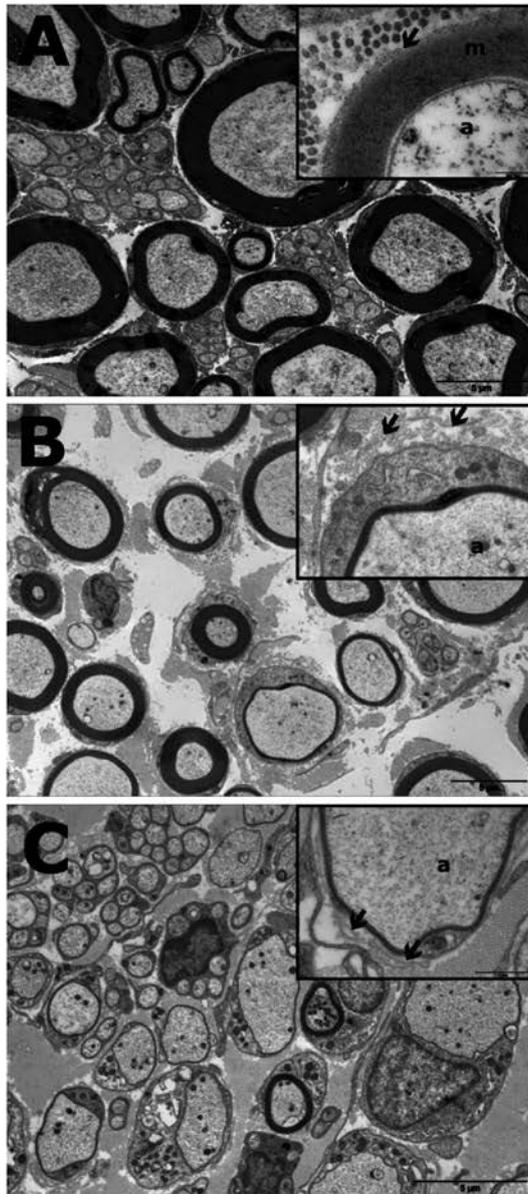


Figure 5 : Normal, heterozygous, homozygous rat nerve electron micrograph, transverse section. m: myelin; a: axon; arrow: basal lamina

- A) Normal rat nerve: Large axons (a) are normally myelinated (m) and the basal lamina is close to myelin (arrow). Large axons are more myelinated than smaller axons.
- B) Heterozygous CMT1A rat nerve: Large axons are surrounded by a too thin myelin sheath. Basal lamina proliferations (arrow) are observable and appear to be distant from myelin.
- C) Homozygous CMT1A nerve. Large axons are almost unmyelinated, with extremely rare small axons showing a normal myelin sheath. Many axons are surrounded by only a few turns of myelin. Proliferation of basal lamina distant from Schwann cell and myelin are observable around large axons.

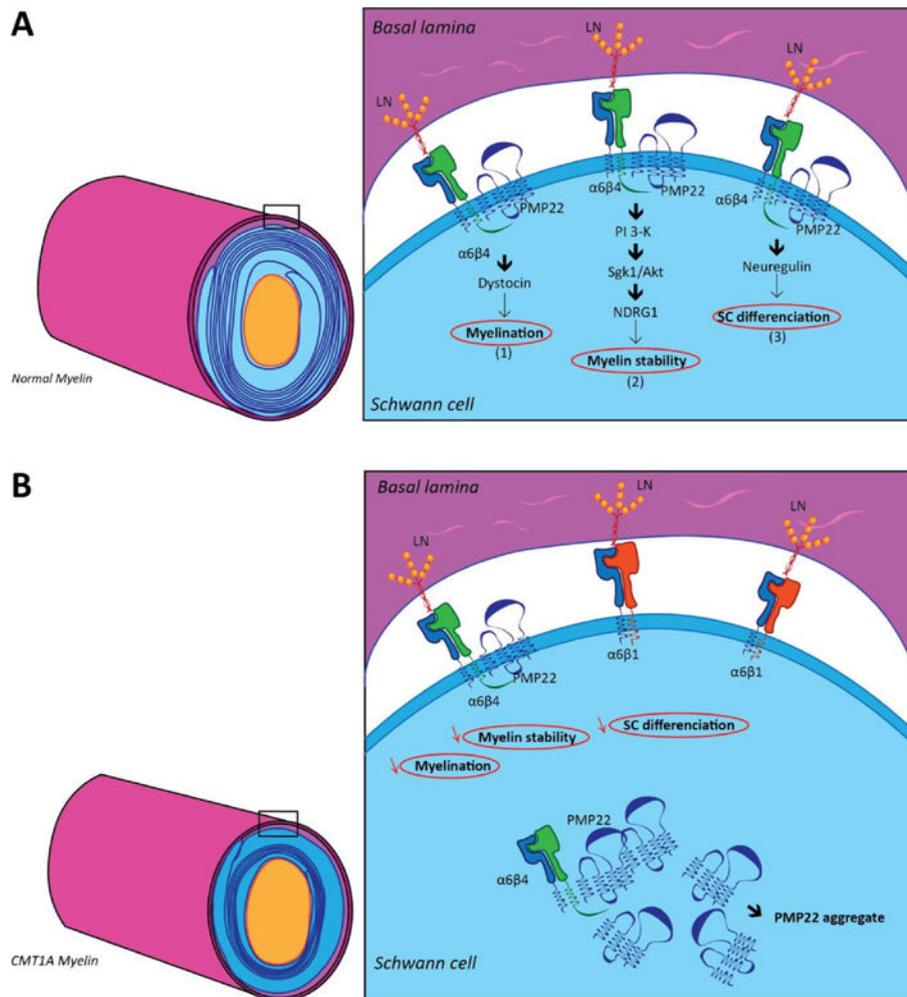


Figure 6: Hypothetic schematic representation of the $\alpha6\beta4$ integrin pathway in Schwann cell abaxonal region in normal condition and in CMT1A disease.

- A) In normal condition of a myelinating Schwann cell of a large axon $\alpha6\beta4$ complex is expression in the abaxonal membrane, it interact with laminin 332 and 511/521 located in the basal lamina. $\alpha6\beta4$ interact with the PMP22 protein also present in the membrane of Schwann cell in the abaxonal region(Amici et al., 2006a). The $\alpha6\beta4$ expression is linked to different pathway:

(1) $\beta 4$ can interact with intermediate filaments such as dystocin (Litjens et al., 2003) which play an essential role in myelination. $\alpha 6\beta 4$ integrins in epithelia cells

(2) The interaction through laminin 2 and $\alpha 6\beta 4$ integrin complex activate Sgk1 resulting in phosphorylation of NDRG1 critical for myelin stability (Heller et al., 2014; Kalaydjieva et al., 2000; Okuda et al., 2004).

(3) $\beta 4$ also amplifies neuregulin signalling (Guo et al., 2006) which is crucial at multiple stages of Schwann cell development.

B) In the CMT1A disease the PMP22 protein is overexpressed, and aggregate in the Schwann cell cytoplasm and retain $\alpha 6\beta 4$ complex. The amount of $\alpha 6\beta 4$ normally present at the Schwann cell membrane is abnormally low leading to misregulation of the pathways 1, 2 and 3 resulting in abnormal myelin thickness. The $\alpha 6\beta 1$ complex remains expressed in Schwann cell membrane and interacts with same laminins as $\alpha 6\beta 4$ but is not enough to produce normal mature myelin.

Protein	Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
$\alpha 6$ integrin	<i>ITGA6</i>	CACTCAGGTTTCGAGTGACGG	TGTGGATCTCAGCCTTGTTGG
$\beta 4$ integrin	<i>ITGB4</i>	ACTGGTCAACGAGGACAACC	ATAGGAATGGACATGGGCCG
$\beta 1$ integrin	<i>ITGB1</i>	TCACGTGCATGTTGTGGAGA	TTTTACCCGTGTCCCACTT
PMP22	<i>PMP22</i>	GTTCTGTTCTTCTGCCAGC	CCTCATTGCGTTCGCA
RICTOR	<i>RICTOR</i>	CCTTCCGAATACGAGGGCG	ATTCAGATGGCCCAGCTTTCT
HPRT	<i>HPRT</i>	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC

Table 1 : primer used in qRT-PCR analysis

REFERENCES

- Amici S a, Dunn W a, Murphy AJ, Adams NC, Gale NW, Valenzuela DM, et al. Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J. Neurosci.* 2006; 26: 1179–89.
- Bernier G, De Repentigny Y, Mathieu M, David S, Kothary R. Dystonin is an essential component of the Schwann cell cytoskeleton at the time of myelination. *Development* 1998; 125
- Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3: a004994.
- Chernousov M a, Yu W-M, Chen Z-L, Carey DJ, Strickland S. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia* 2008; 56: 1498–1507.
- Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol. Histopathol.* 2000; 15: 593–601.
- Dickson KM, Bergeron JJM, Shames I, Colby J, Nguyen DT, Chevet E, et al. Association of calnexin with mutant peripheral myelin protein-22 ex vivo: a basis for 'gain-of-function' ER diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99: 9852–7.
- Eldridge CF, Bunge MB, Bunge RP. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro: II. Control of myelin formation by basal lamina. *J. Neurosci.* 1989; 9: 625–38.
- Feltri ML, Porta DG, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, et al. Conditional disruption of β 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J. Cell Biol.* 2002; 156: 199–209.
- Feltri ML, Scherer SS, Nemni R, Kamholz J, Vogelbacker H, Scott MO, et al. Beta 4 integrin expression in myelinating Schwann cells is polarized, developmentally regulated and axonally dependent. *Development* 1994; 120: 1287–1301.
- Fernandez-Valle C, Gwynn L, Wood PM, Carbonetto S, Bunge MB. Anti-beta 1 integrin antibody inhibits Schwann cell myelination. *J. Neurobiol.* 1994; 25: 1207–26.
- Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Wichert SP, Stassart RM, Meyer zu Hörste G, et al. A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain* 2012; 135: 72–87.
- Fortun J, Dunn W a, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J. Neurosci.* 2003; 23: 10672–80.
- Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA, Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol. Dis.* 2006; 22: 153–64.
- Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol. Dis.* 2007; 25: 252–65.
- Fridman V, Bundy B, Reilly MM, Pareyson D, Bacon C, Burns J, et al. CMT subtypes and disease burden

in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2015; 86: 873–8.

Gabreëls-Festen A, Wetering R V. Human nerve pathology caused by different mutational mechanisms of the PMP22 gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 883: 336–43.

Gambarotta G, Ronchi G, Friard O, Galletta P, Perroteau I, Geuna S. Identification and validation of suitable housekeeping genes for normalizing quantitative real-time PCR assays in injured peripheral nerves. *PLoS One* 2014; 9: e105601.

Giancotti FG, Stepp MA, Suzuki S, Engvall E, Ruoslahti E. Proteolytic processing of endogenous and recombinant beta 4 integrin subunit. *J. Cell Biol.* 1992; 118: 951–9.

Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; 19: 173–206.

Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G, et al. β 4 Integrin Amplifies ErbB2 Signaling to Promote Mammary Tumorigenesis. *Cell* 2006; 126: 489–502.

Heller B a., Ghidinelli M, Voelkl J, Einheber S, Smith R, Grund E, et al. Functionally distinct PI 3-kinase pathways regulate myelination in the peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* 2014; 204: 1219–1236.

Jouaud M, Gonnaud P-M, Richard L, Latour P, Ollagnon-Roman E, Sturtz FG, et al. Congenital hypomyelinating neuropathy due to the association of a truncating mutation in PMP22 with the classical HNPP deletion. *Neuromuscul. Disord.* 2016

Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, de Jonge R, et al. N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: 47–58.

Krajewski KM, Lewis RA, Fuerst DR, Turansky C, Hinderer SR, Garbern J, et al. Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2000; 123 (Pt 7): 1516–27.

Li J, Krajewski K, Lewis RA, Shy ME. Loss-of-function phenotype of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Muscle Nerve* 2004; 29: 205–10.

Litjens SHM, Koster J, Kuikman I, van Wilpe S, de Pereda JM, Sonnenberg A. Specificity of binding of the plectin actin-binding domain to beta4 integrin. *Mol. Biol. Cell* 2003; 14: 4039–50.

Litjens SHM, de Pereda JM, Sonnenberg A. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 376–83.

Nave K-A, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006; 16: 492–500.

Niemann S, Sereda MW, Suter U, Griffiths IR, Nave K a. Uncoupling of myelin assembly and schwann cell differentiation by transgenic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J. Neurosci.* 2000; 20: 4120–8.

Okuda T, Higashi Y, Kokame K, Tanaka C, Kondoh H, Miyata T. Ndr1-deficient mice exhibit a progressive demyelinating disorder of peripheral nerves. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 3949–56.

Patzkó A, Shy ME. Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2011; 11: 78–88.

Previtali SC, Feltri ML, Archelos JJ, Quattrini A, Wrabetz L, Hartung H. Role of integrins in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2001; 64: 35–49.

Previtali SC, Nodari A, Taveggia C, Pardini C, Dina G, Villa A, et al. Expression of laminin receptors in schwann cell differentiation: evidence for distinct roles. *J. Neurosci.* 2003; 23: 5520–5530.

Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 2015; 82: 518–29.

Sereda M, Griffiths I, Pu A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmermann F, et al. A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease. 1996; 16: 1049–1060.

Thomas PK, Marques W, Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL, et al. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 1997; 120 (Pt 3): 465–78.

Verheijen MHG, Chrast R, Burrola P, Lemke G. Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev.* 2003; 17: 2450–64.

Van der Zee CEEM, Kreft M, Beckers G, Kuipers A, Sonnenberg A. Conditional deletion of the Itgb4 integrin gene in Schwann cells leads to delayed peripheral nerve regeneration. *J. Neurosci.* 2008; 28: 11292–303

Discussion concernant l'article 1

Une sur-expression de PMP22 entraîne une accumulation de celle-ci dans le cytoplasme des cellules de Schwann. On suppose que cette accumulation de PMP22 entraîne une saturation du système de dégradation de protéines, entraînant alors la formation d'agrégats de protéines dans les cytoplasmes Schwanniens (Dickson *et al.*, 2002; Fortun *et al.*, 2003, 2006, 2007). Cependant, cette accumulation de protéines n'est pas suffisante pour expliquer les dysfonctions cellulaires. En effet, les modifications d'expression des intégrines au niveau transcriptionnel que nous avons observées dans cette étude nous incitent à approfondir le raisonnement. Comment la sur-expression de PMP22 est-elle associée ou, peut-elle induire une altération de l'expression des gènes des intégrines ?

Au sein du système nerveux périphérique, les intégrines ont un rôle indispensable dans de nombreux processus : durant l'embryogénèse, le développement post natal, l'homéostasie et la réparation du système nerveux périphérique. $\alpha6\beta1$ et $\alpha6\beta4$ sont tous les deux des complexes récepteurs des laminines de la lame basale. $\alpha6\beta1$ est indispensable au tri axonal et à l'initialisation de la myélinisation. $\alpha6\beta4$ est associé à la myélinisation par des cellules de Schwann matures et myélinisantes (Chernousov *et al.*, 2008; Fernandez-Valle *et al.*, 1994). L'intégrine $\alpha6\beta4$ présente un intérêt particulier. C'est un composant majeur des hémidesmosomes qui stabilisent l'adhérence cellulaire des kératinocytes à la membrane basale de l'épiderme en interagissant avec la plectine (Litjens *et al.*, 2006). $\beta4$ est une sous-unité d'intégrine particulière par son long domaine (long de 1000 acides aminés contre 50 pour les autres intégrines). Ce domaine est impliqué dans de nombreux signaux cellulaires ; dont l'activation de MAPK (mitogen activated protein kinase) et NF- κ B (nuclear factor κ B) ; des voies de signalisation impliquées dans la stabilité de la myéline.

D'après nos résultats, nous avons émis plusieurs hypothèses : la formation d'agrégats dans le cytoplasme des cellules de Schwann due à la sur-expression de PMP22 doit séquestrer la sous-unité d'intégrine $\beta4$, entraînant une réduction des niveaux d' $\alpha6\beta4$ au niveau de la membrane externe des cellules de Schwann. Cette réduction des niveaux d' $\alpha6\beta4$ à la membrane entraîne probablement une réduction des signaux de myélinisation normalement induits par la queue cytoplasmique de $\beta4$. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus lors d'une inactivation de $\beta4$ (Van der Zee *et al.*, 2008). Dans cette étude, après une compression du nerf chez l'animal dont le gène ITGB4 a été conditionnellement inactivé, les auteurs ont montré qu' $\alpha6\beta4$ n'est pas indispensable à la myélinisation, mais son absence entraîne une réduction de la myélinisation durant la régénérescence axonale. L'altération de la transduction du signal de $\beta4$ pourrait aussi être responsable de l'activation du gène *PMP22*. Les cellules de Schwann semblent compenser ce qu'elles perçoivent comme une myélinisation insuffisante.

Par ailleurs, la séquestration de $\beta4$ dans le cytoplasme semble empêcher l'interaction d' $\alpha6$ avec $\beta4$ maintenant le complexe $\alpha6\beta1$ et ralentissant donc la maturation des cellules de Schwann et ainsi la myélinisation.

Bien entendu, ces hypothèses devront être vérifiées dans le futur par des études transcriptomiques et protéomiques sur les facteurs de transcription des gènes des intégrines, également sur les voies de signalisation en aval de la queue cytoplasmique de $\beta4$ qui, devraient être impliquées afin de confirmer leurs rôles dans le CMT1A.

Article 2 : Congenital hypomyelinating neuropathy due to the association of a truncating mutation in PMP22 with the classical HNPP deletion.

Jouaud M, Gonnaud PM, Richard L, Latour P, Ollagnon-Roman E, Sturtz F, Mathis S, Magy L, Vallat JM.

Avant-propos de l'article 2

L'HNPP est une neuropathie héréditaire à transmission autosomique dominante, donc il suffit qu'un allèle porte une délétion de *PMP22* pour voir la maladie se déclarer. Donc les cas de patients avec des mutations sur les deux allèles sont extrêmement rares. La maladie est très sévère chez ces patients. Dans cette étude, nous rapportons le cas d'un de ces patients, qui a été suivi par notre équipe dès ses 28 mois, jusqu'à aujourd'hui (21 ans). Le patient a hérité de son père la délétion « classique » de *PMP22* (17p11.2) et d'une mutation non-sens sur *PMP22* de sa mère.

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'absence complète de la protéine PMP22 tel que nous le supposions. Pour cela, par qRT-PCR, nous avons montré que le mécanisme de RNA decay dégradait l'ARN de PMP22 tronqué prouvant alors une absence complète de la protéine PMP22.

Ce patient présente une absence totale de feuillet myéliniques. De nombreuses fibres sont entourées par des proliférations concentriques de lame basale. Une absence totale de myéline chez l'humain est extrêmement rare. C'est la première fois qu'est présentée une biopsie de nerf d'un patient avec des mutations composites sur les deux allèles de *PMP22*.

Cette étude nous a permis de conclure sur le rôle indispensable de PMP22 dans la constitution du mésaxone et l'initialisation de la myélinisation. En effet, les extensions de cytoplasme des cellules de Schwann commencent à entourer l'axone mais les deux extensions semblent s'arrêter à des distances variables l'une de l'autre avant d'entrer en contact. Ceci empêche la formation du mésaxone et donc l'initialisation de la myélinisation. Une telle absence de mésaxone n'a pas été observée chez les animaux modèles sans *PMP22*, mais a été observée chez les souris trembler et trembler J homozygotes (Robertson *et al.*, 1999). Notre étude est la première à décrire la pathologie d'un nerf humain sans PMP22.



Case report

Congenital hypomyelinating neuropathy due to the association of a truncating mutation in PMP22 with the classical HNPP deletion

Maxime Jouaud ^a, Pierre-Marie Gonnaud ^b, Laurence Richard ^c, Philippe Latour ^d,
Elisabeth Ollagnon-Roman ^c, Franck Sturtz ^{a,f}, St phane Mathis ^g, Laurent Magy ^c,
Jean-Michel Vallat ^{c,*}

^a Department 6309, Maintenance Myelinique et Neuropathies Périphériques, Faculté de Médecine de Limoges, Université de Limoges, Limoges, France

^b Department of Neurology and Sleep Disorders, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^c Department of Neurology, National Reference Center for Rare Peripheral Neuropathies, University Hospital, Limoges, France

^d Department of Biochemistry, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^e Department of Genetics, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^f Department of Biochemistry and Genetics, CHU de Limoges, Equipe d'accueil 6309, Maintenance Myelinique et Neuropathies Périphériques, Université de Limoges, Limoges, France

^g Department of Neurology, CHU Poitiers, University of Poitiers, 2 Rue de la Militerie, 86021 Poitiers, France

Received 28 September 2015; received in revised form 20 January 2016; accepted 27 January 2016

Abstract

Congenital hypomyelinating neuropathy appears early in life, resulting in a delay of motor and sensory development. Mutations involve genes such as myelin protein zero (*MPZ*), peripheral myelin protein 22 (*PMP22*), and early growth response 2 (*EGR2*). We present a patient with two compound mutations in *PMP22*: a point mutation causing a premature STOP codon in exon 3 was inherited from the mother on the first allele, and the “typical” *PMP22* deletion in the 17p11.2-p12 region was inherited from the father on the other allele. A sural biopsy was performed at age four. The patient has been followed from 28 months to 21 years of age; he presented significant sensory disturbances, with a slight motor deficit. *PMP22* mRNA quantitation showed a severe decrease of *PMP22* protein. No myelin sheaths were observed in the biopsy; mesaxons failed to form. The absence of *PMP22* provides new insights into the role of this protein.
© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: PMP22; Congenital hypomyelinating neuropathy; CMT; Nerve biopsy

1. Introduction

Congenital hypomyelinating neuropathy (CHN; MIM 605253) is a rare syndrome responsible for severe hypotonia and weakness appearing at birth or in infancy, resulting in a slow progression in motor development [1]. Some cases present with arthrogryposis multiplex and a rapidly fatal outcome due to respiratory distress [2]. Nerve microscopic examination may show amyelination or hypomyelination, sometimes associated with focal myelin foldings; these anomalies are rarely surrounded by classic ‘onion bulbs’ as seen in Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) but more frequently by basal lamina concentric proliferations. Genetic

transmission is either autosomal recessive or undetermined, and dominant transmission is rare. Mutations in *MPZ*, *PMP22* and *EGR2* genes have been described as the most frequent causes of CHN.

We report a patient who inherited the ‘classical’ 17p11.2 *PMP22* deletion from his father and a point mutation of *PMP22* from his mother. This patient has been followed-up from 28 months old until today (21 years old). A nerve biopsy showed a total amyelination and abnormalities of the mesaxons.

2. Case report

2.1. Clinical findings

2.1.1. The propositus (III-1)

The patient was the first full term child born from non-consanguineous parents, after a normal pregnancy and delivery (Fig. 1D). He developed some delay in motor acquisition (standing with support at 27 months) contrasting with a normal

* Corresponding author. Department of Neurology, CHU Poitiers, University of Poitiers, 2 Rue de la Militerie, 86021 Poitiers, France. Tel.: +335 55 05 65 61; fax: +335 55 05 65 67.

E-mail address: jean-michel.vallat@unilim.fr (J.-M. Vallat).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2016.01.004>

0960-8966/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

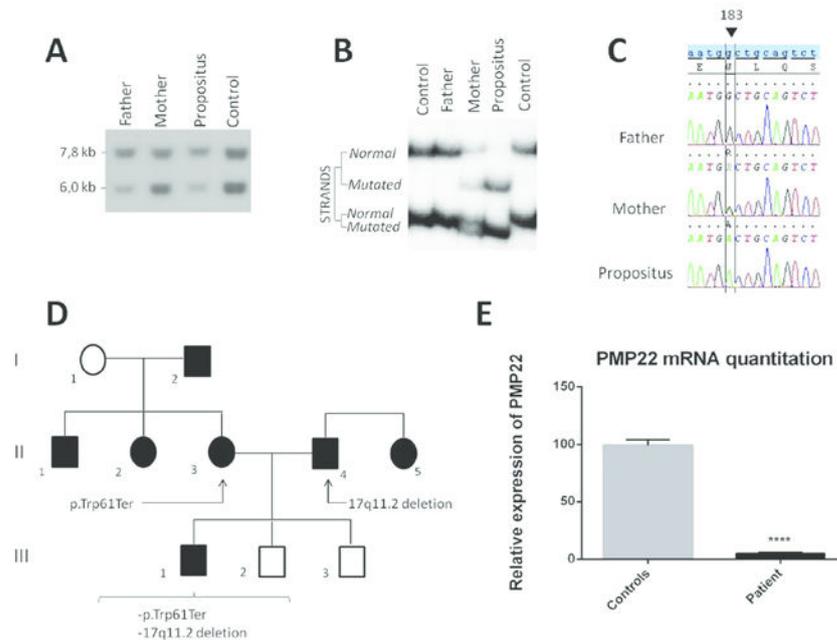


Fig. 1. A. Southern blot probed with pNEA102 showing a loss of a 6.0 kb EcoRI fragment for the father and his son, characteristic of a HNPP deletion. B. SSCP patterns showing the lack of transmission of the paternal allele and the maternal mutation. C. Sanger sequencing results for the end of intron 3 and the beginning of exon 4 of PMP22. The mutation c.183G > A creates a premature stop codon (TGG > TGA), and is indicated by an arrow. Electrophoregrams for the father (hemizygous G), mother (heterozygous G/A), and propositus (hemizygous A). D. Pedigree of the propositus III-1 family. The mother (II-3) carries a nonsense point mutation causing a p.Trp61Ter mutation, the father (II-4) carries a deletion on the chromosome 17p11.2. The maternal grandfather (I-2) suffered marked multiple entrapment neuropathy. The paternal aunt (II-5) suffered multiple entrapment neuropathy. The maternal aunt and uncles carry the same nonsense point mutation causing a p.Trp61Ter mutation. E. Quantitative RT-PCR of PMP22 mRNA expression in skin biopsy from our case and healthy controls (n = 5). Data are normalized to TBP and HPRT mRNA and presented as cases relative to controls (\pm standard deviation). The relative expression of PMP22 in controls is set to one. The PMP22 expression levels in our patient are reduced around 20 times when compared to controls ($p < 0.0001$, two tailed Student's t-test assuming equal variance).

psycho-intellectual development. At 28 months, he presented a marked hypotonia and a diffuse areflexia; muscle strength seemed well preserved. A brain Computerized Tomography (CT-Scan) was normal. At the age of 10 years, he could not walk without support, and at 20 years he needed a wheelchair because of severe ataxia increasing with eye closure. There was no alteration of tactile, nociception or temperature perception, but joint position sense was lost. Medical Research Council (MRC) score was 5 for proximal muscle and 4+ for distal muscle. He suffered from bilateral deafness and wore hearing aids. He has a moderate kyphoscoliosis. He is now 21 years old and is studying at a university. Nerve conduction study (NCS) at 28 months indicated a severe primary demyelinating sensorimotor polyneuropathy (Table 1).

After informed consent from each of his parents, a sural biopsy was performed at the age of 3½ years. Light microscopy included routine stainings on paraffin sections and toluidine blue on semi-thin sections; an electron-microscopic (EM) study was also performed.

2.1.2. The father (II-4)

The patient's father presented with a right radial and ulnar palsy during sleep at the age of 19, with a favorable outcome within a few weeks. Despite a normal clinical examination, NCS data were typical of hereditary neuropathy with pressure palsies (Table 1).

2.1.3. The mother (II-3)

The patient's mother presented with a proximal deficit of her right arm at the age of 23 (without any precipitating factor) and a favorable outcome within two weeks. She occasionally complained of paresthesia when crossing her legs. Her neurological examination was quite normal, although NCS data showed mild abnormalities at multiple nerve entrapment sites (Table 1).

2.1.4. Other family members

The patient's maternal uncle, aunt, and grandfather (I-2) had a clinical and electroneuromyogram (ENMG) multiple entrapment. In a paternal aunt (II-5), NCS showed a subclinical moderate

Table 1
Nerve conduction study of the propositus, his mother, and his father.

		Patient III1 (propositus)				Patient II3 (mother)				Patient II4 (father)					
		Distal latency	Distal amplitude	Conduction velocity*	F wave	Distal latency	Distal amplitude	Conduction velocity*	F wave	Distal latency	Distal amplitude	Conduction velocity*	F wave		
Motor study	UL	Med	R	–	0 mV	–	–	4.15 ms	10.9 mV	50 m/s	ND	7.05 ms	2.9 mV	49 m/s	ND
		L	29.8 ms	0.1 mV	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Uln	R	–	0 mV	–	–	3 ms	7.7 mV	56/35 m/s	ND	3 ms	9.3 mV	70/30 m/s	ND	
		L	28.4 ms	0.1 mV	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	LL	Per	R	–	0 mV	–	–	ND	ND	ND	4.5 ms	8.1 mV	42/52 m/s	ND	
			L	ND	ND	ND	ND	6.4 ms	7.4 mV	45/39 m/s*	54 ms	ND	ND	ND	
		Tib	R	–	0 mV	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
			L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Sensory study	UL	Med	R	–	0 μV	–	–	9.7 μV	55 m/s	–	–	5.8 μV	24 m/s	–	
		L	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	
	Uln	R	–	0 μV	–	–	–	8.8 μV	45 m/s	–	–	3.8 μV	37 m/s	–	
		L	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	
	Rad	R	–	0 μV	–	–	–	22.6 μV	48 m/s	–	–	11.1 μV	52 m/s	–	
		L	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	
	LL	sur	R	–	0 μV	–	–	–	ND	ND	–	–	7.9 μV	36 m/s	–
			L	–	ND	ND	–	–	6.9 μV	34 m/s	–	–	ND	ND	–
		S. Per	R	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–
			L	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–	–	ND	ND	–

* = conduction block; * = "above the elbow/below the elbow" for the upper limb and "above the knee/below the knee" for the lower limbs; L = left; LL = lower limb; Med = median nerve; ms = milliseconds; m/s = meter/second; μV = microvolts; mV = millivolt; ND = not done; Per = peroneal nerve; R = right; Rad = radial nerve; S. Per = superficial peroneal nerve; Sur = sural nerve; Tib = tibial nerve; UL = upper limb; Uln = ulnar nerve.

multiple entrapment neuropathy. The maternal grandfather (I-2) has been operated on for a left ulnar nerve compression at the elbow. Sequential electromyogram (EMG) and NCS showed a marked multiple entrapment neuropathy as in a paternal aunt (II-5).

2.2. Molecular analysis

Blood samples were obtained after informed consent from the family members. DNA was isolated by standard phenol/chloroform extraction. The 17p11.2 deletion of the father was initially detected using restriction fragment length polymorphism (RFLP) probes of the hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) region pVAW409R3a (D17S122), pEW401HE (D17S61), and pVAW412HEc (D17S125); the deletion was confirmed with short tandem repeats (STRs) markers 4A, 9A and 9B [3]. Analysis of the repeated (REP) sequences flanking the CMT1A/HNPP region was done by Southern analysis with EcoRI-digested genomic DNA probed with the REP-probe pNEA102 [4]. Paternity was checked with probe YNH24 on Mosaic serine protease long-form (Mspl) Southern blot. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis for PMP22 was used to confirm the deletion. The point mutation was first detected by single strand SSCP analysis. Coding exons of PMP22, MPZ and EGR2 were sequenced by Sanger method. Confirmation of the mutation was done by digestion with the restriction enzyme Plesiomonas shigelloides a1 (PSha1) using the manufacturer's protocol. The complementary DNA (cDNA) reference for PMP22 was RefSeq NM_000304.

Quantification real time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) was used to analyze PMP22 gene expression in propositus compared with normal patients.

Skin biopsies were performed (after informed consent) on 5 normal persons (18–28 years) without neuropathy and on the propositus (21 years), in the distal leg, using a punch biopsy. RNA isolation was performed using the Rneasy Plus universal Tissue Kit and QIAzol® lysis Reagent.

In order to obtain cDNA, reverse transcription was performed on 500 ng of RNA suspended in 3 μl of genomic DNA (gDNA)-free water, using the Quantitect reverse transcription kit.

Real time PCRs were performed using a Rotor-gene 6000 real-time PCR cyclor and the SYBR green Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) kit.

Crossing points (Cp) for each vial was determined using a threshold of 10^{-1} . This value was chosen as it was clearly above the background fluorescence level. A melting curve analysis was performed, which resulted in single product specific melting temperatures. No primer-dimers were generated during the applied 40 real-time PCR amplification cycles. Each experiment was carried out in triplicate. Comparison of total or target gene expression was done by calculating the difference in the threshold cycles (Ct). The relative expression between normal patients and our propositus was calculated by $Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = (Ct_{PMP22 mRNA} - Ct_{ref mRNA})_{propositus} - (Ct_{PMP22 mRNA} - Ct_{ref mRNA})_{normal patient}$.

3. Results

The presence of a deletion of the PMP22 region for the propositus and his father was first suspected because of the lack of inheritance of the paternal allele for the RFLP probe pVAW409R3. Analysis of the REP sequences flanking the CMT1A/HNPP region

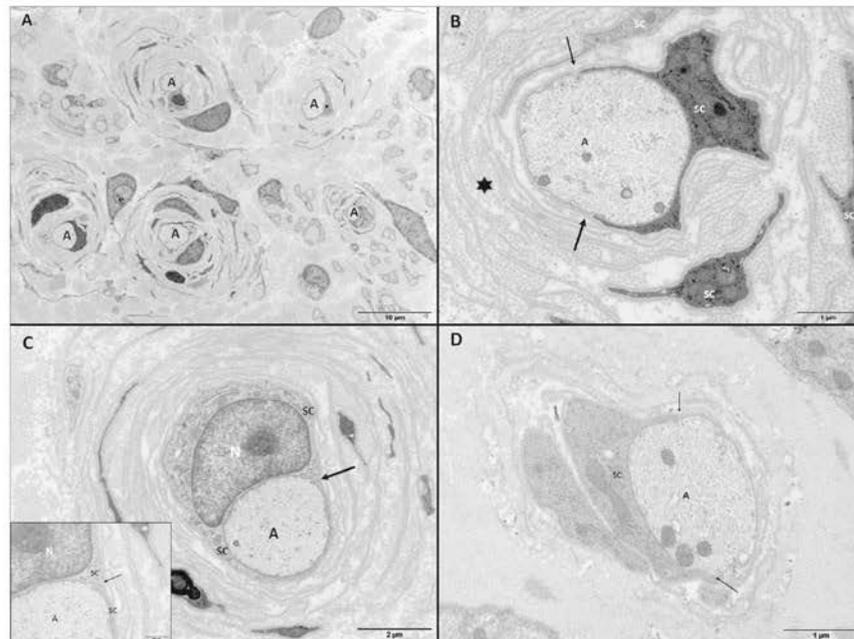


Fig. 2. Propositus electron micrograph, transverse section. At low magnification, no myelinated axon (A) is seen. Each axon which should be myelinated is surrounded by an intense concentric proliferation of basal lamina and a few elongated fragments of Schwann cell cytoplasm. B. Propositus electron micrograph, transverse section. Axon (A) without any myelin sheath surrounded by a multiconcentric proliferation of basal lamina (star); there are also a few Schwann cell cytoplasm (SCs). The Schwann cell cytoplasm (SC) processes (arrows) have not wrapped completely the axon, so that there is no mesaxon. C. Propositus electron micrograph, transverse section. Same aspect as B; nevertheless, here the Schwann cell cytoplasm processes (SC) have wrapped completely the axon and are in contact (arrow), but have not yet constituted a mesaxon. In the corner, high magnification of Fig. 1C at the level of the contact (arrow) of the processes of the Schwann Cytoplasm (SC). N: nucleus of the Schwann cell; A: Axon. D. Homozygous trembler⁺ (3 months old), electron micrograph; transverse section. This axon should be surrounded by myelin lamellae; the Schwann cell cytoplasm (SC) processes (arrows) have not wrapped the axon completely, so that there is no mesaxon.

with probe pNEA102 revealed the loss of one copy of a 6.0 kb *Escherichia coli* R1 (*EcoRI*) fragment for the propositus and his father (II-4), which is specific for hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) (Fig. 1A) [4]. Point mutation analysis in *PMP22* and *MPZ* by single strand conformation polymorphism (SSCP) demonstrated in exon 4 of *PMP22* an absence of paternal allele and a maternal mutation for the propositus (Fig. 1B). Sequencing revealed a substitution c.183G>A, leading to a premature stop codon at codon 61 (p.Trp61*). The mutation was found heterozygous for the mother and hemizygous for the propositus (Fig. 1C). PCR digestion of *PMP22* exon 4 with the enzyme *PshI* confirmed the SSCP and sequencing results. Sequencing of the coding sequences of *MPZ* and *EGR2* were normal. Later on, STR markers confirmed the absence of a paternal haplotype for the propositus, and MLPA analysis showed for the father and his son a 50% reduction in signal for all the probes covering *PMP22*. Complementary studies revealed that the maternal point mutation was transmitted by the grandfather of the propositus. One sister and one brother of the mother also carry the Trp61* mutation. The HNPP deletion was confirmed for one sister of the father.

In the sural biopsy, on semi-thin sections and by EM, there was a complete absence of myelin sheaths; each axon which should be myelinated (one large axon per Schwann cell cytoplasm) is surrounded by an intense concentric proliferation of basal lamina and a few elongated fragments of Schwann cell cytoplasm (Fig. 2A). Inside Schwann cells, Schwann cell cytoplasm extensions start surrounding one axon, but frequently the two extensions appear to stop at variable distances before contact, so that they incompletely wrapped the axons; sometimes these two narrow extensions of the Schwann cytoplasm may be in contact, but do not yet constitute a mesaxon (Fig. 2B and C). Rarely, mesaxons may begin to form but always only over a very short distance. Numerous normal unmyelinated axons (several per Schwann cell cytoplasm) were also observed.

The RT-PCR technique generated reliable data as melting curve analysis resulted in single specific melting temperatures. The designed primers were considered as being specific for the targeted transcripts. *PMP22* messenger RNA (mRNA) level in the patient's nerve, normalized on the expression of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and TATA box-binding protein (TBP), showed a dramatic decrease in

PMP22-mRNA levels in the patient: $5\% \pm 1$ of that observed in 5 normal patients of the same age range (Fig. 1D).

4. Discussion

We present long-term follow-up and the familial history of a patient compound heterozygous for a truncating mutation in *PMP22* (p.Trp61*) and for the classical HNPP deletion (Fig. 1A). No myelin sheaths were observed in any fascicle of the sensory nerve biopsy; many fibers were surrounded by numerous concentric proliferations of basal lamina (Fig. 2B and C). Therefore, this case could be considered as a congenital amyelinating neuropathy, except that we studied microscopically only a sensory nerve biopsy and not the entire peripheral nervous system, as we did in a recently published case characterized by a homozygous deletion of a distal enhancer *EGR2* [1]. Such an absence of myelin either on a nerve biopsy or at autopsy is very rare. Schematically, two clinically distinct groups of patients with CHN can be identified [5]. Some patients present in the neonatal period a severe hypotonia, weakness, and frequently develop respiratory failure, whereas a second group of patients present beyond the neonatal period with hypotonia, delayed motor development, and generally have a more favorable prognosis. No CHN case has been reported with such a long follow-up from the age of 28 months to 21 years, as our case.

It is of note that muscle strength was preserved, contrasting with a severe sensory loss responsible for the severe ataxia. The role of PMP22 might be different in motor and sensory nerve fiber development and function. Saporta et al. mention that PMP22 is highly expressed in rodent dorsal root ganglia during embryonic development and declines after birth; so the decrease of PMP22 could alter sensory nerves during early development, whereas the late-expression of PMP22 in the spinal motor neurons makes these neurons less dependent on PMP22 [6].

The clinical symptoms and NCS abnormalities of the mother (II-3) were subtle. We thus formulated the hypothesis that the propositus could be a compound heterozygous regarding a *PMP22* mutation, which was confirmed by molecular biology. Three of her symptomatic relatives shared her point mutation. We therefore have confirmation of the pathogenic role of this mutation by itself, explaining the severity of the disease in the propositus, who had inherited one pathogenic mutation from each of his parents, leading to an almost complete lack of PMP22.

PMP22 constitutes approximately 2–5% of peripheral nerve myelin proteins. RT-PCR showed that the mRNA levels were drastically reduced by 5%, in comparison to controls (Fig. 1D). PMP22 mRNAs are probably degraded by the nonsense mediated mRNA decay, which is involved in the detection and degradation of the mRNA transcript containing premature termination codons [7]. The remaining 5% are the minimal amount of mRNA which escapes this mechanism leading to a truncated protein due to the premature stop codon. Remaining truncated proteins are probably degraded by the protein degradation system [8], so we assumed our patient lacked PMP22 protein altogether.

Few patients with a gene anomaly of *PMP22* on the two alleles have been published; no nerve biopsies were taken. The first patient has a compound deletion including the typical

1.5Mb *PMP22* deletion inherited from his mother and a smaller deletion of exons 2 and 3 from his father [9]; PMP22 transcription and expression have not been studied. Another patient with a homozygous complete deletion of the entire *PMP22* gene has been reported, this patient presenting clinical similarities to our patient (he did not walk until 3 years, and required a walker to take more than a few steps because of unsteady gait; he had normal sensation in the feet; the electrophysiological study showed demyelinating signs) [6]. The authors described, as in our case, a complete absence of compact myelin and a significant proliferation of basal lamina around axons, in a skin biopsy; no indication about myelin initiation and the presence or absence of mesaxons was reported. Two other patients with a T118M mutation on one allele and a deletion of the *PMP22* gene on the other allele have been also presented [10,11]. In these two last cases, there was an expression of PMP22, but the mutated PMP22 protein was sequestered in the endoplasmic reticulum [12]. A 3½ year old girl with a *PMP22* compound deletion has been also discussed [13].

Our case also provides information on PMP22 which may be required for mesaxon formation. Schwann cell cytoplasm extensions start surrounding one axon, but the two extensions appear to stop at variable distances before contact. So, mesaxons fail to form delaying myelin initiation. An identical absence of mesaxon has been detected by Robertson et al. in the nerves of homozygous trembler and trembler-J animals (homozygous *PMP22* point mutations) [14], which we have personally confirmed (Fig. 2D) but has not been described in humans.

Acknowledgments

We thank Prof. Beno t Funalot, Dr. Anne-Sophie Lia, and H l ne Dzigan for assistance and expert advice on the RT-PCR method and analysis.

Funding statement

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

References

- [1] Funalot B, Topilko P, Arroyo MA, et al. Homozygous deletion of an *EGR2* enhancer in congenital amyelinating neuropathy. *Ann Neurol* 2012;71:719–23.
- [2] Charnas L, Trapp B, Griffin J. Congenital absence of peripheral myelin: abnormal Schwann cell development causes lethal arthrogryposis multiplex congenita. *Neurology* 1988;38:966–74.
- [3] Latour P, Boutrand L, Levy N, et al. Polymorphic short tandem repeats for diagnosis of the Charcot-Marie-Tooth 1A duplication. *Clin Chem* 2001;47:829–37.
- [4] Lorenzetti D, Pareyson D, Sghirlanzoni A, et al. A 1.5-Mb deletion in 17p11.2-p12 is frequently observed in Italian families with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Am J Hum Genet* 1995;56:91–8.
- [5] Phillips JP, Warner LE, Lupski JR, Garg BP. Congenital hypomyelinating neuropathy: two patients with long-term follow-up. *Pediatr Neurol* 1999;20:226–32.
- [6] Saporta MA, Katona I, Zhang X, et al. Neuropathy in a human without the *PMP22* gene. *Arch Neurol* 2011;68:814–21.

- [7] Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 2007;76:51–74.
- [8] Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM. PMP22 accumulation in aggregates: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis* 1999;6:450–60.
- [9] Al-Thihli K, Rudkin T, Carson N, Poulin C, Melancon S, Der Kaloustian VM. Compound heterozygous deletions of PMP22 causing severe Charcot-Marie-Tooth disease of the Dejerine-Sottas disease phenotype. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2412–16.
- [10] Jerath NU, Kamholz J, Grider T, Harper A, Swenson A, Shy ME. Coexistence of a T118M PMP22 missense mutation and chromosome 17 (17p11.2-p12) deletion. *Muscle Nerve* 2015;52:905–8.
- [11] Rou BB, Garcia CA, Suter U, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 1993;329:96–101.
- [12] Naef R, Suter U. Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis* 1999;6:1–14.
- [13] Abe A, Nakamura K, Kato M, et al. Compound heterozygous PMP22 deletion mutations causing severe Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Hum Genet* 2010;55:771–3.
- [14] Robertson AM, Huxley C, King RH, Thomas PK. Development of early postnatal peripheral nerve abnormalities in trembler-J and PMP22 transgenic mice. *J Anat* 1999;195:331–9.

Discussion concernant l'article 2

Au cours de cette étude, nous avons effectué le suivi d'un patient *PMP22* hétérozygote composite. Ce patient est unique. Nous avons démontré qu'il présentait une absence complète de *PMP22* dans ses nerfs, ce qui entraîne une absence complète de myéline, même autour des plus larges axones.

Grâce à la microscopie électronique, nous avons observé un blocage de l'initialisation de la myélinisation sur des prélèvements nerveux. Plus précisément, nous avons observé l'extension des « bras » des cellules de Schwann autour de l'axone, mais ces bras restent bloqués avant même de se rejoindre pour initialiser le premier tour de myélinisation. Cette observation est très intéressante et nous montre un rôle de *PMP22* dans l'initialisation de la myélinisation chez l'homme. Une absence de myéline chez un patient est très rare. Et aucun patient n'a été suivi sur une durée aussi longue. Ce patient a été suivi depuis ses 28 mois jusqu'à ses 21 ans. De manière très surprenante, la force musculaire est assez conservée, ce qui contraste avec la très sévère perte de sensibilité. Le rôle de *PMP22* pourrait être différent dans le développement des fibres nerveuses et sensibles. Saporta et ses collaborateurs ont montré que *PMP22* est fortement exprimée dans les racines des ganglions dorsaux durant le développement embryonnaire et décline après la naissance (M. A. Saporta *et al.*, 2011). L'absence de *PMP22* pourrait altérer le développement des nerfs sensoriels durant le développement précoce.

Aussi, nous ne savons pas quelles voies de signalisation sont concernées par le manque de la protéine *PMP22*. La mise en place de la lame basale fait partie des éléments indispensables pour l'initialisation de la myélinisation. Il serait donc intéressant, pour ce patient aussi, d'étudier les laminines de la lame basale et ses récepteurs ; et plus particulièrement l'intégrine $\alpha6\beta1$, afin de montrer un effet de l'absence de *PMP22* sur ces voies de signalisation.

Une absence complète de myéline dans le système nerveux périphérique est très rare mais a déjà été décrite (Charnas *et al.*, 1988; Funalot *et al.*, 2012; Kasman *et al.*, 1976; Palix and Coignet, 1978). Cependant, notre cas est le premier dont le pronostic vital n'est pas engagé. Le cas présenté par Funalot et ses collaborateurs décrivait un patient avec une mutation congénitale d'*EGR2*. *PMP22* étant plus en aval de la voie de signalisation impliquant *Egr2*, des mécanismes compensatoires doivent agir pour permettre un développement d'un système nerveux périphérique viable. Une étude portant sur les facteurs de myélinisation tels qu'*Oct6* et *Sox20* nous permettrait de savoir si l'absence de *PMP22* a un impact sur ces voies de myélinisation.

Article 3 : Rodent models with altered expression of PMP22 relevance to demyelinating CMT and HNPP

Maxime Jouaud, Stéphane Mathis, Laurence Richard, Anne-Sophie Lia, Laurent Magy, Jean-Michel Vallat

Avant-propos de l'article 3

Il existe de nombreux animaux modèles impliquant PMP22, permettant l'étude de la CMT1A, de l'HNPP ou du CMT1E. Cependant, sont-ils représentatifs des pathologies humaines auxquelles ils devraient se rapprocher fidèlement ?

Basés sur les expériences de notre équipe, nous avons comparé les pathologies de patients « types » avec une sélection de ces différents animaux modèles. Les analyses clinique, biochimique, électrophysiologique et pathologique de ces animaux et de ces patients nous permettent d'en apprendre plus sur l'initialisation de la myélinisation du système nerveux périphérique, et la fonction de PMP22 plus particulièrement. Par ailleurs, de telles études de comparaisons de patients avec les animaux modèles présentent un intérêt notoire pour rationaliser le développement de médicaments efficaces pour les patients atteints de ces neuropathies.

Dans un premier temps, nous avons étudié les animaux modèles avec une diminution de l'expression de PMP22. Nous disposons d'un modèle de souris avec inactivation homozygote ou bien hétérozygote du gène *PMP22*. Nous avons comparé le modèle hétérozygote avec un patient souffrant d'une HNPP avec un phénotype classique. Le modèle homozygote a, quant à lui, été comparé à un patient porteur de mutations composites sur chaque allèle de *PMP22*. Les animaux déficients en PMP22 sont très proches des patients porteurs d'HNPP. En revanche, le patient sans PMP22 présente d'importantes différences lorsqu'il est comparé à la souris sans PMP22. En effet, le patient sans PMP22 présente une absence complète de myéline autour des axones ; alors que le modèle animal présente des phénomènes de tomacula. On observe aussi des axones de large diamètre non myélinisés et bloqués au même stade que chez l'humain.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux modèles du CMT1E, c'est-à-dire des animaux porteurs de mutation spontanée sur le gène *PMP22*. Pour ce faire, nous disposons d'échantillons de la lignée trembler (porteur la mutation p.Leu16Pro disparue de nos jours) et de la lignée trembler J (porteur de la mutation p.Thr118Met). Ces deux lignées ont, elles aussi, été comparées à des patients souffrant de CMT1E. Les animaux modèles de cette neuropathie sont très proches des patients auxquels ils se rapportent. Il est important aussi de noter que les mutations ponctuelles des trembler-J et trembler ont aussi été constatées chez des patients.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux animaux modèles du CMT1A. Des rats porteurs d'un transgène de *PMP22* de souris (3 copies supplémentaires pour les hétérozygotes, 6 copies supplémentaires pour les homozygotes) que nous avons comparés à des patients souffrant de CMT1A. Chez ces animaux modèles, la pathologie est très ressemblante à celle observée chez les patients. On observe aussi une très forte variabilité de l'atteinte des individus, même au sein d'une même portée. Ces variations de l'atteinte ont aussi été constatées chez les patients, y compris issus d'une même fratrie.

En conclusion, nous avons pu effectuer, grâce à cette étude, un tour d'horizon des modèles animaux porteurs de mutations de *PMP22*. La plupart de ces modèles sont une reproduction fidèle de la pathologie qu'ils représentent chez l'homme et peuvent donc servir de manière fiable pour la recherche médicale. L'un d'entre eux cependant est particulier, la pathologie du nerf du patient sans PMP22 rappellerait plus celui observé chez les souris trembler-J homozygotes qui, elles aussi, présentent une absence totale de myéline.

RODENT MODELS WITH ALTERED EXPRESSION OF PMP22. RELEVANCE TO DEMYELINATING CMT AND HNPP

Maxime Jouaud ^a, Stéphane Mathis ^b, Laurence Richard ^c, Anne-Sophie Lia ^{ad}, Laurent Magy ^c,
Jean-Michel Vallat ^c

^a Equipe d'accueil 6309, Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphériques, University of Limoges, 2 rue du Docteur Raymond Marcland, 87000 Limoges, France

^b Department of Neurology, CHU Poitiers, University of Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers France

^c Department of Neurology, National Reference Center for Rare Peripheral Neuropathies, University Hospital Limoges, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges France

^d Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University Hospital Limoges, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges France

Abstract

Charcot-Marie-Tooth diseases (CMT) are due to abnormalities of many genes, the most frequent being linked to *PMP22* (Peripheral Myelin Protein 22). During a long time, only spontaneously occurring mouse mutants such as Trembler (Tr) mice were available; then, several rodent models have been generated in order to better know about the pathophysiological mechanisms inducing these neuropathies. Based on the personal experience of our team about, we herein present the pathological hallmarks of most of these various animal models and compare them to the pathological features observed in CMT patient nerves.

Detailed analysis of the clinical, biochemical, electrophysiological and pathological data of these animals can further help to understand the comprehension of the initiation of myelination in the peripheral nervous system, and the function of PMP22 in particular. It is also important to stress that we need more and more correlations between animal models of hereditary neuropathies and CMT patients to rationalize the development of efficient drugs in the future.

Key Words: CMT; animal; model; treatment; PMP22; Trembler.

Careful study of naturally occurring and genetically engineered neurological animal mutants can provide information on the causative role of PMP22 (Peripheral Myelin Protein 22) in human peripheral neuropathies induced by *PMP22* gene abnormalities, and provide insights into the associated disease mechanisms. In 1995, only spontaneously occurring mouse mutants such as Trembler (Tr) mice were available; since then, several Charcot-Marie-Tooth (CMT) rodent models have been generated. Detailed analysis of the clinical, biochemical, electrophysiological and pathological data of these animals can help to understand the initiation of myelination in the peripheral nervous system and the function of PMP22 in particular. In general, the phenotypes in these animals are more severe than CMT1A (or AD-CMTde-*PMP22*dup) cases (Mathis et al., 2015a). Microscopical examination of the peripheral nerves is probably the best way to identifying the pathology behind the phenotypes. In our laboratory we have studied the nerves of most of these mutants; so, we present here our personal data and a review of the literature concerning most of these models; we also discuss their usefulness in the study and treatment of hereditary sensory-motor neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) and Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP).

1. PMP22 DEFICIENT MICE

1.1 PMP22 KO

These strains are generated by using homologous recombination to inactivate *PMP22*.

1.1.1 PMP22 0/0 mice

They develop normally until the second week of life when walking difficulties appear as a consequence of progressive paralysis of the hind limbs. Occasionally a mild tremor and stress induced convulsions are observed. Light and electron microscopy of the femoral nerve reveal myelin and axon abnormalities; otherwise and surprisingly, many nerve fibers of 24-day-old PMP22 0/0 mice are characterized by prominent myelin thickenings (Adlkofer et al., 1997; Sancho et al., 1999). These structures which are predominantly localized at paranodes, consist of redundant myelin loops with normal spacing (tomacula) and the corresponding axons often appeared compressed (**Fig. 1**); myelin of some tomacula may also be disorganized. Large caliber axons devoid of myelin sheaths are also observed and their ensheathing Schwann cells are occasionally associated with degenerating myelin. These tomacula induce nerve conduction blocks. In 10-week-old animals, there are few tomacula, while signs of degeneration are observed. Around thinly myelinated axons, there are numerous concentric proliferations (like 'onion-bulbs') of basal lamina, and of some Schwann cell (SC), suggesting that the observed myelin tomacula may be transient phenomena that degenerate during maturation. PMP22-deficient SC form shorter internodes so that nerve conduction velocities are reduced (Sancho et al., 1999).

Absence of PMP22 also results in abnormal myelin formation. At 4 days, the large caliber axons of the pectineus nerve are separated from the bundles of non-myelinated axons, and are associated with prospective myelinating SC in a 1/1 ratio. There is a marked delay in myelination that appears to be more significant in motor nerve (roots) than in sensory nerve (Sancho et al., 1999). In a significant number of SC which contain one small axon (but larger than the usual unmyelinated axons), no mesaxons are detected by careful electron microscopy (EM) examination. The normal cytoplasmic processes which should make up the mesaxon are either only touching each other or are still quite separated (**Fig. 1**). Otherwise, many of the

myelin sheaths are normally compacted and actually, one can see in these Schwannian cytoplasm all stages of mesaxon formation (from initiation to normally compacted myelin). Sancho *et al.* showed that the frequency of demyelination and remyelination was more distal than proximal. We have observed uncompact myelin around a few axons as it may be observed in nerves from human HNPP cases. Myelin Protein Zero (MPZ, or P0) is the main protein involved in myelin compaction by promoting adhesion between adjacent extracellular myelin wraps (Xu *et al.*, 2000); it represents over 50% of total PNS myelin proteins (Everly *et al.*, 1973); it has been demonstrated that PMP22 and P0 can interact through trans-homophilic and trans-heterophilic interactions. Mice in which P0 protein has been eliminated by homologous recombination, develop a severe dysmyelinating neuropathy with predominantly uncompact myelin (Adlkofer *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000).

Otherwise, it has also been demonstrated that PMP22 deficiency disrupts the assembly of multiple types of myelin junction protein complexes. These junction abnormalities increase myelin permeability, which impairs propagation of action potentials (Guo *et al.*, 2014) and may explain, in HNPP, the susceptibility of nerves to injury; so, it might thus be possible to identify additional genetic factors contributing to nerve vulnerability (Li, 2014).

1.1.2 PMP22 0/+ mice

They are less impaired than homozygous mice, and it is not easy to differentiate them from wild-type mice, but a few individuals may show signs similar to their PMP22 0/0 littermates. Pathologically, demyelination is less severe, there are less tomacula, and the density of myelinated fibers being close to normal. However, according to our observations by EM, a few large and small diameter axons with a complete absence of myelin can be detected. A few myelin sheaths may be partially uncompact (**Fig. 2**). In these few SC

cytoplasms, there is no mesaxon, as observed in homozygous mice; these ultrastructural data are in contradiction with the observations of Li *et al.* who reported that heterozygous deletion of *PMP22* did not affect the initiation of myelination, since compact myelin is well formed in nerve and because axons devoid of any myelin were not detected (Li et al., 2013).

1.1.3 PMP22 deficient Lac Z mice

The two first coding exons of *PMP22* (exon 2 and 3) have been replaced by a Lac Z reporter. As for the previous model, these homozygous PMP22-deficient mice manifest visible signs of motor deficits, including clasped hind limbs, tremor, and hindered gait noticeable by two weeks of age. At P10, *-/-* mice show tomacula, a delay in the myelination of large-caliber fibers, and excess concentric proliferation like ‘onion-bulbs’ of loose basal lamina. In some instances, bare axons within pockets of basal lamina are observed suggesting that the SC have retracted their cytoplasmic processes. In this model, Amici *et al.* have shown that PMP22 is in a complex with alpha6-beta4 integrin and laminin and that beta4-integrin levels are reduced in sciatic nerves of *PMP22*^{-/-} mice; these authors conclude that PMP22 is a binding partner in the integrin/laminin complex and is involved in mediating the interaction of SCs with the extracellular environment (Amici et al., 2006).

1.1.4 Human correlations

1.1.4.1 Corresponding to *PMP22* 0/0 mice:

There are scant reports of patients with mutations (deletion or point mutations) on the two *PMP22* alleles. Some of us presented a patient with two compound mutations in the *PMP22* gene: the point mutation causing a premature STOP codon in *PMP22* exon 3 is inherited from the mother in the first allele and the “typical” deletion on the *PMP22* gene in

the region 17q11.2 is inherited from the father on the other allele. (Jouaud et al., 2016) By PMP22 mRNA quantitation, we showed a complete lack of PMP22 protein. Pathological study (**Fig. 3**) revealed an absence of myelin sheaths, and no normal mesaxon was constituted, as it has also been described by Al-Thihli; this patient had a compound deletion including the typical 1.5MB *PMP22* deletion inherited from his mother and a smaller deletion of exon 2 and 3 from his father. Another patient with a homozygous complete deletion of the entire *PMP22* gene has been reported by Saporta *et al.*, and two others with a T118M mutation on one allele and a deletion of the *PMP22* gene (Jerath et al., 2015; Roa et al., 1993). In these latter cases, the mutated PMP22 protein is sequestered in the endoplasmic reticulum (Naef and Suter, 1999). A 3 ½ year old girl with a *PMP22* compound deletion has also been reported (Abe et al., 2004). A severe reduction or a complete lack of PMP22 protein due to these two mutations have been demonstrated in most of these cases (Abe et al., 2004; Al-Thihli et al., 2008; Saporta et al., 2011). In the sensory nerves which have been examined, there is no myelin and so no tomacula, which is quite different from *PMP22* mice^{-/-}. So, as mentioned for the *PMP22* deficient mice, mesaxon formation and the initialization of myelination are retarded.

Adlkofer *et al.* have shown that heterozygous *PMP22* KO mice, which carry only one functional *PMP22* allele and thus genetically mimic HNPP, display similar pathological and electrophysiological features (Adlkofer et al., 1997). It is not possible to demonstrate an entrapment neuropathy syndrome in mice: Fledrich *et al.* mentioned that these mice lack an obvious clinical phenotype comparable to that of mildly affected patients (Fledrich et al., 2012).

In most HNPP cases, a 1.5 Mb DNA heterozygous deletion is found (Inoue et al., 2001). This deleted region includes the *PMP22* gene, leading to haplo-insufficiency at this locus and under-expression of the PMP22 protein. So, a deletion of *PMP22* in HNPP patients and a

reduction in *PMP22* gene expression in the mouse models induce hypermyelination leading to the formation of segmental myelin sausage-like thickenings (tomacula) as in tomaculous neuropathy (Bradley et al., 1975) (**Fig. 4A and 4B**). In these mice, and in HNPP, tomacula commonly lead to a severe constriction of axons (Amici et al., 2006; Bai et al., 2010). Considering these observations, the PMP22 protein may have a role in the regulation of myelin thickness, but we have yet to identify a pathway involving PMP22 in this process.

1.2 THE TREMBLER MODELS

The autosomal dominant Trembler (Tr) mutation maps to mouse chromosome 11 and manifests as a SC defect characterized by severe hypomyelination and continuing SC proliferation throughout life; this spontaneous, dominantly inherited mutation in the *PMP22* gene results in a point mutation that substitutes an aspartic acid residue for a glycine at amino acid position 150 (Gly150ASP), in the 4th transmembrane region of the PMP22 protein. Tr-J are named after the Jackson laboratory that produces them and was reported in 1983 by Henry *et al.* (Henry et al., 1983); Tr-J has a point mutation which replaces a leucine with a proline residue at amino acid position 16 (Suter et al., 1992).

1.2.1 The trembler mouse model (Tr or *PMP22*Tr):

1.2.1.1 Homozygous

Animals present very severe clinical signs; they move with difficulty and develop tremor and transient seizures at a young age. Most animals remain viable into adulthood.

Nerve pathological alterations are quite significant and indicate a hypomyelinating process. Although a few small-caliber myelinated axons display typical myelin sheaths of a

nearly normal thickness, most axons of a caliber that would normally be fully myelinated have no myelin sheath or are surrounded by an abnormally thin one. There are proliferations of loose basal lamina around the SC, reminiscent of the ‘onion-bulb’ pattern that develops on repeated demyelination and remyelination (Low and McLeod, 1975; Robertson et al., 1999) (**Fig. 5A and 5B**).

1.2.1.2 Heterozygous

Heterozygous mice show features of severe hypomyelination, but less pronounced than in *Tr*^{-/-}. Although all large caliber axons are associated with Schwann cells, only 10% are thinly myelinated in *Tr*^{+/-} animals (**Fig. 6A**). The hypomyelinating process is less marked than in homozygous *Tr* mice, but we also observed a delay in the initiation of myelination, as in *PMP22* KO mice. Schwann cell cytoplasm extensions start surrounding one axon, but frequently the two extensions appear to stop at variable distances before contact, so that they incompletely wrap the axons (**Fig. 6B**); sometimes these two narrow extensions of the Schwann cytoplasm may be in contact, but do not yet constitute a mesaxon.

Myelinated fibers display subtle defects in paranodal and nodal regions which may involve terminal loops and terminal bands; these anomalies could contribute significantly to conduction defects and increased risk of myelin detachment. Robertson *et al.* described also terminal loops of the myelin sheaths turning outwards into the extracellular space instead of inwards to terminate on the axon (Robertson et al., 1999). These lesions, together with defective differentiation of axolemmal ion channel domains and diminution in nodal Na⁺ channel density, could contribute significantly to conduction defects in *Tr* nerves (Rosenbluth and Bobrowski-Khoury, 2014).

1.2.2 The trembler-J mouse model

Mice heterozygous for the Tr-J spontaneous mutation are similar to heterozygotes carrying the original trembler mutation (*Pmp22*Tr). They display a normal life span and develop only a mild late onset demyelinating neuropathy (**Fig. 7A**); the clinical symptoms and signs, and neuropathology of heterozygotes are less severe than homozygotes. The tremor cannot be reliably recognized before 20 to 25 days. There are no obvious seizures and only a mild gait abnormality. In the PNS, the myelin deficiency is less severe than that of Tr mice so that the decrease in myelinated fibers is difficult to evaluate; there are many fibers with irregular contours of Schwann cell cytoplasm and some lesions of uncompact myelin lamellae (**Fig. 7B**). The proportion of myelinated fibers increases with age (Robertson et al., 1999).

Homozygous Tr-J mice are recognizable by 8 days of age, after which they become progressively unable to walk, as they suffer from a severe peripheral neuropathy with a strong tremor, paralysis of the rear trunk and a lack of muscle tone. Most die before reaching 18 days. It should be noted that although peripheral nerves of Tr/Tr are more severely demyelinated than those of Tr-J/Tr-J (**Fig. 8A**), the Tr mice live a normal lifespan while Tr-J mice die prior to weaning, which suggests that peripheral myelin is not essential for survival. In Tr-J /Tr-J, PNS is nearly devoid of myelin with myelinogenesis blocked at the promyelin stage (less than 2% of the singly ensheathed axons being myelinated); there is almost no constituted mesaxon and the initialization of myelination is retarded (**Fig. 8B**).

The mechanisms of demyelination in CMTE and in the various Tr mice might be explained by a failure of the mutant proteins PMP22 to be incorporated into the plasma membrane, because they are retained in the endoplasmic reticulum of myelinating SC and form various protein aggregates (Colby et al., 2000).

1.2.3 Others trembler models

1.2.3.1 *Trembler-Ncnp*

This mutant is induced by a spontaneous autosomal dominant PMP22 exon IV deletion coding for the second (TM2) and a part of the third (TM3) transmembrane domain of the PMP22 protein. They are distinguishable from normal littermates by 15-20 days of age. Their gait abnormality increases slightly with age. However, their life span is normal (Suh et al., 1997). No pathological alteration has been found in the CNS.

No myelin is found in the sciatic nerves in the homozygotes at postnatal day 9, at one month and at five months of age. Development appears to stay at the promyelinating stage, with axons ensheathed, but not myelinated by the SC cytoplasm in which there are many swollen vacuoles often continuous with the limiting membranes of the rough endoplasmic reticulum.

In the heterozygotes, demyelination is variable along individual fibers; myelin compaction is normal. Collagen is increased and segmental basal lamella irregularly surrounds SC.

1.2.3.2 *Trembler-m1H and tr-M2H*

Trembler M1H (Tr-m1H) have a *PMP22* point mutation (H12R); a HisGln mutation has been identified at this site in a Dejerine-Sottas syndrome (DSS) case (Valentijn et al., 1995). Trembler M2H (Tr-m2H) have a terminal point mutation (Y153TER) that truncates the PMP22 protein by seven amino acids. Both mice exhibit a marked resting tremor and are smaller than littermates at weaning, remaining so in adulthood. They are inactive, showing

low locomotor activity, abnormal gait and motor coordination. Tr-m1H are more severely affected (Isaacs et al., 2000).

Pathologically, there is no anomaly of the CNS; on nerve examination both lines show hypomyelination: the scant myelin sheaths are thin and surround axons of small diameter. There is an axonal loss and an increase in the amount of endoneurial connective tissue. The nerve lesions of Tr-m1H are the more severe, mirroring the severity of the clinical phenotype.

Both mutations are different from the three previously identified spontaneous *PMP22* mutants and are the only *PMP22* mutants on a common genetic background.

1.2.4 Human correlations

In humans, *PMP22* point mutations account for only 2.5% of all CMT cases and mostly underlie the severe forms of genetic demyelinating neuropathies which sometimes may be included in the following syndromes such as “Congenital Hypomyelinating Neuropathy” (CHN) and the so-called Dejerine-Sottas syndrome (DSS). Some of us have recently suggested that these entities (‘DSS’ and ‘CHN’) should be abandoned for greater simplicity (Mathis et al., 2015). Otherwise, neuropathies caused by *PMP22* point mutations belong to the sub-type CMT1E (dominant CMT demyelinating *PMP22* mutation) which corresponds to these various types of Tr. For instance, we observed a 5-year-old boy who presented delayed motor development, generalized hypotonia, areflexia, and bilateral steppage. The nerve conduction studies showed evidence of a demyelinating neuropathy (motor NCV was 14 m/s on the right median nerve). Genotyping revealed a c.215C>T (Ser72Leu) heterozygous mutation. Sural nerve biopsy showed the same lesions as in the Tremblers (**Fig. 9A and 9B**).

Madrid *et al.* reported the case of a young patient with a long early-onset history of CMT1E due to a p.Leu18Arg missense mutation in the first transmembrane domain of the *PMP22* gene as for the Tr-J mouse; in both the patient and the Tr-J, there were typical signs of a significant demyelination and myelin uncompactation (Madrid *et al.*, 2013).

2 ANIMAL MODELS CHARACTERIZED BY AN OVEREXPRESSION OF PMP22

2.1 Rats

These rats represent a model of CMT1A. *PMP22* duplication causes this CMT sub-type which accounts for more than half of all CMT cases and about 70% of CMT1 cases.

PMP22 with copy numbers ranging from 3 to 16 have been randomly inserted into rodent genome (pronuclear injection of a cosmid-derived 43-kb DNA fragment, harbouring the entire murine *PMP22* gene) (Sereda *et al.*, 1996).

Heterozygous rats carry a genomic construct encoding three copies of the mouse wild type *PMP22* protein on one allele, in addition to the two normal copies of *PMP22*, resulting in about a 1.6-fold mRNA overexpression in peripheral nerves when quantified by quantitative polymerase chain reaction. They display an unsteadiness of gait. A general hypomyelination of the PNS is obvious. Many axons have thin or absent myelin sheaths, but the degree of hypomyelination differs between individuals (**Fig. 10A and 10B**). In 6-month-old rats, we noted a moderate axonal loss and an increase in connective tissue. Hypomyelination is more marked in larger diameter fibers. At the ultrastructural level, myelin lamellae are normally compacted. The ventral roots are markedly more affected than the dorsal ones (Sereda *et al.*, 1996). Clinical phenotype, demyelinated lesions and axonal loss are more severe in old rats (Fledrich *et al.*, 2012).

Homozygous rats carry three copies of the mouse wild type PMP22 protein on the two alleles; they display a severe and uniform phenotype which can be diagnosed from the third postnatal week: overall development appears to be retarded so that the animals never show normal motor development, display hindlimb paralysis, and uncoordinated movements; many animals die prematurely. This strong phenotype is linked to a complete lack of myelin on semi-thin sections; endoneurial collagen and SC nuclear numbers are increased (Sereda et al., 1996). In fact, according to our observation by EM, a few axons have a very thin myelin sheath so that it is not an amyelinating process but rather a dysmyelinating one (**Fig. 11A and 11B**). SC are present and have segregated axons at the normal 1:1 ratio. In many SC, cytoplasm extensions start surrounding one axon, but frequently the two extensions appear to stop at variable distances before contact, so that they incompletely wrap the axons; sometimes these two narrow extensions of the Schwann cell cytoplasm may be in contact, but do not yet constitute a mesaxon or sometimes: there is only an initial mesaxon formation. These anomalies remain unchanged even at several months of age, indicating a stable block of myelination. Typical 'onion bulbs' showing concentric layers of SC processes and redundant basal laminae around SC are clearly seen by EM; endoneurial collagen is markedly increased.

Using an immunocytochemical quantitative analysis of PMP22, we showed on nerve biopsies of CMT-1A and HNPP elevated and reduced expression (respectively) of PMP22 compared with controls (Vallat et al., 1996). Using the same technique, we studied PMP22 expression in normal and transgenic heterozygous and homozygous CMT1A rats. In normal rats, PMP22 is expressed in myelin with a ratio of 1 gold particle/ μm^2 . PMP22 is relatively well expressed in the SC cytoplasm. In these heterozygous rats, PMP22 protein concentration is abnormally increased. There is approximately 1.7 gold particles/ μm^2 of myelin, and PMP22 is also expressed in the SC cytoplasm. In homozygous rats, myelinated fibers are extremely rare (with a reduced g ratio), but in the myelin of these rats, PMP22 is

strongly overexpressed with a ratio of approximately 10.6 gold particles/ μm^2 of myelin. PMP22 is also strongly expressed in myelinating SC cytoplasm and in SC cytoplasm which failed to myelinate axons (**Fig. 12A, 12B, 12C and 12D**).

2.2 Mice

This CMT1A murine model is very close to a transgenic mouse model called C22 (TgN (PMP22) C22C1h) with 7 copies of the *PMP22* gene (Huxley et al., 1998; Magyar et al., 1996; Robertson et al., 1999). These mice show a dominant phenotype of weakness and progressive paralysis of the hind legs. There is a widespread demyelination of large axons which are surrounded by an overly thin myelin sheath, whereas small myelinated fibers appear well preserved. SC processes forming onion bulbs are present around some demyelinated axons.

Other generations of transgenic mice (carrying one, two, four, or eight copies of the *PMP22* gene on a YAC) have been described (Huxley et al., 1998). In mice with one or two copies of the transgene, there are no detectable phenotypic abnormalities with only minor pathological lesions. Mice with four *PMP22* copies, called C61 TgN (PMP22) C61C1h, do not move as smoothly as the wild type or as mice with one or two copies of PMP22. These mice have been crossed in order to obtain homozygous mice with 8 copies of *PMP22*. These TgN (PMP22) C61C1h mice could not be distinguished morphologically from controls either at P4 or P12, although by 6 weeks a small subgroup of the larger myelinated fibres are hypomyelinated (Huxley et al., 1998). Mice with 8 copies present essentially the same clinical deficits as the C22 mouse line (Robertson et al., 2002). In these animals, the level of human transgene expression is roughly proportional to the copy number of the YAC transgene.

Based on the known promyelinating effect (*in vitro*) of ascorbic acid in SC and dorsal root ganglia co-cultures, a study of the therapeutic effect of ascorbic acid was conducted in C22 mice: it confirmed a positive effect (*in vivo*) on peripheral nerves (Huxley et al., 1998; Passage et al., 2004). However, several studies have failed to show a benefit of ascorbic acid in CMT1A patients (cf next chapter). Overexpression of PMP22 may affect SC in different ways (Li et al., 2013). It causes apoptosis, but this mechanism is supposed to act only in aged SC, while dysmyelination is present very early. Otherwise, it is recognized that PMP22 overexpression induces a blockade of the protein degradation system, leading to formation of protein aggregates (Fortun et al., 2007; Niemann et al., 2000). The accumulation of misfolded PMP22 activates and upregulates endoplasmic and/or auto-lysosomal systems so that the proteasome is not efficient in mutant SC which de-differentiate; thus there is an activation of proteostatic mechanisms. Moreover, cytosolic chaperones are consistently elevated in nerves from transgenic C22 mice, with the most prominent change in HSP70 (Chittoor et al., 2013). The positive effects of chaperone in preventing aggregation and improving the trafficking of PMP22 is well described. Chittoor-Vinod *et al.* (using fibroblasts from CMT1A patients) showed that increase of HSP70 expression attenuates proteasome dysfunction (Chittoor-Vinod et al., 2015). It should be noted that these mice have seven copies of the *PMP22* gene, while CMT1A patients have only three copies. In common with other pathologists, we have not observed on several nerve biopsies from CMT1A patients, cytoplasmic protein aggregates, which have been described in patients with Trembler or Trembler-J mutations (CMT1E: dominant CMT demyelinated *PMP22* mutations) (Hanemann et al., 2000).

2.3 Human correlations

2.3.1 Low copy number PMP22 heterozygous animal models correspond to CMT1A which is the most frequent CMT subtype.

The genetic defect of CMT1A (clinically characterized by bilateral peroneal atrophy, skeletal deformities (including pes cavus), decrease or absence of tendon reflexes, and electrophysiologically by a homogeneous demyelination with diffuse reduced nerve conduction velocities) is an intrachromosomal duplication on chromosome 17p11.2. The *PMP22* gene is located within the duplicated region and its increased gene expression induces the disease. Pathologically, there is an axonal loss and thin myelin sheaths confirming the demyelinating process, often surrounded by proliferations of concentric SC elongated fragments like 'onion bulbs' (**Fig. 13A and 13B**) (Vallat, 2003). In the heterozygous rat model, at 6 months, we observed similar but much less severe lesions. A patient homozygous for the duplication has been reported and is clinically more severe than normal with onset before year one; nerve microscopy has not been described (Lupski et al., 1991).

Fledrich *et al.* have noticed that, although these overexpressing PMP22 rats are derived from one founder, they show a striking variability in phenotypes after being kept on an outbred background for numerous generations (Fledrich et al., 2012). These authors pointed also that CMT1A patients in a same family also presented significant variability even among monozygotic twins (Garcia et al., 1995). The severe clinical and pathological phenotypes of homozygous animals correspond to CHN human cases. In very young children presenting a CHN phenotype, a few heterozygous *PMP22* duplications have been described (Baets et al., 2011). Even fewer homozygous *PMP22* duplications have been reported in humans excepting the severe phenotypes seen with CHN, suggesting that gene expression is not the only determinant of disease severity (LeGuern et al., 1997; Pareyson et al., 2003; Sturtz et al., 1997).

2.3.2 New therapies have been tested on these animal models

It is now well accepted that lowering the toxic overexpression of the *PMP22* gene in CMT1A can be an efficient strategy (Mathis et al., 2015b). Progesterone antagonists which decrease PMP22 overexpression and ameliorate the clinical phenotype of CMT rats might be of value, but at the present time, the drug which is available for humans affects liver function (Fledrich et al., 2012). Otherwise, the combination of three well known and approved drugs (baclofen, naltrexone and sorbitol) has improved myelination in rat models of CMT1A. It down-regulates the expression of PMP22 in cultured Schwannoma cells. The tests performed in a nerve crush mouse model demonstrate the acute neuro-regenerative and pro-myelinating potential of this drug combination (Chumakov et al., 2014). A phase 2 trial has now been conducted and has recently provided first indications of therapeutic activity in mild to moderately affected adult CMT1A patients. A phase III trial is ongoing.

Ascorbic acid (vitamin C) has been shown to be required for correct myelination of peripheral nerves in vitro and in vivo (Gess et al., 2015). Also, ascorbic acid improved muscle function and reduced demyelination in a mouse model of CMT1A (Passage et al., 2004); but, a recent Cochrane review has discussed six randomized trials which compared the effect of oral ascorbic acid (1 to 4 grams) and placebo treatment in CMT1A (Gess et al., 2015). It has been concluded that ascorbic acid does not improve the course of CMT1A either in adults or children.

Therapeutic application of Neurotrophin-3 in immune incompetent mice with xenograft transplants of sural nerve biopsies from with CMT1A (as well as from Trembler-J mice) augmented axonal regeneration. A clinical pilot study was performed in CMT1A patients. An

increase in myelinated fiber density, a reduction in the neurological impairment score, as well as improved sensory modalities, have been observed (Sahenk et al., 2005).

3 CONCLUSION

The recognition of rodent strains that bear alterations of the *PMP22* gene and the development of transgenic models has enabled clinical and pathological studies of the symptoms, signs, and lesions induced by an absence or overexpression of the PMP22 protein in the peripheral nervous system. Data from these animal models can be compared with observation on patients with hereditary neuropathies of the CMT type: including the most common CMT1A subtype (linked with an increase in PMP22 protein), the much rarer CMT1E subtype (induced by a mutation of *PMP22*), and HNPP (giving rise to a reduction in PMP22). Study of these models can help comprehend the complex roles played by PMP22 in nerve development. These spontaneous and transgenic rodents reveal that PMP22 is involved in the initial spiraling of myelin in early nerve development, determination of myelin thickness, and maintenance of myelin.

Furthermore, in some models, it is possible to test therapeutic strategies for CMT and devise guidelines for human clinical trials. It should nevertheless be borne in mind that these animal models present some differences with the subtypes of CMT, which may in part explain the lack of success of the initial clinical trials in man (CMT1A).

4 Acknowledgments

We are grateful to the members of the Nave lab for supplying CMT1A rats used in this study.

Fig. 1. Electron micrograph, transverse section of homozygous PMP22 KO mouse sciatic nerve. (A) More tomaculous lesions than in heterozygous mice. (C = capillary). (B) Non-myelinated axons (Ax); cytoplasmic prolongations (arrows) are widely separated and do not make up a mesaxon.

Fig. 2. Electron micrograph, transverse section of heterozygous PMP22 KO mouse sciatic nerve. (A) Numerous signs of dysmyelination: myelin sheaths overly thin with respect to axon diameter. (B) Some myelinated fibers with non-compacted myelin (star). (C) Only a few axons are not myelinated; the two Schwann cell prolongations do not overlap to form a mesaxon and initiate myelination. (D) A few myelinated fibers with tomaculous lesions (arrow); note compression and reduction of axon diameter (A = axon).

Fig. 3. Electron micrograph, transverse section of a patient CMT1A with a mutation deletion on one allele of PMP22 and a non-sense mutation on the other one. (A) Complete absence of myelination around axons. (B) The cytoplasmic prolongation (arrows) are too far apart to form a mesaxon (stars = concentric proliferation of fragments of basement membrane; Ax = axon).

Fig. 4. (A) Nerve teasing of an HNPP patient showing a tomaculous aspect. (B) Electron micrograph, transverse section of an HNPP patient nerve (Ax = axon).

Fig. 5. Electron micrograph, transverse section of 3-month-old homozygous trembler mice sciatic nerve. (A) Complete absence of myelination around axons. (B) The cytoplasmic prolongations (arrow) are too far apart to form a mesaxon; the basement membranes mingle with the Schwann cell cytoplasm.

Fig. 6. Electron micrograph, transverse section of 3-month-old heterozygous trembler mice sciatic nerve. (A) All myelin sheaths are overly thin and many axons are not myelinated. (B) Non-myelinated axon: note the cytoplasmic prolongations (arrows) which are too far apart to form a mesaxon (star = concentric proliferations of basement membrane fragments; Ax = axon).

Fig. 7. Electron micrograph, transverse section of 6-month-old heterozygous trembler-J mouse sciatic nerve. (A) Numerous overly thin myelin sheaths. (B) Non-compacted myelin (stars) (Ax = axon).

Fig. 8. Electron micrograph, transverse section of 22-day-old homozygous trembler-J mice sciatic nerve. (A) Complete absence of myelination around the axons. (B) The cytoplasmic prolongations (arrows) are too far apart to form a mesaxon; the basement membranes mingle with Schwann cell cytoplasm.

Fig. 9. Electron micrograph, transverse section of a CMT1E patient nerve. (A) Numerous axons with complete absence of myelination; others have overly thin myelin sheaths. (B) The cytoplasmic prolongations of Schwann cells join but do not overlap to initiate myelination.

Fig. 10. Electron micrograph, transverse section of a 6 month old heterozygous CMT1A rat nerve. (A) Overly thin myelin sheaths. (B) The small axons are normally myelinated, but the large axons have overly thin myelin sheaths.

Fig. 11. Electron micrograph, transverse section of a 6-month-old homozygous CMT1A rat nerve. (A) Almost complete lack of myelin. (B) Very thin myelin around a large diameter axon (Ax = axon).

Fig. 12. PMP22 expression in normal (A), heterozygous CMT1A rat nerve (B), and homozygous CMT1A rat nerve (C). PMP22-immunolabeling on normal (A), heterozygous (B), and homozygous (C) CMT1A rat nerve embedded in London Resin White; PMP22-immunostaining (12-nm gold particles) is observed on myelin sheaths. (D) The concentration of PMP22 protein in myelin is 1.7 times higher in the CMT1A heterozygotes than in the normal animals and 10 fold that of the CMT1A homozygotes.

Fig.13. Electron micrograph, transverse section of a CMT1A patient nerve. (A) Overly thin myelin sheaths, the basement membranes mingle with the Schwann cell cytoplasm. (B) Some axons with myelin resembling that seen in tomaculous neuropathy (arrow).

References

- Abe, K.T., Lino, A.M., Hirata, M.T., Pavanello, R.C., Brotto, M.W., Marchiori, P.E., Zatz, M., 2004. A novel stop codon mutation in the *PMP22* gene associated with a variable phenotype. *Neuromuscul Disord* 14, 313-320.
- Adlkofer, K., Frei, R., Neuberg, D.H., Zielasek, J., Toyka, K.V., Suter, U., 1997. Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* 17, 4662-4671.
- Al-Thihli, K., Rudkin, T., Carson, N., Poulin, C., Melancon, S., Der Kaloustian, V.M., 2008. Compound heterozygous deletions of *PMP22* causing severe Charcot-Marie-Tooth disease of the Dejerine-Sottas disease phenotype. *Am J Med Genet A* 146A, 2412-2416.
- Amici, S.A., Dunn, W.A., Jr., Murphy, A.J., Adams, N.C., Gale, N.W., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Notterpek, L., 2006. Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J Neurosci* 26, 1179-1189.
- Baets, J., Deconinck, T., De Vriendt, E., Zimon, M., Yperzeele, L., Van Hoorenbeeck, K., Peeters, K., Spiegel, R., Parman, Y., Ceulemans, B., Van Bogaert, P., Pou-Serradell, A., Bernert, G., Dinopoulos, A., Auer-Grumbach, M., Sallinen, S.L., Fabrizi, G.M., Pauly, F., Van den Bergh, P., Bilir, B., Battaloglu, E., Madrid, R.E., Kabzinska, D., Kochanski, A., Topaloglu, H., Miller, G., Jordanova, A., Timmerman, V., De Jonghe, P., 2011. Genetic spectrum of hereditary neuropathies with onset in the first year of life. *Brain* 134, 2664-2676.
- Bai, Y., Zhang, X., Katona, I., Saporta, M.A., Shy, M.E., O'Malley, H.A., Isom, L.L., Suter, U., Li, J., 2010. Conduction block in *PMP22* deficiency. *J Neurosci* 30, 600-608.
- Bradley, W.G., Madrid, R., Thrush, D.C., Campbell, M.J., 1975. Recurrent brachial plexus neuropathy. *Brain* 98, 381-398.

Chittoor-Vinod, V.G., Lee, S., Judge, S.M., Notterpek, L., 2015. Inducible HSP70 is critical in preventing the aggregation and enhancing the processing of PMP22. *ASN Neuro* 7.

Chittoor, V.G., Sooyeon, L., Rangaraju, S., Nicks, J.R., Schmidt, J.T., Madorsky, I., Narvaez, D.C., Notterpek, L., 2013. Biochemical characterization of protein quality control mechanisms during disease progression in the C22 mouse model of CMT1A. *ASN Neuro* 5, e00128.

Chumakov, I., Milet, A., Cholet, N., Primas, G., Boucard, A., Pereira, Y., Graudens, E., Mandel, J., Laffaire, J., Fouquier, J., Glibert, F., Bertrand, V., Nave, K.A., Sereda, M.W., Vial, E., Guedj, M., Hajj, R., Nabirotkin, S., Cohen, D., 2014. Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 over-expression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy. *Orphanet J Rare Dis* 9, 201.

Colby, J., Nicholson, R., Dickson, K.M., Orfali, W., Naef, R., Suter, U., Snipes, G.J., 2000. PMP22 carrying the trembler or trembler-J mutation is intracellularly retained in myelinating Schwann cells. *Neurobiol Dis* 7, 561-573.

Everly, J.L., Brady, R.O., Quarles, R.H., 1973. Evidence that the major protein in rat sciatic nerve myelin is a glycoprotein. *J Neurochem* 21, 329-334.

Fledrich, R., Schlotter-Weigel, B., Schnizer, T.J., Wichert, S.P., Stassart, R.M., Meyer zu Horste, G., Klink, A., Weiss, B.G., Haag, U., Walter, M.C., Rautenstrauss, B., Paulus, W., Rossner, M.J., Sereda, M.W., 2012. A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain* 135, 72-87.

Fortun, J., Verrier, J.D., Go, J.C., Madorsky, I., Dunn, W.A., Notterpek, L., 2007. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis* 25, 252-265.

Garcia, C.A., Malamut, R.E., England, J.D., Parry, G.S., Liu, P., Lupski, J.R., 1995. Clinical variability in two pairs of identical twins with the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Neurology* 45, 2090-2093.

Gess, B., Baets, J., De Jonghe, P., Reilly, M.M., Pareyson, D., Young, P., 2015. Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochrane Database Syst Rev* 12, CD011952.

Guo, J., Wang, L., Zhang, Y., Wu, J., Arpag, S., Hu, B., Imhof, B.A., Tian, X., Carter, B.D., Suter, U., Li, J., 2014. Abnormal junctions and permeability of myelin in PMP22-deficient nerves. *Ann Neurol* 75, 255-265.

Hanemann, C.O., D'Urso, D., Gabreels-Festen, A.A., Muller, H.W., 2000. Mutation-dependent alteration in cellular distribution of peripheral myelin protein 22 in nerve biopsies from Charcot-Marie-Tooth type 1A. *Brain* 123 (Pt 5), 1001-1006.

Henry, E.W., Cowen, J.S., Sidman, R.L., 1983. Comparison of Trembler and Trembler-J mouse phenotypes: varying severity of peripheral hypomyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 42, 688-706.

Huxley, C., Passage, E., Robertson, A.M., Youl, B., Huston, S., Manson, A., Saberan-Djoniedi, D., Figarella-Branger, D., Pellissier, J.F., Thomas, P.K., Fontes, M., 1998. Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 7, 449-458.

Isaacs, A.M., Davies, K.E., Hunter, A.J., Nolan, P.M., Vizor, L., Peters, J., Gale, D.G., Kellsell, D.P., Latham, I.D., Chase, J.M., Fisher, E.M., Bouzyk, M.M., Potter, A., Masih, M., Walsh, F.S., Sims, M.A., Doncaster, K.E., Parsons, C.A., Martin, J., Brown, S.D., Rastan, S., Spurr, N.K., Gray, I.C., 2000. Identification of two new Pmp22 mouse mutants using large-scale mutagenesis and a novel rapid mapping strategy. *Hum Mol Genet* 9, 1865-1871.

Jerath, N.U., Kamholz, J., Grider, T., Harper, A., Swenson, A., Shy, M.E., 2015. Coexistence of a T118M PMP22 missense mutation and chromosome 17 (17p11.2-p12) deletion. *Muscle Nerve* 52, 905-908.

Jouaud, M., Gonnaud, P.M., Richard, L., Latour, P., Ollagnon-Roman, E., Sturtz, F., Mathis, S., Magy, L., Vallat, J.M., 2016. Congenital hypomyelinating neuropathy due to the association of a truncating mutation in PMP22 with the classical HNPP deletion. *Neuromuscul Disord*.

LeGuern, E., Gouider, R., Mabin, D., Tardieu, S., Birouk, N., Parent, P., Bouche, P., Brice, A., 1997. Patients homozygous for the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Ann Neurol* 41, 104-108.

Li, J., 2014. Genetic factors for nerve susceptibility to injuries - lessons from PMP22 deficiency. *Neural Regen Res* 9, 1661-1664.

Li, J., Parker, B., Martyn, C., Natarajan, C., Guo, J., 2013. The PMP22 gene and its related diseases. *Mol Neurobiol* 47, 673-698.

Low, P.A., McLeod, J.G., 1975. Hereditary demyelinating neuropathy in the trembler mouse. *J Neurol Sci* 26, 565-574.

Lupski, J.R., de Oca-Luna, R.M., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B.J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D.F., Killian, J.M., Garcia, C.A., Chakravarti, A., Patel, P.I., 1991. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66, 219-232.

Madrid, R.E., Lofgren, A., Baets, J., Timmerman, V., 2013. Biopsy in a patient with PMP22 exon 2 mutation recapitulates pathology of Trembler-J mouse. *Neuromuscul Disord* 23, 345-348.

Magyar, J.P., Martini, R., Ruelicke, T., Aguzzi, A., Adlkofer, K., Dembic, Z., Zielasek, J., Toyka, K.V., Suter, U., 1996. Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci* 16, 5351-5360.

Mathis, S., Goizet, C., Tazir, M., Magdelaine, C., Lia, A.S., Magy, L., Vallat, J.M., 2015a. Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J Med Genet* 52, 681-690.

Mathis, S., Magy, L., Vallat, J.M., 2015b. Therapeutic options in Charcot-Marie-Tooth diseases. *Expert Rev Neurother* 15, 355-366.

Naef, R., Suter, U., 1999. Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis* 6, 1-14.

Niemann, S., Sreda, M.W., Suter, U., Griffiths, I.R., Nave, K.A., 2000. Uncoupling of myelin assembly and schwann cell differentiation by transgenic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci* 20, 4120-4128.

Pareyson, D., Testa, D., Morbin, M., Erbetta, A., Ciano, C., Lauria, G., Milani, M., Taroni, F., 2003. Does CMT1A homozygosity cause more severe disease with root hypertrophy and higher CSF proteins? *Neurology* 60, 1721-1722.

Passage, E., Norreel, J.C., Noack-Fraissignes, P., Sanguedolce, V., Pizant, J., Thirion, X., Robaglia-Schlupp, A., Pellissier, J.F., Fontes, M., 2004. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 10, 396-401.

Roa, B.B., Garcia, C.A., Suter, U., Kulpa, D.A., Wise, C.A., Mueller, J., Welcher, A.A., Snipes, G.J., Shooter, E.M., Patel, P.I., Lupski, J.R., 1993. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 329, 96-101.

Robertson, A.M., Huxley, C., King, R.H., Thomas, P.K., 1999. Development of early postnatal peripheral nerve abnormalities in Trembler-J and PMP22 transgenic mice. *J Anat* 195 (Pt 3), 331-339.

Robertson, A.M., Perea, J., McGuigan, A., King, R.H., Muddle, J.R., Gabreels-Festen, A.A., Thomas, P.K., Huxley, C., 2002. Comparison of a new pmp22 transgenic mouse line with other mouse models and human patients with CMT1A. *J Anat* 200, 377-390.

Rosenbluth, J., Bobrowski-Khoury, N., 2014. Paranodal dysmyelination in peripheral nerves of Trembler mice. *J Neurosci Res* 92, 476-485.

Sahenk, Z., Nagaraja, H.N., McCracken, B.S., King, W.M., Freimer, M.L., Cedarbaum, J.M., Mendell, J.R., 2005. NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology* 65, 681-689.

Sancho, S., Magyar, J.P., Aguzzi, A., Suter, U., 1999. Distal axonopathy in peripheral nerves of PMP22-mutant mice. *Brain* 122 (Pt 8), 1563-1577.

Saporta, M.A., Katona, I., Zhang, X., Roper, H.P., McClelland, L., Macdonald, F., Brueton, L., Blake, J., Suter, U., Reilly, M.M., Shy, M.E., Li, J., 2011. Neuropathy in a human without the PMP22 gene. *Arch Neurol* 68, 814-821.

Sereda, M., Griffiths, I., Puhlhofer, A., Stewart, H., Rossner, M.J., Zimmerman, F., Magyar, J.P., Schneider, A., Hund, E., Meinck, H.M., Suter, U., Nave, K.A., 1996. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16, 1049-1060.

Sturtz, F.G., Latour, P., Mocquard, Y., Cruz, S., Fenoll, B., LeFur, J.M., Mabin, D., Chazot, G., Vandenberghe, A., 1997. Clinical and electrophysiological phenotype of a homozygously duplicated Charcot-Marie-Tooth (type 1A) disease. *Eur Neurol* 38, 26-30.

Suh, J.G., Ichihara, N., Saigoh, K., Nakabayashi, O., Yamanishi, T., Tanaka, K., Wada, K., Kikuchi, T., 1997. An in-frame deletion in peripheral myelin protein-22 gene causes

hypomyelination and cell death of the Schwann cells in the new Trembler mutant mice. *Neuroscience* 79, 735-744.

Suter, U., Moskow, J.J., Welcher, A.A., Snipes, G.J., Kosaras, B., Sidman, R.L., Buchberg, A.M., Shooter, E.M., 1992. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4382-4386.

Valentijn, L.J., Ouvrier, R.A., van den Bosch, N.H., Bolhuis, P.A., Baas, F., Nicholson, G.A., 1995. Dejerine-Sottas neuropathy is associated with a de novo PMP22 mutation. *Hum Mutat* 5, 76-80.

Vallat, J.M., 2003. Dominantly inherited peripheral neuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 699-714.

Vallat, J.M., Sindou, P., Preux, P.M., Tabaraud, F., Milor, A.M., Couratier, P., LeGuern, E., Brice, A., 1996. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 39, 813-817.

Xu, W., Manichella, D., Jiang, H., Vallat, J.M., Lilien, J., Baron, P., Scarlato, G., Kamholz, J., Shy, M.E., 2000. Absence of P0 leads to the dysregulation of myelin gene expression and myelin morphogenesis. *J Neurosci Res* 60, 714-724.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

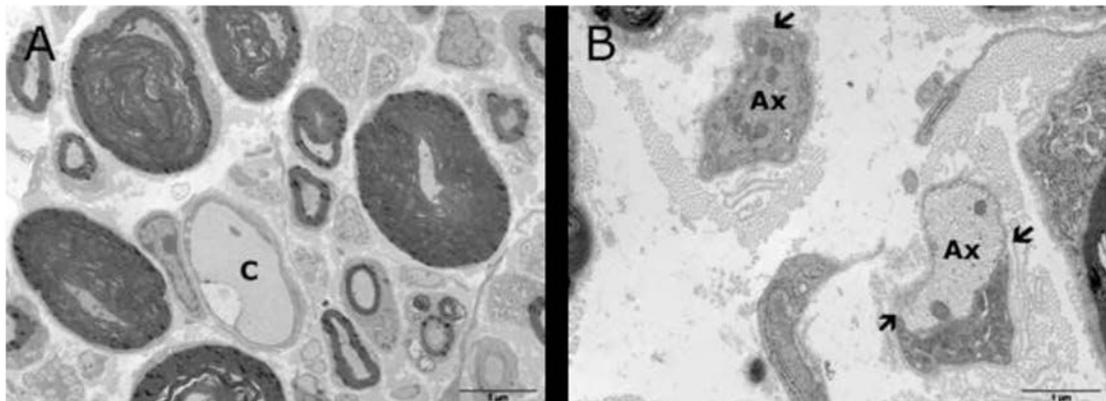


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

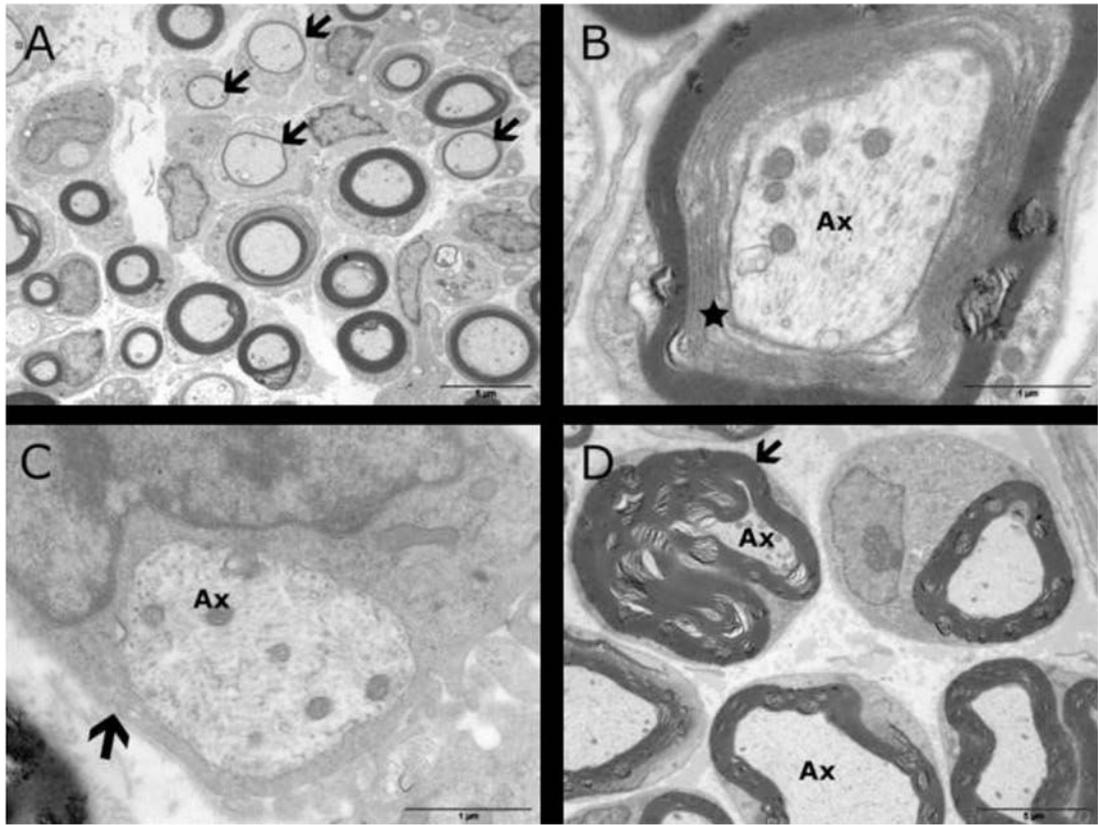


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

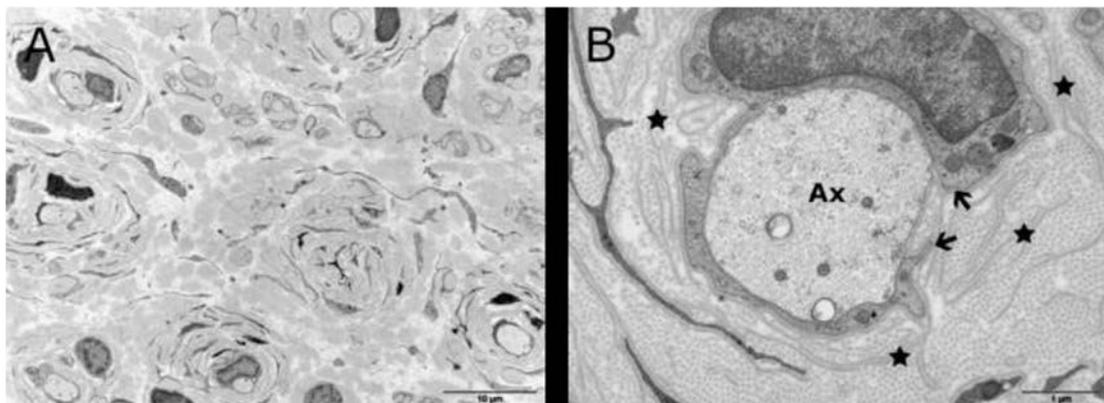


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

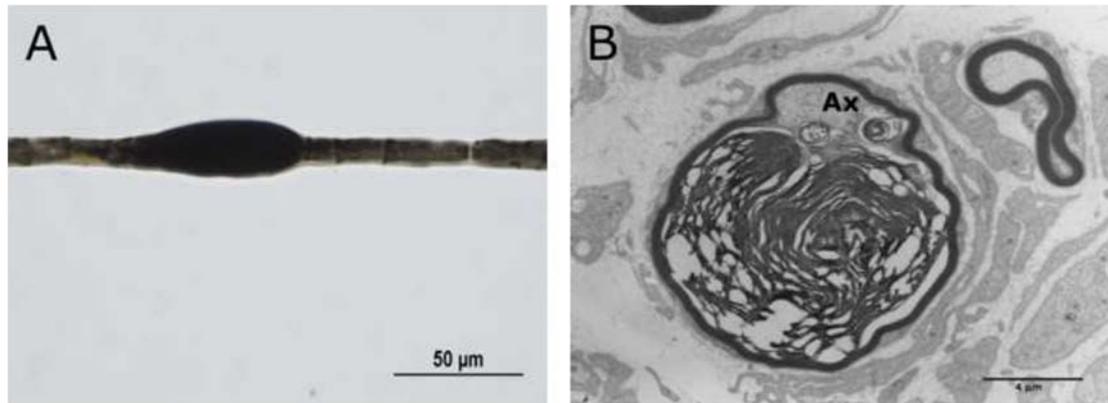


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

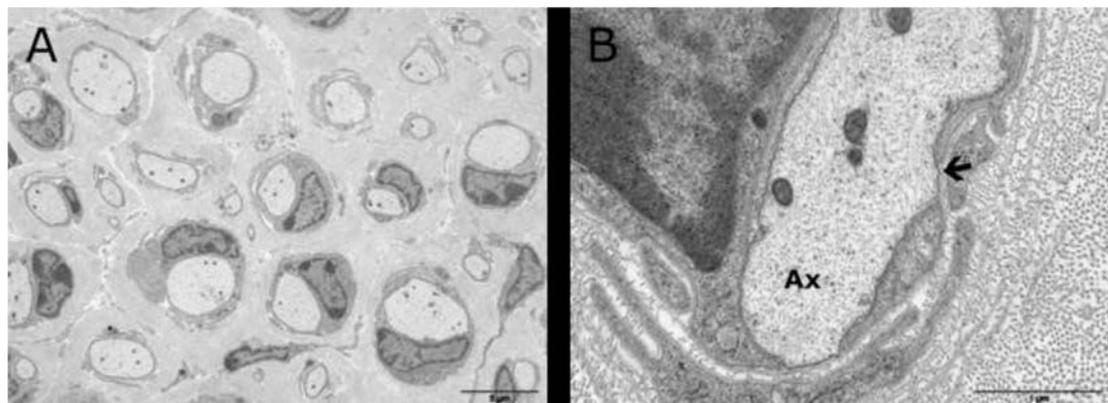


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

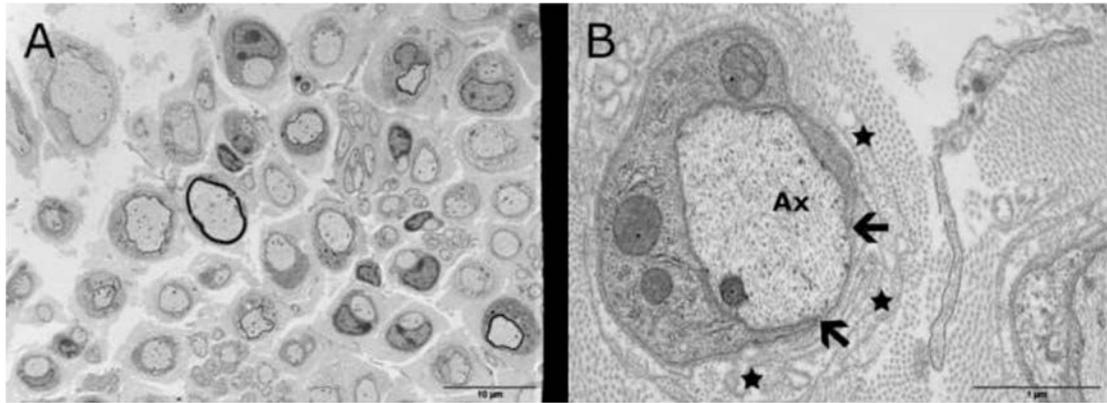


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

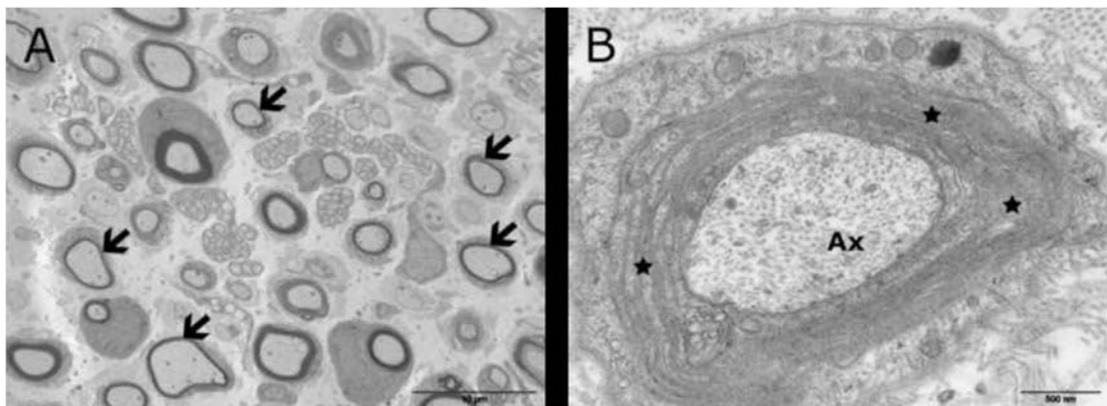


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

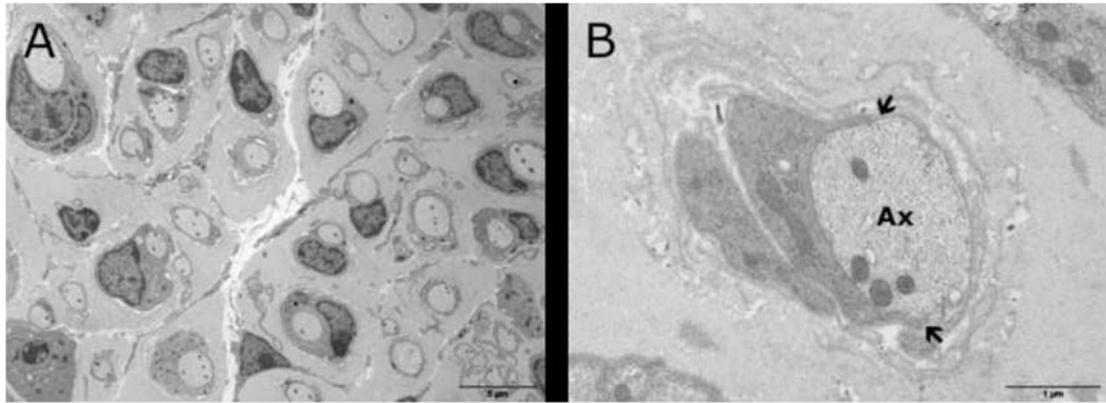


Figure 9
[Click here to download high resolution image](#)

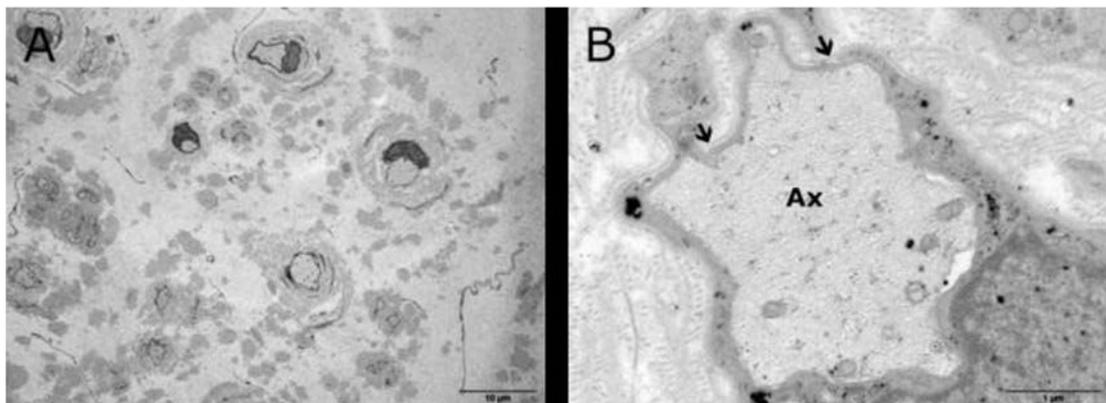


Figure 10
[Click here to download high resolution image](#)

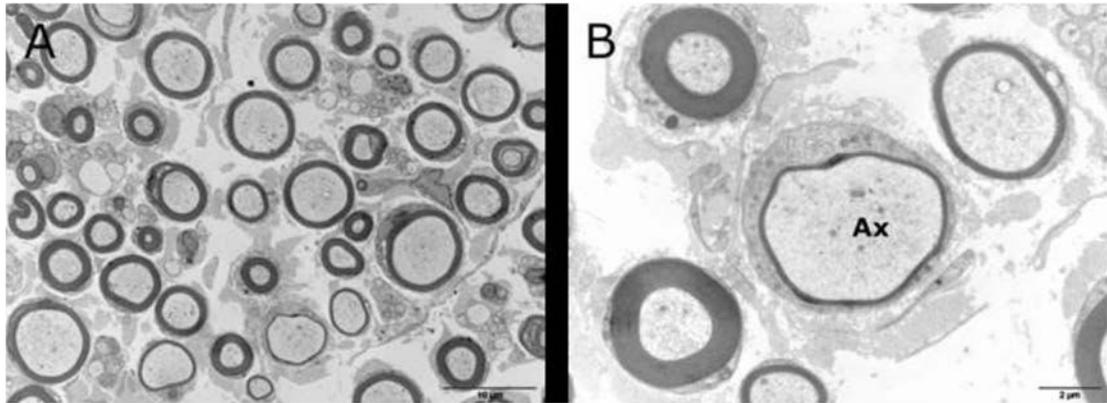


Figure 11
[Click here to download high resolution image](#)

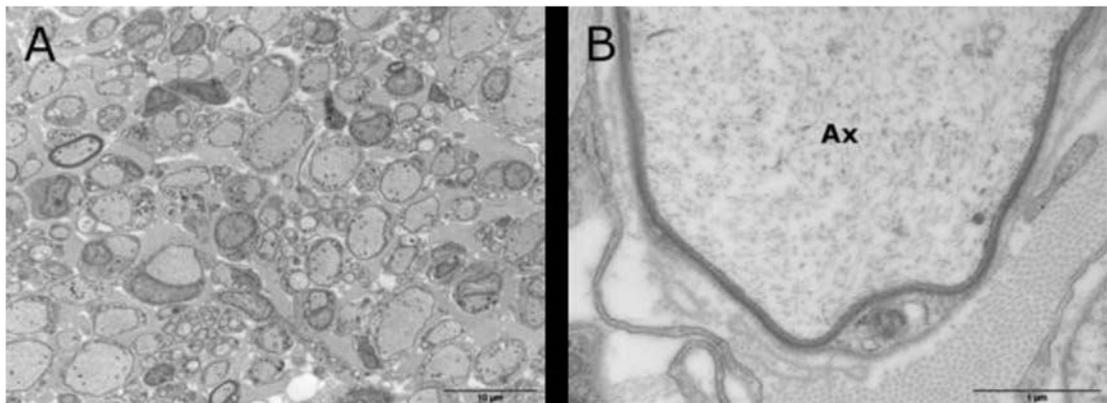
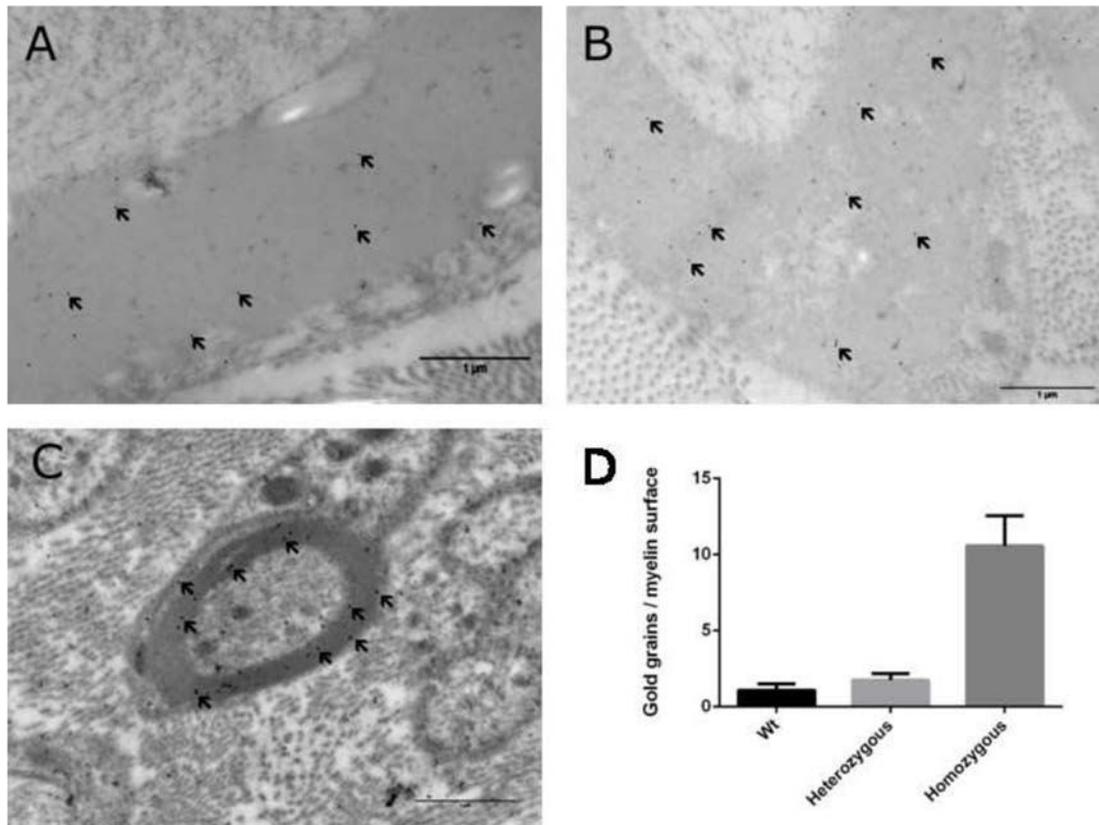


Figure 12
[Click here to download high resolution image](#)



Discussion concernant l'article 3

Au cours de cette étude, nous avons comparé des animaux modèles de neuropathies impliquant la protéine PMP22 à des patients atteints d'une neuropathie correspondante.

De manière très générale, les animaux modèles correspondent très bien à la neuropathie à laquelle ils sont associés.

Cependant, le modèle de souris sans PMP22 est difficilement comparable au patient sans PMP22.

En effet, dans la pathologie du nerf des animaux sans PMP22 nous avons observé des axones avec une myélinisation très importante produisant des structures en tomacula. Le patient sans PMP22 souffre, quant à lui d'une absence congénitale de myéline. Le rôle de PMP22 dans l'initialisation de la myélinisation n'est peut-être pas identique chez l'homme ou la souris. PMP22 apparait comme indispensable à l'initialisation de la myélinisation chez l'homme et non chez la souris. Il est possible que l'initialisation de la myélinisation chez la souris soit compensée par une autre voie de signalisation rendant l'absence de PMP22 non indispensable à l'initialisation de la myélinisation.

Pour générer un bon modèle de l'absence de PMP22 il faudrait alors identifier cette voie de signalisation et l'inactiver en plus d'inactiver *PMP22*. De manière intéressante, les modèles de souris trembler et trembler-J présentent la même pathologie du nerf que le patient sans PMP22 et représenteraient donc un meilleur modèle. En effet, l'arrêt de la formation du mésaxone se fait à la même étape. Est-ce que la présence de PMP22 mutée suffit à empêcher la myélinisation par la voie de signalisation agissant sur les animaux sans PMP22 ? Il faudrait comparer les expressions des facteurs de myélinisation chez les animaux sans PMP22 et homozygotes trembler-J. Des différences dans ces voies de signalisation nous permettraient de savoir quelles voies de signalisations sont responsables de la formation du mésaxone chez la souris ; et nous permettraient aussi de constater s'il y a des différences entre les voies de signalisation humaine et murine.

Article 4: Structural Elucidation of the Calcium-Sensing Receptor Extracellular Domain: 3D mapping of mutation observed in hyper- and hypocalcemic patients

Authors :

Maxime Jouaud, Florent Di Meo, Angélique Nizou, Corinne Magdelaine, Anne Lienhardt-Roussie, Franck Sturtz, Patrick Trouillas, Anne-Sophie Lia

Avant-propos de l'article 4

L'élucidation de la structure tridimensionnelle d'une protéine correspond à l'élucidation de sa structure secondaire (b) et tertiaire (c), voire quaternaire (d) s'il s'agit de protéines multimériques (Figure 37).

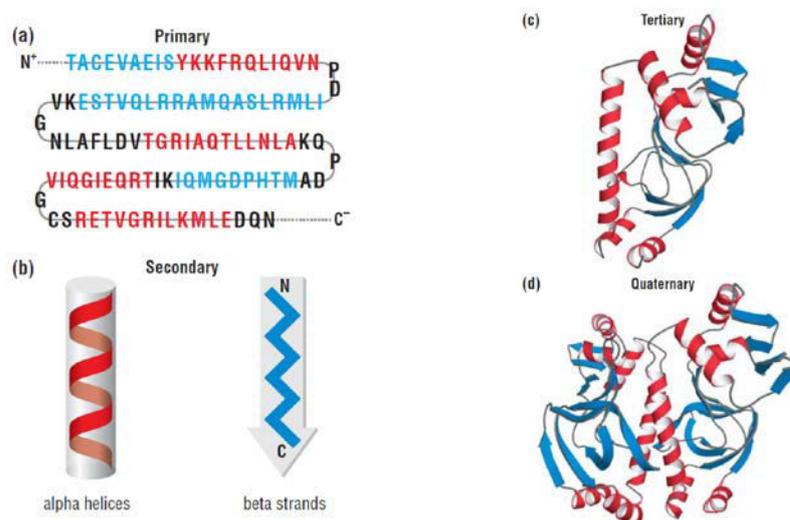


Figure 37 : Structure primaire (a), secondaire (b), tertiaire (c) et quaternaire (d) d'une protéine

Grâce à la structure tridimensionnelle d'une protéine, il est possible d'obtenir de nombreuses informations sur sa fonction biologique. Par exemple, des hélices α avec de nombreux acides aminés hydrophobes sont la marque des domaines transmembranaires. Ainsi, il peut s'agir de récepteurs membranaires, de protéines exprimées à la membrane d'organites, etc.

La structure tridimensionnelle permet aussi de connaître les coordonnées des acides aminés et leurs associations. Souvent, des acides aminés « éloignés » sur la structure linéaire de la protéine s'associent grâce à des repliements et des torsions afin de former des sites catalytiques par exemple.

De la même manière, l'association d'acides aminés entre eux permet la création de motifs ou de sites de fixations permettant l'interaction des protéines entre elles.

Et enfin, la structure tridimensionnelle d'une protéine représente un outil indispensable dans l'étude des mutations. La cartographie des mutations sur une protéine permet parfois la mise en évidence des domaines activateur ou inhibiteur. En connaissant la structure d'une protéine normale et d'une protéine avec une mutation ponctuelle, il est possible de montrer des variations de stabilité, des modifications de propriétés électrostatiques ou de changements de structures masquant ou exposant des sites d'interaction ou de fixation du ligand, par exemple.

Les techniques de microscopie optique ne disposent pas de la résolution suffisante pour distinguer les détails des molécules biologiques au niveau atomique. Les outils de la biologie structurale sont, le plus souvent, des méthodes physiques indirectes. La principale méthode est la cristallographie aux rayons X, historiquement la plus ancienne et toujours la plus utilisée. Elle est complétée par la résonance magnétique nucléaire, qui permet aussi d'atteindre la résolution atomique. Cependant, cette technique présente des limites. Aujourd'hui, il est encore impossible d'élucider des structures de protéines transmembranaires par cristallographie. Or, la structure secondaire de la protéine PMP22 permet de prédire qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire avec 4 domaines, et, de ce fait, elle n'a pas pu être cristallographiée et sa structure tertiaire restait inconnue.

Récemment, d'autres techniques permettant d'élucider de manière très fiable la structure tridimensionnelle d'une protéine, dont les protéines transmembranaires ont été développées. Ces méthodologies reposent sur le couplage de deux techniques complémentaires :

- L'alignement de la séquence protéique avec d'autres séquences protéiques homologues
- La dynamique moléculaire

La première technique part du postulat que deux séquences protéiques identiques auront dans la majorité des cas, un repliement tridimensionnel identique, une origine identique et une fonction identique (ce postulat n'est pas vrai pour toutes les protéines, mais permet de construire un modèle basique). Donc, même si la structure de notre protéine n'est pas connue, on essaye d'élucider une partie de sa structure avec l'aide d'autres séquences protéiques, ayant une forte homologie. Une fois le modèle construit par homologie de séquence, il est possible d'utiliser la dynamique moléculaire afin de connaître la conformation finale que prendrait la protéine dans des conditions proches du vivant.

Afin d'apprendre cette technique de modélisation, dans le but final de modéliser la protéine PMP22, j'ai rejoint un travail déjà en cours dans l'équipe concernant la modélisation du domaine extracellulaire d'une autre protéine nommée CasR, impliquée dans la régulation de la calcémie. Cette technique de dynamique moléculaire nous a permis d'élucider la structure du domaine extracellulaire de cette protéine, de mettre en évidence 4 domaines fonctionnels de cette protéine : zone de dimérisation, zone d'ancrage à la membrane, zone catalytique et une zone couronne qui semble très importante dans l'activité de la protéine. De plus, grâce à ce modèle, nous avons pu montrer une différence de localisation des mutations activatrices et inhibitrices de cette protéine dans ces différents domaines, ce qui n'avait pas pu être le cas avec le modèle initial linéaire. Cette technique d'homologie de séquences et de dynamique moléculaire est donc d'un grand intérêt pour mieux comprendre le fonctionnement d'une protéine.

Title:

**Structural Elucidation of the Calcium-Sensing Receptor Extracellular Domain:
3D mapping of mutations observed in hyper- and hypocalcemic patients**

Authors:

Maxime Jouaud¹, Florent Di Meo², Angélique Nizou¹, Corinne Magdelaine^{1,3}, Anne Lienhardt-Roussie⁴, Franck Sturtz^{1,3}, Patrick Trouillas^{2,5,*}, Anne-Sophie Lia^{1,3,*}

Adresses:

¹ Univ. Limoges. EA6309.

2 rue du Dr Marcland, F-87000 Limoges, France

² INSERM UMR 850, Univ. Limoges, Faculty of Pharmacy,

2 rue du Dr Marcland, F-87025, Limoges, France

³ CHU Limoges, Department of Biochemistry and Molecular Biology

2 avenue Martin Luther King, F-87042 Limoges Cedex 1, France

⁴ CHU de Limoges, Department of Pediatrics

2 avenue Martin Luther King, F-87042 Limoges Cedex 1, France

⁵ Regional Centre for Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry,

Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

***Running title:** Calcium-Sensing Receptor Extracellular Domain 3D mapping

Corresponding author:

Dr. Anne-Sophie Lia, Université de Limoges, EA6309, Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, F-87025 Limoges, France. Tel.: 33-555-435-938; Fax : 33-555-435-885; E-mail: asliabaldini@unilim.fr

Keywords: Calcium-Sensing Receptor, 3D model, mutations, hypocalcemia, hypercalcemia

Background: Mutations in the Calcium-Sensing-Receptor gene (*CASR*) have been identified as causing hyper- or hypocalcemia in patients.

Results: We developed a novel model of the *CASR* Extracellular-Domain allowing complete 3D mapping of the mutations.

Conclusion: The distribution of the mutations identifies five regions as being essential for this receptor function.

Significance: The function/structure correlations elucidated by this model illustrate its value.

SUMMARY

The Calcium-Sensing-Receptor (CASR) is a G-Coupled-Protein-Receptor (GPCR), which plays a central role in regulating extracellular Ca^{2+} concentrations. Its three-dimensional structure is still unresolved (neither the whole protein nor the extracellular domain - ECD), whereas its knowledge is mandatory to better rationalize its activity. On one hand, gain-of-function mutations of the *CASR* gene have been identified in sporadic or familial Autosomal-Dominant-Hypocalcemia (ADH) patients. On the other hand, inactivating mutations of the *CASR* gene cause Familial-Hypocalciuric-Hypercalcemia (FHH). Interestingly, more than 63% of these *CASR* mutations are located in the ECD. Thus, we designed a complete 3D model of CASR-ECD, based on the rat mGluR3 structure, developed by homology modeling and Molecular Dynamic (MD) simulations. This novel model allowed five regions in CASR-ECD to be precisely defined: the Membrane-Anchored-Domain (MAD); the Internal-Domain (ID); the Crown-Domain (CD); the Extended-Dimerization-Domain (EDD); and the Calcium-Binding-Sites (CBS). The known amino acid substitutions associated with FHH and ADH were mapped onto this 3D model. The CD was the only domain in which all known mutations were activating ones. We further studied this region by functional and structural analyses of the new mutation, namely p.Cys131Arg, and a nearby mutation, namely p.Cys129Arg. We showed that both p.Cys131Arg and p.Cys129Arg are activating mutations, and that they result in the loss of one or 2 disulphide bonds. The architecture of these disulphide bonds is better highlighted from the *in silico* models. These novel models provided evidence of the importance of the CD in CASR regulation activity. More generally, it supports clarification of the role of each CASR region, with an atomistic resolution.

INTRODUCTION

The calcium-sensing receptor (CASR) plays a central role in regulating extracellular Ca^{2+} concentrations. It is abundantly expressed in tissues and cells involved in calcium homeostasis including the parathyroid glands and cells lining the kidney tubule (Brown et al., 1993). CASR, which works as a dimer, is responsive for very small changes in circulating calcium concentration and, once activated, it inhibits parathyroid hormone (PTH) secretion and renal tubule calcium reabsorption. Mutations in the *CASR* gene may occur and have variable effects. Inactivating mutations in the *CASR* gene cause hypercalcemic disorders, whereas activating mutations induce hypocalcemic disorders, which provide evidence of the physiological importance of this receptor as a 'calciostat' (Fadil M Hannan et al., 2012; Hendy et al., 2000; Pollak et al., 1993). Heterozygous loss-of-function mutations of *CASR* lead to familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH), whereas the homozygous mutations of this type lead to neonatal severe hyperparathyroidism (NSHPT). In contrast, familial/sporadic autosomal dominant hypocalcemia (ADH) is caused by heterozygous *CASR* gain-of-function mutations (Pollak et al., 1994). The clinical phenotype of these patients is usually mild and in some cases asymptomatic, and the biological phenotype associates hypocalcemia with normal however inadapted persistent calciuria and low PTH levels (Baron et al., 1996).

CASR is a member of family 3 of the G protein-coupled receptor (GPCR) super family (Bockaert and Pin, 1999), which also includes metabotropic glutamate receptors (mGluR1-8), heterodimeric gamma-aminobutyric acid B (GABAB) receptors, taste (T1R) receptors, the promiscuous L-alpha-amino acid receptor (GPCR6A) and several orphan receptors. Members of family 3 typically feature a large extracellular domain (ECD) at the amino terminus, a seven-transmembrane domain (TMD) and an intracellular domain (ICD). The ECD binds

various endogenous agonists, and many physiological functions regulated by family 3 GPCRs are mediated through agonist-mediated allosteric modulation of the respective ECDs; thus, understanding the structure–function relationships of each part of ECDs is crucial for elucidating the mechanisms involved, and for putative drug design.

More than 131 naturally occurring loss-of-function mutations and 71 gain-of-function mutations have been reported (<http://www.casrdb.mcgill.ca>) (Pidashveva et al., 2004). These mutations map to the large extracellular amino terminus domain (63% of the mutations), the seven TMDs (32%) and the intracellular carboxy terminus domain (5%). The identification and analysis of these naturally occurring mutations have contributed to elucidating the structure and function of this receptor. However, the spatial location of each mutation has not been thoroughly defined yet, although it is crucial to clarify the respective roles of CASR regions.

Attempts to crystallize the whole CASR and isolated CASR-ECD have been unsuccessful, so far. Crystal structures of the agonist-binding domain of the homologous type 2 metabotropic glutamate receptor (mGluR2) and G protein-coupled rhodopsin can be exploited to provide insights into the structure and function of CASR. Using homology modeling of the human CASR based on the rat mGluR2 (Kunishima et al., 2000), a three-dimensional (3D) structure of the human CASR has been proposed (Hu and Spiegel, 2007; Reyes-Cruz et al., 2001; Silve et al., 2005). This strategy was a first important step for assessing the overall shape of CASR. However, it was not sufficiently precise for analysis of molecular interactions with an atomic resolution. Indeed, as a consequence of the method used for building the model, there are many missing amino-acid sequences (gaps), potentially resulting in significant misleading of supramolecular arrangements.

Thus, we designed a complete 3D-model of CASR-ECD, based on the X-ray structure of mGluR2 structure. We used homology modeling and molecular dynamic (MD) simulations to establish a 3D-model of CASR, that is fully relaxed and without any amino-acid gaps. This novel model has highlighted five regions in the CASR-ECD. The 3D distribution of all known amino acid mutations associated with FHH and ADH was analyzed. The effects of the mutations were correlated to their 3D locations. A particular attention was paid to Cys129 and Cys131, whose role suggested the existence of disulphide bonds, either Cys129-Cys129, Cys131-Cys131 or Cys129-Cys131. To support conclusions from the *in silico* models, *in vitro* targeted mutations of both Cys129 and Cys131 were achieved, namely mutations p.Cys129Arg, p.Cys131Arg and both at the same time, with a reporter system allowing quantitation of the CASR activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Homology Modeling The construction of CASR ECD model is a challenging task owing to the poor identity scores obtained when aligning the CASR ECD sequence (UNIPROT reference P41180) to available sequences with 3D X-ray structures in the literature. The sequence analysis was performed using the UNIPROT server (Boutet et al., 2016) in which the best identity score of 33.1% was obtained with the metabotropic glutamate receptor 2 (UNIPROT reference P31422). The homology model of CASR ECD was obtained by aligning the X-ray structure of mGluR2 receptor (PBDID 2E4U)(Muto et al., 2007) with the human sequence of CASR ECD (NCBI Reference Sequence: XP_016862813.1) using the SWISS-MODEL protein modeling server (Bordoli et al., 2009). The model was then thoroughly refined by carefully checking gaps as well as predicted secondary structure information. The relevance of disulfide bridges between both monomers (namely A and B) involving Cys131 and/or Cys129 was carefully investigated (see text below).

Owing to the poor identity score, MD simulations in water were performed to relax the whole system. A first short 20 ns (N,P,T) MD run was carried out relaxing the crown domain, consisting of unfold loops.

MD technical details Amino-acids were modeled using the AMBER FF99SB forcefield (Lindorff-Larsen et al., 2010). Water molecules were described by the "Three-point" model (TIP3P) and the corresponding forcefield parameters for ions (Na⁺ and Cl⁻) were used (O'Brien et al., 2016). The minimum distance between any atom of the system and the edge of the periodic box was set up at 10 Å. For each model, water molecules were minimized prior to the entire system minimization. Boxes were gradually thermally equilibrated to 300 K by performing (N,V,T) MD simulations over 600 ps. Prior to MD production, 5 ns MD

simulations were performed to ensure volume and density, leading to boxes of ca. Finally, 20 and 100 ns (N,P,T) production MD simulations were carried out at 300 K, using SHAKE algorithm to restrain water X-H bond. Langevin dynamics with a collision frequency of 1.0 ps^{-1} were used. All MD simulations were performed using the AMBER package(Case et al., 2005).

Mutation studies

The 99 missense mutations studied here were reported previously (CASRdatabase). An additional mutation, p.Cys131Arg, was found by our group and it has not been published so far. The mutations associated with ADH were considered to be activating, and those associated to FHH were classified as inhibiting.

Site-targeted mutagenesis

The cDNA for human *CASR* was ligated between the HindIII and XhoI restriction sites of the pCR3.1 expression vector to provide pCR3.1/h*CASR*. The Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used. The primers were complementary, with the mutant sequence placed in the middle. The primers were annealed to the template and 18 rounds of extension were performed with Pfu Turbo DNA polymerase, followed by digestion of the template with the Dpn1 enzyme. The reaction was used to transform an *E. coli* strain (XL1-Blue) that can incorporate nicked DNA and repair it, and colonies were screened by PCR and sequencing. All constructs were verified by Sanger sequencing. Three constructs have been built, corresponding to p.C131R, p.C129R and p.C131R / p.C129R mutations.

Transient transfection by human CASR cDNA

Cos 7 cells were propagated in 5% CO₂ at 37°C in 75 cm² flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco). For transfection, Cos 7 cells were cultured in 6-well plates and transfected with wild type (wt) or mutant pCR3.1/hCASR plasmid DNA and the Elk-1 trans-reporting system (Stratagene) using the PolyFect transfection reagent (Qiagen). Twenty-four hours after transfection, the cells were starved of serum in DMEM containing no CaCl₂ for 8 h, then cultured in various concentrations of CaCl₂ from 0 to 4 mM for 16 h. The cells were washed in PBS, lysed on ice and the MAPK activity was assayed.

MAPK activity

The exogenous MAPK activity induced by CASR activation was assessed as described elsewhere (18). A trans-reporting system (Stratagene) was used to measure the activity of Elk-1, an ETS domain transcription factor was targeted by MAPK pathways. The luciferase activity was measured using 25 µL cell lysate and 50 µL D-luciferin in a Turner Biosystems 20/20ⁿ luminometer (Promega). The reported values were normalized to the β-galactosidase activity.

3. RESULTS AND DISCUSSION

a) A novel 3D model for CASR-ECD

Over the recent years, the 3D structure of the ECD of rat metabotropic glutamate receptor (mGluR) has been extensively used to study the general CASR-ECD structural features. It has been considered to be an adequate CASR model as: i) both CASR and mGluR2 belong to the C-family of G-protein-coupled receptors; ii) the ECD of both receptors share an amino-acid sequence identity of about 33.1%; and iii) the secondary and overall 3D structures of the two proteins are expected to be very similar (Hu and Spiegel, 2007). The examples showing that protein behaviors are influenced by slight modifications in amino-acid sequence are legion.

Here, we propose a novel 3D model for CASR, based on homology modeling of the exact amino-acid sequence and the mGluR2 3D structure. Thanks to post-MD simulations, this model overcomes all structural limitations associated with the X-ray structure determined for mGluR2 in the solid state. All the gaps present in previous 3D-models have been filled in with the correct amino-acid sequences. Five gaps were identified in the mGluR2 sequence with respect to the human CASR-ECD (from p.Ser57 to p.Phe65, from p.Ile120 to p.Ile135, from p.Pro407 to p.Leu422, from p.Asn446 to p.Val455 and from p.Asn512 to p.Lys517). Starting from the sequence alignment of both structures (33.1% identity), the gaps were filled using related 3D sequences as identified by the basic local alignment search tool (BLAST) (McGinnis and Madden, 2004).

At a large scale (secondary structure), this CASR-ECD model exhibits clear structural similarities with mGluR2 (PDBID 2E4U). However, at the residue scale, there are significant differences in distances, torsion angles and local conformations: the root mean square deviation (RMSD) obtained by the superimposition of the two structures was 16.4. The use

of the resolved crystal structure of mGluR2 to evaluate the global shape of CASR-ECD is thus appropriate, but it is not adapted to address molecular interactions at the atomic scale.

b) A complete 3D description of the CASR ECD domains

CASR-ECD exhibits bilobed structure (see lobes 1 and 2 in Figure 1) and it is attached to a membrane anchor domain (MAD) directly linked to the transmembrane domain. This protein includes other specific domains, namely: i) the extended dimerization domain (EDD) containing all residues that influence the interface between the two monomers; ii) the calcium binding sites (CBS); and iii) the crown domain.

Membrane anchor domain - Our model supports the presence of the MAD divided into two subdomains: the nine Cystein domain (NCD) and the peptide linker (PL)(Hu and Spiegel, 2003). The MAD plays important roles in the chemical bonding to the intracellular domain and in signal transduction following calcium binding. The NCD (residues p.Cys542 – p.Cys598) consists of three beta-sheet pairs (Figure 1a), which are structured by disulfide bridges between the nine Cys residues (p.Cys542, p.Cys546, p.Cys561, p.Cys562, p.Cys565, p.Cys568, p.Cys582, p.Cys585 and p.Cys598). This structure thus appears to be relatively rigid. The linkage to the transmembrane region (the PL, the second subdomain of MAD) and to the rest of the ECD consists of single amino-acid chains (Figure 1a). These two links confer substantial supramolecular flexibility, which allow conformational changes following calcium binding, for instance, facilitating interactions between the two monomers.

Extended dimerization domain - The EDD consists of all residues that may directly or indirectly influence dimerization, including the region in which noncovalent interactions drive close contacts between the two monomers (Figure 1b). The 3D optimized structure mainly reveals interaction between the p.Gly146-p.Tyr161 alpha helices of the two

monomers as being the driving force of dimerization: the average distance between the two helices is 8.1 Å. This interaction is mainly due to the H-bonding interaction, e.g., between the amide moiety of p.Asn155 in one monomer and the keto moiety of p.Thr151 in the other monomer, and *vice versa* ($d \sim 3.0$ Å).

Calcium-binding sites - Recent work based on the mGluR1 model and experimental data describes five CBS (Huang et al., 2009). The spatial and charge characterization of these sites is rationalized in the novel 3D model (Figure 2).

Our analysis confirmed that CBS-1 consists of five residues (p.Ser147, p.Ser170, p.Asp190, p.Tyr218 and p.Glu297), defining a zone with a 5.8 Å radius-pocket (Figure 2). The presence of negatively charged residues (mainly p.Glu297 and p.Asp190) creates a negative electrostatic potential that traps Ca^{2+} cations. This binding site is located between three alpha-helices, in between lobes 1 and 2 (Figures 1 and 2), defining a groove that has enough flexibility to re-adapt in the presence of Ca^{2+} . The presence of Ca^{2+} has been suggested to significantly modify inter-helix distances, thus driving the global bilobed shape of CASR-ECD (Huang et al., 2009). Our analysis supports this suggestion.

CBS-2 is located at the surface of lobe 2 and therefore it is highly solvent-accessible. However, the structure of the pocket appears less optimum than as previously described on the basis on the pure mGluR1-homology model. In this 3D model, geometrical relaxations allow the five residues of the pocket (p.Asp215, p.Leu240, p.Ser244, p.Asp248 and p.Asn253) to be pushed apart from each other, the radius-pocket being 8.3 Å. In this case, the presence of Ca^{2+} probably induces local conformational changes of the loop p.Ile243-p.Glu249.

CBS-3 (radius of the region equals 5.8 Å) is located in one of the alpha-helices of lobe 2 (Huang et al., 2007). It consists of five very negative Glu residues (p.Glu224, p.Glu228,

p.Glu229, p.Glu231 and p.Glu232). The negative electrostatic potential caused by these residues is greater than that of any of the other CBS, and it generates strong electrostatic attraction for Ca²⁺ cation trapping. CBS-3 is located on the CASR-ECD surface, making this site highly solvent-accessible (Figure 2).

CBS-4 (radius of the region equals 5.5 Å) consists of three Glu residues (p.Glu350, p.Glu353 and p.Glu354). It is located on one of the alpha-helices of lobe 1. As CBS-3, it is located on the CASR ECD surface and it is thus highly accessible to Ca²⁺ cations (Figure 2).

CBS-5 is defined by five residues (p.Glu378, p.Glu379, p.Thr396, p.Asp398 and p.Glu399) located in lobe 1 (20). Residues p.Thr396, p.Asp398 and p.Glu399 define a negatively charged region. This region is not solvent-accessible, but the flexibility attributed to the surrounding loops clearly allows stochastic re-arrangements such that Ca²⁺ can penetrate. In this 3D model, residues p.Glu378 and p.Glu379 appear to be distant from the other three residues (p.Thr396, p.Asp398 and p.Glu399) and thus they cannot be considered as part of the same CBS, but rather as part of a newly defined CBS.

Crown-domain - In this 3D model, the crown-domain (p.Gln117 – p.Pro136) was built by sequence blasting. It consists of two flexible loops from both monomers, each of them containing the p.Cys131 residue. MD simulations have relaxed the structure of this region, and this has confirmed that the p.Cys131 and p.Cys129 residues were prone to form a disulfide bridge (Figure 1c), as previously hypothesized in the literature (Suzuki et al., 2005; Watanabe et al., 2002; Zhang et al., 2001). From this observation, four *in silico* architectures were built: (i) constraining a single Cys131A-Cys131B bond; (ii) constraining a single Cys129A-Cys131B bond; (iii) constraining a double Cys129A-Cys129B / Cys131A-Cys131B bond; and (iv) constraining a double Cys129A-Cys131B / Cys131A-Cys129B bond. Other single

disulfide bridge situations can in principle exist, i.e., Cys129A-Cys129B and Cys131A-Cys129B. However, these molecular models were not built, as they would mimic similar situation than the former two structures. The four *in silico* models were completely relaxed over 100 ns (N,P,T) MD simulations (total production runs: 400 ns). The two loops of the crown domain provided high flexibility to this region, which was counteracted by the rigidity imposed by the disulfide bridge. No specific long-range interaction was observed between the two loops. The global conformational features of the crown region directly influence the dimerization domain, as this region is directly connected to the α -helices involved in the dimerization region. The presence of the disulfide bridge substantially increases interactions between the two monomers, and thereby it drives dimerization and dimer structure.

c) Detailed spatial description of mutations involved in hyper- and hypocalcemic patients

Table 1 lists seventy-two missense mutations associated with FHH (inhibiting mutations) and twenty-seven missense mutations associated with ADH (activating mutations) reported in the literature and located on CASR-ECD. Their spatial locations were depicted on the new CASR 3D model, highlighting key zones of this receptor at a molecular scale (Figure 3). The mutations are distributed into five separated regions. Four of these regions have already been described, namely MAD, EDD, CBS and the crown domain. The fifth region is an internal domain (i.e., amino acids are not solvent-accessible). We found this new spatial study to be particularly informative about the location of inhibiting and activating mutations (Table 2): both types of mutations are found in EDD and CBS; all mutations in the crown domain are activating mutations; and almost all mutations in the internal domain and in MAD are inhibiting mutations.

Inhibiting mutations - The seventy-two inhibiting mutations are mostly located in: i) the internal domain of lobe 1; ii) EDD; and iii) MAD (Figure 3a and Table 2). No chemical specificity is observed for the inhibiting mutations e.g., non-polar to polar or neutral to charged. One can notice that none of the inhibiting mutations is located in the crown domain. The internal domain of lobe 1 is here newly identified as a key zone for mutations, as it contains twenty-three inhibiting mutations (Tables 1 and 2). The mutations in this region affect residues that are not solvent-accessible and unlikely to form Ca²⁺ binding sites. These mutations are relatively delocalized over lobe 1. They most likely act by modifying the secondary structure, *i.e.*, allosteric effects.

Fifteen of the inhibiting mutations are located in EDD (Tables 1 and 2). The mutations in the dimerization region probably affect (noncovalent) long-range interactions, modifying the entire conformation of the dimer. For example, two of the mutations are substitutions of non-polar residues (p.Gly158, p.Leu159) in the alpha-helix of the dimerization region by polar residues (Glu and Arg, respectively, see Table 1), increasing electrostatic interactions between the two monomers. The resulting conformational modifications of the dimer do not directly affect the Ca²⁺-binding: they more likely affect signal transduction after Ca²⁺-binding. The MAD is also enriched in inhibiting mutations, containing fourteen of these mutations (Table 2). The NCD is particularly sensitive to mutation: five of the nine Cys residues involved in disulfide bridges have been found to be mutated in FHH patients: p.Cys562, p.Cys565, p.Cys562 and p.Cys595. Presumably, the phenotypic effects of these mutations are consequences of the loss of the corresponding disulfide bridges. Mutations of this region clearly affect the local secondary structure (beta-sheets) and either inhibit the transduction signal through the membrane or modify the secondary structure of the receptor.

Outside these three regions, twelve mutations are located in CBS, namely: i) p.Asp190, p.Tyr218 and p.Glu297 in CBS-1; ii) p.Pro221, p.Lys225 and p.Arg227 in CBS-3; and iii) p.Cys395 and p.Gly397 in CBS-5 (Table 2). The p.Asp190Gly and p.Glu297Lys mutations result in the loss of the COO⁻ negative charge, thereby decreasing Ca²⁺-binding capacity. The other mutations are likely to cause conformational changes, potentially decreasing Ca²⁺ accessibility.

The mutations identified in patients suffering from NSPTH (in bold, Tables 1 and 2) are distributed over all five regions described above. This form of the disease is usually associated with homozygous mutations, and mutated homodimers are not functional, wherever the mutation is located.

Activating mutations - Twenty-seven activating mutations have been reported (Tables 1 and 2). There are no activating mutations in the internal domain. This suggests that the conformation of this domain is optimal for CASR activation, such that its modification can only reduce CASR activity (inhibiting mutations). Similarly for MAD there is only one activating mutation, p.Glu556Lys, whereas thirteen mutations are inhibiting. This single activating mutation do not affect directly the disulfide bridges. The dysfunction (expressed by partial epileptic seizures) for the patient in whom this mutation was identified, emerged lately in life, at age 54 years, allowing this mutation to be classified as 'mild'.

Activating mutations are clustered in three regions: CBS, EDD and the crown domain. Seven mutations (affecting five amino acids) map in the CBS (which also contains inhibiting mutations): p.Glu191Lys; p.Glu297Asp (CBS1); p.Glu241Lys (CBS2); p.Pro221Leu; p.Glu228Lys; p.Glu228Gln; and p.Glu228Gly (CBS3). Some of these mutations do not directly

increase Ca²⁺ binding. The mutations p.Glu191Lys, p.Glu241Lys and p.Glu228Lys involving a change in charge from negative to positive, surprisingly, activate CASR. These mutations probably cause conformational changes, which may contribute to the observed activation. Mutations of residues p.Pro221 and p.Glu297 may be either activating or inhibiting. For p.Glu297, the inhibiting character of the p.Glu297Lys mutation is attributed to the change from negative to positive charge; the activating effect of the p.Glu297Asp mutation can be attributed to the negative potential of Asp being greater than that of Glu (the Asp residue being smaller and having the same charge). The effects of mutations of p.Pro221 have not been systematically elucidated to explain the CaSR activation or inhibition; local conformational modifications may affect the CBS.

To date, seven of the activating mutations described map in EDD: p.Lys29Glu; p.Lys47Asn; p.Val104Ile; p.Ala116Thr; p.Thr151Met; p.Leu173Phe; and p.Gln245Arg. The corresponding patients present diverse symptoms (from nephrolithiasis to muscle cramps), often diagnosed at very young age (from birth to adolescence, with only one adult case). Some of the residues in this domain may be the site of both activating and inhibiting mutations. For example, p.L173Phe is activating whereas p.Leu173Pro is inhibiting (Tables 1 and 2). The effects of these two mutations probably result from conformational changes rather than pure electrostatic effects.

The specific case of the crown domain and the Cys131 residue

Interestingly, all of the mutations found in the crown domain (p.Asn118Lys, p.Leu125Pro, p.Glu127Lys, p.Cys129Ser, p.Cys131Phe and p.Cys131Trp) except one (p.Asn124Lys) were diagnosed at birth or within the first year of life. This truly makes the crown domain a key

structural element to rationalize the mode of action of CASR. Interestingly, all of these mutations are activating. We gave a thorough attention to p.Cys129 and p.Cys131 mutations, *i.e.*, at the disulfide junction between the two monomers.

In particular, the p.Cys131Arg mutation was diagnosed in our department in a 2-year-old boy suffering from severe hypoparathyroidism. We tested the ability of the mutant receptor to respond to extracellular calcium using a MAPK pathway trans-reporting system and the wild-type receptor for reference (Figure 4). Following transient expression of wild-type CASR cDNA in Cos7 cells, the EC_{50} was 2.22 ± 0.16 mM Ca^{2+} (mean \pm se; n=4; Figure 4). No cell response was observed when WT-CASR was not stimulated (extracellular calcium at 0 mM), as expected; its activity progressively increased with the Ca^{2+} concentration and reached a maximum (100% activity) at 4 mM Ca^{2+} (Figure 4, bold line). By contrast, the p.Cys131Arg mutation resulted in impaired CASR function, confirming the clinical diagnosis of ADH: the dose-response curve showed a typical left shift with respect to the wild-type receptor (Figure 4). The p.Cys131Phe and p.Cys131Trp mutants were expected to give similar results (Suzuki et al., 2005; Watanabe et al., 2002).

These analyses clearly confirmed the importance of the crown domain. The Cys131A-Cys131B linkage may constrain dynamic folding in the presence or absence of Ca^{2+} . The conformation has been experimentally shown to be significantly different in the presence or absence of Ca^{2+} (Huang et al., 2007). The presence of Ca^{2+} has been suggested to drive the CASR dimer into a more open shape, following re-arrangements of lobe 1. The Cys131A-Cys131B covalent linkage may constrain this rearrangement by preventing the complete opening of the structure. Mutations of the p.Cys131 residue may prevent the Cys131A-Cys131B covalent linkage, that would lead to a fully open shape. Thus, the mutation of

p.Cys131 might abolish the regulatory role of the crown domain, resulting in an increase of sensitivity of CASR to Ca^{2+} . The structural effects of a series of CASR mutants (p.Cys131Phe, p.Cys131Trp or p.Cys131Arg) were investigated on the 3D model. As a matter of fact, these mutations resulted in the loss of the disulfide bond in the crown domain. A short-time MD relaxation allowed confirming the expected conformational opening, as highlighted by (i) a local RMSD (calculated in the sequence region from p.Gln117 to p.Pro136) of 1.96 between p.Cys131Arg mutant (data not shown) and the wild-type structure (native 3D model), and (ii) an increased distance from the wild-type to the mutant structure (i.e., C-C distance from 6.1 to 12.2 Å, see Figure 5). Although a particular attention has been paid to the p.Cys131 mutation as it has been repeatedly observed clinically, the nearby p.Cys129 residue has been shown here to bear similar role. We created 4 models *in silico* of probable disulfide bridge. But these models are structurally stable (Figure 6). To confirm the importance of the crown domain role related to the disulfide bridge (single or more probably double disulfide bridge) and as it was highlighted *in silico*, three *in vitro* mutants were created, namely mutations p.Cys129Arg, p.Cys131Arg or both. The two single mutations were activating, however to a much lower extent with the p.Cys129Arg mutation (Figure 4). The double-mutation was slightly and much more activating than p.Cys129Arg, and p.Cys131Arg, respectively (Figure 4). This is in agreement with the molecular models, confirming the occurrence of disulfide bridges, which involve mainly p.Cys131 or both p.Cys129/p.Cys131, in a disulfide-bridge architecture (Cys131A-Cys131B, Cys129A-Cys129B/Cys131A-Cys131B or Cys129A-Cys131B/Cys131A-Cys129B). We hypothesized that the parallel model Cys129A-Cys129B/Cys131A-Cys131B seems to be the most correct. Indeed, the mutation of Cys129

and 131 are activating CasR and CasR is much more activated when Cys129 and Cys131 are mutated. We therefore assume a double disulfide bridge in parallel.

CONCLUSIONS

In this study, a new molecular model of CASR-ECD was developed using homology modeling combined with MD simulations to relax the structure into a natural conformation. This model allowed us to establish a complete and detailed 3D map of the mutations responsible for hypo- and hyper-calcemia. The distribution of the mutations highlights five regions, namely the extended dimerization domain, the calcium binding sites, the membrane anchor domain, the internal domain and the crown domain. These regions clearly appeared crucial for the receptor's function. The analysis of locations of disease-associated mutations on this new model revealed the importance of the crown domain and of the disulfide bond in CASR regulation, the two Cys129 and Cys131 residues being prone to form this disulfide bridge between the two monomers of the protein. To confirm this *in-silico*-based finding, mutants were built *in vivo*, which involved both Cys129 and Cys131. Single mutations (i.e., either Cys129 or Cys131) abnormally increased CASR activity. This effect was enhanced when mutating both residues at the same time.

Improved computational facilities may allow MD simulations at a much higher time scale. Although this would be a challenging task, it should bring a thorough comparison of conformational features in the mutant structures with respect to the wild-type structure at an atomistic resolution. The new 3D model developed here is a solid guess-model for further investigations.

Acknowledgements - We thank the “Conseil Régional du Limousin” for financial support and CALI (Calcul en Limousin) for computing facilities. Research in Limoges is also supported by the COST action CM0804 “Chemical Biology with Natural Compounds”. We are grateful for the support from the Operational Program Research and Development for Innovations–European Regional Development Fund (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic).

REFERENCES

- Aida, K., Koishi, S., Inoue, M., Nakazato, M., Tawata, M., Onaya, T., 1995. Familial hypocalciuric hypercalcemia associated with mutation in the human Ca(2+)-sensing receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2594–2598. doi:10.1210/jcem.80.9.7673400
- Al-Salameh, A., Cetani, F., Pardi, E., Vulpoi, C., Pierre, P., de Calan, L., Guyetant, S., Jeunemaitre, X., Lecomte, P., 2011. A novel mutation in the calcium-sensing receptor in a French family with familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 359–363. doi:10.1530/EJE-11-0141
- Bai, M., Janjic, N., Trivedi, S., Quinn, S.J., Cole, D.E., Brown, E.M., Hendy, G.N., 1997. Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from a kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *J. Clin. Invest.* 99, 1917–1925. doi:10.1172/JCI119359
- Baron, J., Winer, K.K., Yanovski, J.A., Cunningham, A.W., Laue, L., Zimmerman, D., Cutler, G.B., 1996. Mutations in the Ca(2+)-sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism. *Hum. Mol. Genet.* 5, 601–6.
- Bockaert, J., Pin, J.P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723–9. doi:10.1093/emboj/18.7.1723
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., Schwede, T., 2009. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* 4, 1–13. doi:10.1038/nprot.2008.197
- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Bansal, P., Bridge, A.J., Poux, S., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2016. UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View. pp. 23–54. doi:10.1007/978-1-4939-3167-5_2
- Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lytton, J., Hebert, S.C., 1993. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366, 575–80. doi:10.1038/366575a0
- Burski, K., Torjussen, B., Paulsen, A.Q., Boman, H., Bollerslev, J., 2002. Parathyroid Adenoma in a Subject with Familial Hypocalciuric Hypercalcemia: Coincidence or Causality? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1015–1016. doi:10.1210/jcem.87.3.8304
- Case, D.A., Cheatham, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688. doi:10.1002/jcc.20290
- Cetani, F., Lemmi, M., Cervia, D., Borsari, S., Cianferotti, L., Pardi, E., Ambrogini, E., Banti, C., Brown, E.M., Bagnoli, P., Pinchera, A., Marcocci, C., 2009. Identification and functional characterization of loss-of-function mutations of the calcium-sensing receptor in four Italian kindreds with familial hypocalciuric hypercalcemia. *Eur. J. Endocrinol.* 160, 481–489. doi:10.1530/EJE-08-0798

- Cetani, F., Pardi, E., Borsari, S., Tonacchera, M., Morabito, E., Pinchera, A., Marcocci, C., 2003. Two Italian kindreds with familial hypocalciuric hypercalcaemia caused by loss-of-function mutations in the calcium-sensing receptor (CaR) gene: Functional characterization of a novel CaR missense mutation. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 58, 199–206. doi:10.1046/j.1365-2265.2003.01696.x
- Chikatsu, N., Fukumoto, S., Suzawa, M., Tanaka, Y., Takeuchi, Y., Takeda, S., Tamura, Y., Matsumoto, T., Fujita, T., 1999. An adult patient with severe hypercalcaemia and hypocalcaemia due to a novel homozygous inactivating mutation of calcium-sensing receptor. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 50, 537–43.
- Chikatsu, N., Watanabe, S., Takeuchi, Y., Muraosa, Y., Sasaki, S., Oka, Y., Fukumoto, S., Fujita, T., 2003. A family of autosomal dominant hypocalcemia with an activating mutation of calcium-sensing receptor gene. *Endocr. J.* 50, 91–6.
- Chou, Y.H., Pollak, M.R., Brandi, M.L., Toss, G., Arnqvist, H., Atkinson, A.B., Papapoulos, S.E., Marx, S., Brown, E.M., Seidman, J.G., 1995. Mutations in the human Ca(2+)-sensing-receptor gene that cause familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1075–9.
- Cole, D.E.C., Yun, F.H.J., Wong, B.Y.L., Shuen, A.Y., Booth, R.A., Scillitani, A., Pidasheva, S., Zhou, X., Canaff, L., Hendy, G.N., 2009. Calcium-sensing receptor mutations and denaturing high performance liquid chromatography. *J. Mol. Endocrinol.* 42, 331–9. doi:10.1677/JME-08-0164
- Conley, Y.P., Finegold, D.N., Peters, D.G., Cook, J.S., Oppenheim, D.S., Ferrell, R.E., 2000. Three Novel Activating Mutations in the Calcium-Sensing Receptor Responsible for Autosomal Dominant Hypocalcemia. *Mol. Genet. Metab.* 71, 591–598. doi:10.1006/mgme.2000.3096
- De Luca, F., Ray, K., Mancilla, E.E., Fan, G.F., Winer, K.K., Gore, P., Spiegel, A.M., Baron, J., 1997. Sporadic hypoparathyroidism caused by de Novo gain-of-function mutations of the Ca(2+)-sensing receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2710–5. doi:10.1210/jcem.82.8.4166
- Demedts, M., Lissens, W., Wuyts, W., Matthijs, G., Thomeer, M., Bouillon, R., 2008. A new missense mutation in the CASR gene in familial interstitial lung disease with hypocalciuric hypercalcaemia and defective granulocyte function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 558–9. doi:10.1164/ajrccm.177.5.558
- Felderbauer, P., Hoffmann, P., Klein, W., Bulut, K., Ansoerge, N., Epplen, J.T., Schmitz, F., Schmidt, W.E., 2005. Identification of a novel calcium-sensing receptor gene mutation causing familial hypocalciuric hypercalcaemia by single-strand conformation polymorphism analysis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 113, 31–4. doi:10.1055/s-2004-830523
- Guarnieri, V., Canaff, L., Yun, F.H.J., Scillitani, A., Battista, C., Muscarella, L.A., Wong, B.Y.L., Notarangelo, A., D'Agruma, L., Sacco, M., Cole, D.E.C., Hendy, G.N., 2010. Calcium-Sensing Receptor (CASR) Mutations in Hypercalcaemic States: Studies from a Single Endocrine Clinic Over Three Years. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 1819–1829. doi:10.1210/jc.2008-2430
- Hannan, F.M., Nesbit, M.A., Zhang, C., Cranston, T., Curley, A.J., Harding, B., Fratter, C., Rust, N., Christie, P.T., Turner, J.J.O., Lemos, M.C., Bowl, M.R., Bouillon, R., Brain, C., Bridges, N., Burren, C., Connell, J.M., Jung, H., Marks, E., McCredie, D., Mughal, Z., Rodda, C., Tollefsen, S., Brown, E.M., Yang, J.J., Thakker, R. V., 2012. Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypo-calcaemic patients: evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2768–2778. doi:10.1093/hmg/dds105
- Hannan, F.M., Nesbit, M.A., Zhang, C., Cranston, T., Curley, A.J., Harding, B., Fratter, C., Rust, N., Christie, P.T., Turner, J.J.O., Lemos, M.C., Bowl, M.R., Bouillon, R., Brain, C., Bridges, N., Burren, C., Connell, J.M., Jung, H., Marks, E., McCredie, D., Mughal, Z., Rodda, C., Tollefsen, S., Brown, E.M., Yang, J.J., Thakker, R. V., 2012. Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypo-calcaemic patients: evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2768–78. doi:10.1093/hmg/dds105
- Heath, H., Odelberg, S., Jackson, C.E., Teh, B.T., Hayward, N., Larsson, C., Buist, N.R., Krapcho, K.J., Hung, B.C., Capuano, I. V., Garrett, J.E., Leppert, M.F., 1996. Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcaemia suggest receptor functional domains. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1312–7. doi:10.1210/jcem.81.4.8636323

- Hendy, G.N., D'Souza-Li, L., Yang, B., Canaff, L., Cole, D.E., 2000. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum. Mutat.* 16, 281–96. doi:10.1002/1098-1004(200010)16:4<281::AID-HUMU1>3.0.CO;2-A
- Hirai, H., Nakajima, S., Miyauchi, A., Nishimura, K., Shimizu, N., Shima, M., Michigami, T., Ozono, K., Okada, S., 2001. A novel activating mutation (C129S) in the calcium-sensing receptor gene in a Japanese family with autosomal dominant hypocalcemia. *J. Hum. Genet.* 46, 41–4. doi:10.1007/s100380170124
- Hu, J., Mora, S., Colussi, G., Proverbio, M.C., Jones, K.A., Bolzoni, L., De Ferrari, M.E., Civati, G., Spiegel, A.M., 2002. Autosomal Dominant Hypocalcemia Caused by a Novel Mutation in the Loop 2 Region of the Human Calcium Receptor Extracellular Domain. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1461–1469. doi:10.1359/jbmr.2002.17.8.1461
- Hu, J., Spiegel, A.M., 2003. Naturally occurring mutations of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor: implications for its structure and function. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 282–8.
- Hu, J., Spiegel, A.M., Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 908–22. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00096.x
- Huang, Y., Zhou, Y., Castiblanco, A., Yang, W., Brown, E.M., Yang, J.J., 2009. Multiple Ca(2+)-binding sites in the extracellular domain of the Ca(2+)-sensing receptor corresponding to cooperative Ca(2+) response. *Biochemistry* 48, 388–98. doi:10.1021/bi8014604
- Huang, Y., Zhou, Y., Yang, W., Butters, R., Lee, H.-W., Li, S., Castiblanco, A., Brown, E.M., Yang, J.J., 2007. Identification and Dissection of Ca²⁺-binding Sites in the Extracellular Domain of Ca²⁺-sensing Receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 19000–19010. doi:10.1074/jbc.M701096200
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., Morikawa, K., 2000. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971–7. doi:10.1038/35039564
- Leech, C., Lohse, P., Stanojevic, V., Lechner, A., Göke, B., Spitzweg, C., 2006. Identification of a novel inactivating R465Q mutation of the calcium-sensing receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 996–1002.
- Lienhardt, A., Garabédian, M., Bai, M., 2014. A Large Homozygous or Heterozygous In-Frame Deletion within the Calcium-Sensing Receptor's Carboxylterminal Cytoplasmic Tail That Causes Autosomal Dominant Hypocalcemia 85, 1695–1702.
- Lienhardt, a, Bai, M., Lagarde, J.P., Rigaud, M., Zhang, Z., Jiang, Y., Kottler, M.L., Brown, E.M., Garabédian, M., 2001. Activating mutations of the calcium-sensing receptor: management of hypocalcemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5313–23. doi:10.1210/jcem.86.11.8016
- Lietman, S.A., Tenenbaum-Rakover, Y., Jap, T.S., Yi-Chi, W., De-Ming, Y., Ding, C., Kussiny, N., Levine, M.A., 2009. A Novel Loss-of-Function Mutation, Gln459Arg, of the Calcium-Sensing Receptor Gene Associated with Apparent Autosomal Recessive Inheritance of Familial Hypocalciuric Hypercalcemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 4372–4379. doi:10.1210/jc.2008-2484
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., Shaw, D.E., 2010. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78, 1950–8. doi:10.1002/prot.22711
- Livadariu, E., Auriemma, R.S., Rydlewski, C., Vandeva, S., Hamoir, E., Burlacu, M.C., Mawejia, S., Thonnard, A.S., Betea, D., Vassart, G., Daly, A.F., Beckers, A., 2011. Mutations of calcium-sensing receptor gene: two novel mutations and overview of impact on calcium homeostasis. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 353–358. doi:10.1530/EJE-11-0121
- Marcocci, C., Borsari, S., Pardi, E., Dipollina, G., Giacomelli, T., Pinchera, A., Cetani, F., 2003. Familial Hypocalciuric Hypercalcemia in a Woman with Metastatic Breast Cancer: A Case Report of Mistaken Identity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5132–5136. doi:10.1210/jc.2003-030739
- McGinnis, S., Madden, T.L., 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32, W20-5. doi:10.1093/nar/gkh435

- Minotti, S., Dong, L., Figlewicz, D.A., Durham, H.D., 1998. Glutamate Potentiates the Toxicity of Mutant Cu / Zn-Superoxide Dismutase in Motor Neurons by Postsynaptic Calcium-Dependent Mechanisms 18, 9673–9684.
- Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., Jingami, H., 2007. Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3759–3764. doi:10.1073/pnas.0611577104
- Nakajima, K., Yamazaki, K., Kimura, H., Takano, K., Miyoshi, H., Sato, K., 2009. Novel gain of function mutations of the calcium-sensing receptor in two patients with PTH-deficient hypocalcemia. *Intern. Med.* 48, 1951–6.
- Nakayama, T., Minato, M., Nakagawa, M., Soma, M., Tobe, H., Aoi, N., Kosuge, K., Sato, M., Ozawa, Y., Kanmatsuse, K., Kokubun, S., 2001. A Novel Mutation in Ca²⁺-Sensing Receptor Gene in Familial Hypocalciuric Hypercalcemia. *Endocrine* 15, 277–282. doi:10.1385/ENDO:15:3:277
- Nanjo, K., Nagai, S., Shimizu, C., Tajima, T., Kondo, T., Miyoshi, H., Yoshioka, N., Koike, T., 2010. Identification and functional analysis of novel calcium-sensing receptor gene mutation in familial hypocalciuric hypercalcemia. *Endocr. J.* 57, 787–92.
- Nissen, P.H., Christensen, S.E., Heickendorff, L., Brixen, K., Mosekilde, L., 2007. Molecular genetic analysis of the calcium sensing receptor gene in patients clinically suspected to have familial hypocalciuric hypercalcemia: phenotypic variation and mutation spectrum in a Danish population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4373–9. doi:10.1210/jc.2007-0322
- Nyweide, K., Feldman, K.W., Gunther, D.F., Done, S., Lewis, C., Van Eenwyk, C., 2006. Hypocalciuric hypercalcemia presenting as neonatal rib fractures: a newly described mutation of the calcium-sensing receptor gene. *Pediatr. Emerg. Care* 22, 722–4. doi:10.1097/01.pec.0000238747.19477.d3
- O'Brien, E.S., Wand, A.J., Sharp, K.A., 2016. On the ability of molecular dynamics force fields to recapitulate NMR derived protein side chain order parameters. *Protein Sci.* 25, 1156–1160. doi:10.1002/pro.2922
- Okazaki, R., Chikatsu, N., Nakatsu, M., Takeuchi, Y., Ajima, M., Miki, J., Fujita, T., Arai, M., Totsuka, Y., Tanaka, K., Fukumoto, S., 1999. A Novel Activating Mutation in Calcium-Sensing Receptor Gene Associated with a Family of Autosomal Dominant Hypocalcemia¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 363–366. doi:10.1210/jcem.84.1.5385
- Pearce, S.H., Bai, M., Quinn, S.J., Kifor, O., Brown, E.M., Thakker, R. V., 1996. Functional characterization of calcium-sensing receptor mutations expressed in human embryonic kidney cells. *J. Clin. Invest.* 98, 1860–6. doi:10.1172/JCI118987
- Pearce, S.H., Trump, D., Wooding, C., Besser, G.M., Chew, S.L., Grant, D.B., Heath, D.A., Hughes, I.A., Paterson, C.R., Whyte, M.P., 1995. Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. *J. Clin. Invest.* 96, 2683–92. doi:10.1172/JCI118335
- Pidasheva, S., D'Souza-Li, L., Canaff, L., Cole, D.E.C., Hendy, G.N., 2004. CASRdb: calcium-sensing receptor locus-specific database for mutations causing familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum. Mutat.* 24, 107–11. doi:10.1002/humu.20067
- Pidasheva, S., Grant, M., Canaff, L., Ercan, O., Kumar, U., Hendy, G.N., 2006. Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CASR mutants retained intracellularly. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2200–9. doi:10.1093/hmg/ddl145
- Pollak, M.R., Brown, E.M., Chou, Y.H., Hebert, S.C., Marx, S.J., Steinmann, B., Levi, T., Seidman, C.E., Seidman, J.G., 1993. Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* 75, 1297–303.
- Pollak, M.R., Chou, Y.H., Marx, S.J., Steinmann, B., Cole, D.E., Brandi, M.L., Papapoulos, S.E., Menko, F.H., Hendy, G.N., Brown, E.M., 1994. Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. Effects of mutant gene dosage on phenotype. *J. Clin. Invest.* 93, 1108–12. doi:10.1172/JCI117062
- Reyes-Cruz, G., Hu, J., Goldsmith, P.K., Steinbach, P.J., Spiegel, A.M., 2001. Human Ca(2+) receptor

- extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants. *J. Biol. Chem.* 276, 32145–51. doi:10.1074/jbc.M102977200
- Rus, R., Haag, C., Bumke-Vogt, C., Bähr, V., Mayr, B., Möhlig, M., Schulze, E., Frank-Raue, K., Raue, F., Schöfl, C., 2008. Novel Inactivating Mutations of the Calcium-Sensing Receptor: The Calcimimetic NPS R-568 Improves Signal Transduction of Mutant Receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4797–4803. doi:10.1210/jc.2008-1076
- Sato, K., Hasegawa, Y., Nakae, J., Nanao, K., Takahashi, I., Tajima, T., Shinohara, N., Fujieda, K., 2002. Hydrochlorothiazide Effectively Reduces Urinary Calcium Excretion in Two Japanese Patients with Gain-of-Function Mutations of the Calcium-Sensing Receptor Gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3068–3073. doi:10.1210/jcem.87.7.8639
- Silve, C., Petrel, C., Leroy, C., Bruel, H., Mallet, E., Rognan, D., Ruat, M., 2005. Delineating a Ca²⁺ Binding Pocket within the Venus Flytrap Module of the Human Calcium-sensing Receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 37917–37923. doi:10.1074/jbc.M506263200
- Simonds, W.F., James-Newton, L.A., Agarwal, S.K., Yang, B., Skarulis, M.C., Hendy, G.N., Marx, S.J., 2002. Familial isolated hyperparathyroidism: clinical and genetic characteristics of 36 kindreds. *Medicine (Baltimore)*. 81, 1–26.
- Suzuki, M., Aso, T., Sato, T., Michimata, M., Kazama, I., Saiki, H., Hatano, R., Ejima, Y., Miyama, N., Sato, A., Matsubara, M., 2005. A case of gain-of-function mutation in calcium-sensing receptor: supplemental hydration is required for renal protection. *Clin. Nephrol.* 63, 481–6.
- Töke, J., Czirájk, G., Patócs, A., Enyedi, B., Gergics, P., Csákváry, V., Enyedi, P., Tóth, M., 2007. Neonatal severe hyperparathyroidism associated with a novel de novo heterozygous R551K inactivating mutation and a heterozygous A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 67, 385–392. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02896.x
- Vargas-Poussou, R., Huang, C., Hulin, P., Houillier, P., Jeunemaître, X., Paillard, M., Planelles, G., Déchaux, M., Miller, R.T., Antignac, C., 2002. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2259–66.
- Vigouroux, C., Bourut, C., Guerci, B., Ziegler, O., Magré, J., Capeau, J., Meyer, L., 2000. A new missense mutation in the calcium-sensing receptor in familial benign hypercalcaemia associated with partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 53, 393–8.
- Waller, S., Kurzawinski, T., Spitz, L., Thakker, R., Cranston, T., Pearce, S., Cheetham, T., van't Hoff, W.G., 2004. Neonatal severe hyperparathyroidism: genotype/phenotype correlation and the use of pamidronate as rescue therapy. *Eur. J. Pediatr.* 163, 589–94. doi:10.1007/s00431-004-1491-0
- Ward, B.K., Stuckey, B.G., Gutteridge, D.H., Laing, N.G., Pullan, P.T., Ratajczak, T., 1997. A novel mutation (L174R) in the Ca²⁺-sensing receptor gene associated with familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Hum. Mutat.* 10, 233–5. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:3<233::AID-HUMU9>3.0.CO;2-J
- Warner, J., Epstein, M., Sweet, A., Singh, D., Burgess, J., Stranks, S., Hill, P., Perry-Keene, D., Learoyd, D., Robinson, B., Birdsey, P., Mackenzie, E., Teh, B.T., Prins, J.B., Cardinal, J., 2004. Genetic testing in familial isolated hyperparathyroidism: unexpected results and their implications. *J. Med. Genet.* 41, 155–60.
- Watanabe, S., Fukumoto, S., Chang, H., Takeuchi, Y., Hasegawa, Y., Okazaki, R., Chikatsu, N., Fujita, T., 2002. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet (London, England)* 360, 692–4. doi:10.1016/S0140-6736(02)09842-2
- Zajickova, K., Vrbikova, J., Canaff, L., Pawelek, P.D., Goltzman, D., Hendy, G.N., 2007. Identification and Functional Characterization of a Novel Mutation in the Calcium-Sensing Receptor Gene in Familial Hypocalciuric Hypercalcaemia: Modulation of Clinical Severity by Vitamin D Status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2616–2623. doi:10.1210/jc.2007-0123
- Zhang, Z., Sun, S., Quinn, S.J., Brown, E.M., Bai, M., 2001. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J. Biol. Chem.* 276, 5316–22. doi:10.1074/jbc.M005958200

ABBREVIATIONS

ADH: Autosomal Dominant Hypocalcemia; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool; CASR: Calcium-Sensing Receptor; CBS: Calcium Binding Sites; CD: Crown Domain; ECD : ExtraCellular Domain; EDD: Extended Dimerization Domain; FHH: Familial Hypocalciuric Hypercalcemia; GABAB: Gamma-AminoButyric Acid B receptor; GPCR: G-Coupled-Protein-Receptor ; ICD: Intracellular Domain; ID: Internal Domain; MAD: Membrane Anchor Domain; MD: Molecular Dynamic; mGluRI: type 1 metabotropic Glutamate Receptor; NCD: Nine Cystein-Domain; NSHPT: Neonatal Severe HyperParaThyroidism; RMSD: Root Mean Square Deviation; T1R: Taste Receptor; TMD: Transmembrane Domain.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Three-dimensional structure of modeled CASR highlighting (a) the membrane anchors, (b) the extended dimerization domain and (c) the crown domain.

Figure 2. Monomer of the CASR ExtraCellular Domain (ECD) illustrating the five Calcium-Binding Sites (CBS)

Figure 3. Location of (a) inhibiting and (b) activating mutations on modeled CASR-ECD. The mutations are distributed into different domains: Extended Dimerization Domain (EDD, purple), Membrane Anchor Domain (MAD, blue), internal zone (green), Calcium-Binding Site (CBS, red), Crown-Domain (CD, orange) and domains with no identified function (yellow).

Figure 4. Extracellular calcium-evoked increases in MAPK activity in Cos cells transiently transfected with a MAPK *trans*-reporting system and wild-type (WT) or p.Cys131Arg mutant (C131R) CASR cDNAs. Values reported are means \pm SEM of four experiments. All responses are normalized to the maximum response obtained with wild-type human CASR.

Figure 5. : Structure of the crown domain in 4 models of disulfide bridges involving C129 and C131

TABLE LEGENDS

Table 1. Details of 99 CASR mutations identified in patients with FHH (or NSHPT: mutations in bold) or with ADH.

Table 2. Description of CASR domains and related location of mutations. In bold, mutations detected in NSHPT patients.

Figure 1

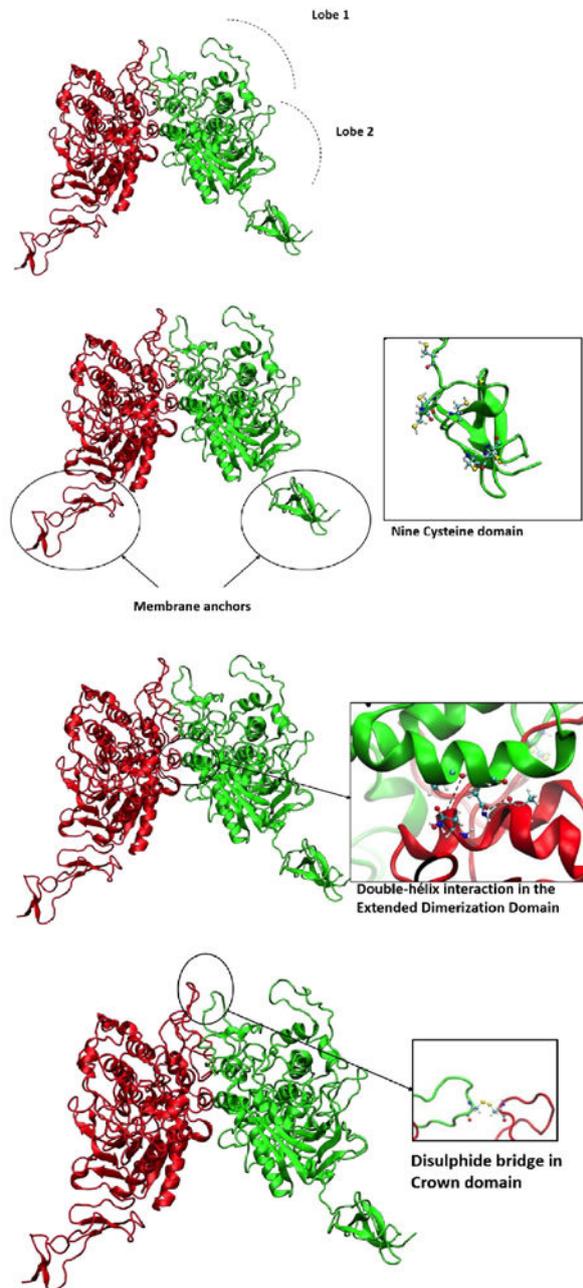


Figure 2

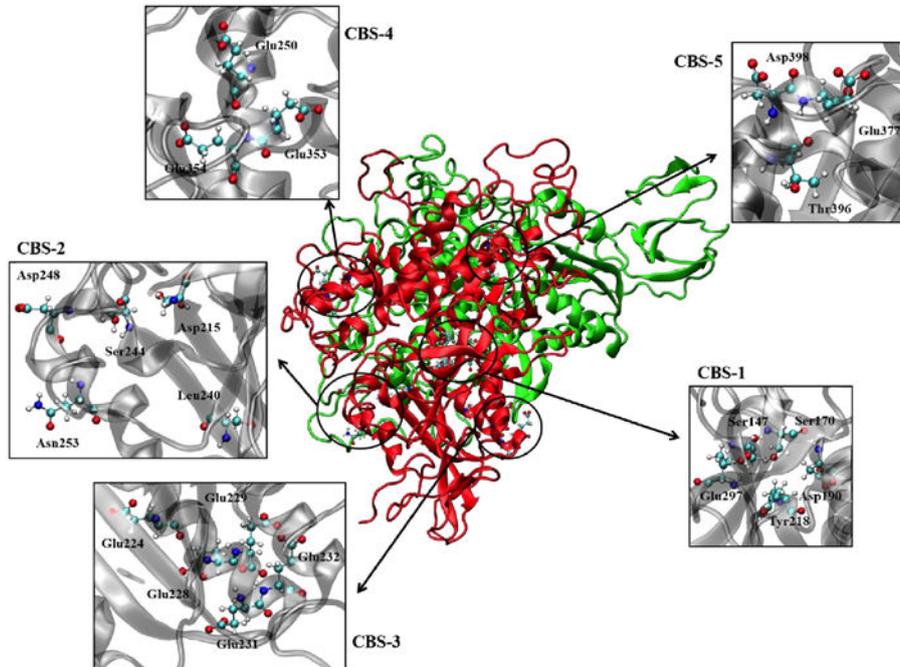


Figure 3

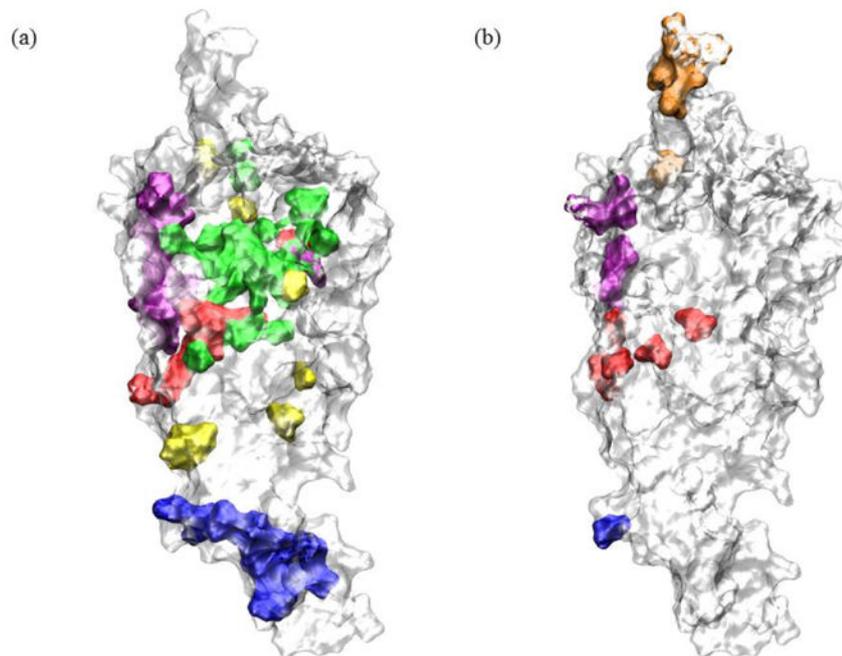


Figure 4

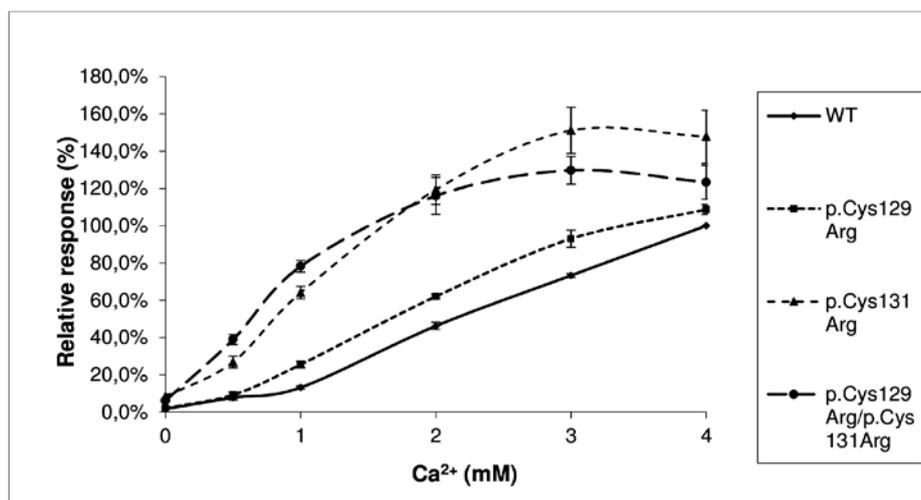


Figure 5

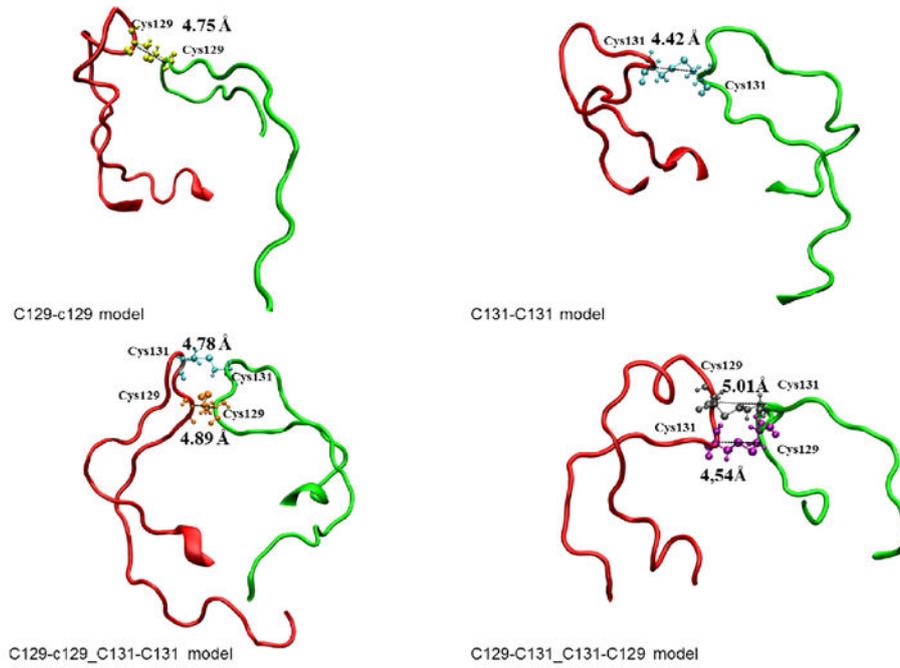


Table 1

Disorder	Mutation	Features	Age at diagnosis	References
FHH	Q27R	Also observed in NSHPT	14 years for NSHPT	(Chikatsu et al., 1999)
	P39A	Also observed in NSHPT	7 months for NSHPT	(Aida et al., 1995)
	I40F	Recurrent nephrolithiasis	45 years	(Vargas-Poussou et al., 2002)
	F42S	-	-	(Cole et al., 2009)
	S53P	-	-	(Minotti et al., 1998)
	P55L	-	-	(Pearce et al., 1995)
	C60F	Also observed in NSHPT	Birth (compound heterozygote)	(Waller et al., 2004)
	R62M	Also observed in NSHPT	Birth for NSHPT	(Chou et al., 1995)
	R66C	-	-	(Chou et al., 1995)
	R66H	Also observed in NSHPT	Birth for NSHPT	(Pidacheva et al., 2006)
	R69H	Also observed in NSHPT	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
	I81M	-	-	(Cole et al., 2009)
	T100I	Pancreatitis	45 years	(Warner et al., 2004)
	S137P	-	-	(Pollak et al., 1993)
	T138M	-	-	(Pollak et al., 1993)
	G143E	-	-	(Pollak et al., 1993)
	G143R	-	-	(Vargas-Poussou et al., 2002)
	G158E	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
	G158R	-	-	(Cole et al., 2009)
	L159P	Nephrolithiasis	21 years	(Simonds et al., 2002)
	Y161C	Also observed in NSHPT	-	(Simonds et al., 2002)
	S166G	-	-	(Cole et al., 2009)
	S171N	-	-	(Nissen et al., 2007)
	L173P	Pancreatitis	27 years	(Felderbauer et al., 2005)
	L174R	-	-	(Ward et al., 1997)
	N178D	-	-	(Pearce et al., 1996)
	F180C	-	34 years	(Zajickova et al., 2007)

R185Q	Also observed in NSHPT	-	(Bai et al., 1997)
D190G	-	33 years	(Nanjo et al., 2010)
W208C	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
W208S	Respiratory defects	-	(Demedts et al., 2008)
I212T	Metastatic breast cancer	45 years	(Marcocci et al., 2003)
D215G	-	-	(Heath et al., 1996)
Y218C	Graves' disease	38 years	(Cetani et al., 2003)
Y218H	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
Y218S	-	-	(Pearce et al., 1995)
R220P	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
R220Q	-	-	(Pearce et al., 1996)
R220W	Also observed in NSHPT	-	(Hendy et al., 2000)
P221Q	-	-	(Nissen et al., 2007)
P221S	-	-	(Pearce et al., 1995)
K225T	-	-	(Nissen et al., 2007)
R227L	Also observed in NSHPT	-	(Pearce et al., 1995)
R227Q	-	-	(Chou et al., 1995)
C236G	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
S271F	-	-	(Nissen et al., 2007)
E297K	Also observed in NSHPT	-	(Pollak et al., 1993)
A321P	Insulinoma	64 years	(Fadil M Hannan et al., 2012)
P339T	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
C395R	Severe insulin-resistant diabetes	54 and 16 years	(Vigouroux et al., 2000)
G397R	-	-	(Nissen et al., 2007)
A423K	Abdominal pain	16 years	(Livadariu et al., 2011)
Q459R	Abdominal pain (homozygous patient)	2 years	(Lietman et al., 2009)
L461P	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
R465Q	-	52 years	(Leech et al., 2006)
R465W	-	-	(Guarnieri et al., 2010)
G509R	-	-	(Nissen et al.,

				2007)
	W530G	-	-	(Rus et al., 2008)
	G549R	-	-	(Hendy et al., 2000)
	T550I	Musculoskeletal pain	34 years	(Al-Salameh et al., 2011)
	R551K	Also observed in NSHPT	Birth for NSHPT	(Töke et al., 2007)
	G553R	-	-	(Nissen et al., 2007)
	I555V	-	-	(Nissen et al., 2007)
	G557E	-	Birth	(Nakayama et al., 2001)
	C562Y	Easy fatigue, constipation	45 years	(Burski et al., 2002)
	C565G	-	-	(Cole et al., 2009)
	C568Y	-	-	(Rus et al., 2008)
	Y573C	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
	C582F	-	-	(Nissen et al., 2007)
	C582Y	Also observed in NSHPT	-	(Pearce et al., 1995)
	S591C	Also observed in NSHPT	Birth for NSHPT	(Nyweide et al., 2006)
	H595Y	-	30 years	(Cetani et al., 2009)
ADH	K29E	Type 5 Bartter syndrome	Birth	(Fadil M Hannan et al., 2012)
	K47N	Nephrolithiasis	41 years	(Okazaki et al., 1999)
	V104I	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
	A116T	Muscle cramps	Adolescence	(Baron et al., 1996)
	N118K	Hypocalcemic seizures	7 months	(De Luca et al., 1997)
	N124K	Generalized nocturnal seizures	42 years	(Hu et al., 2002)
	L125F	-	-	(Cole et al., 2009)
	L125P	Generalized tonic seizures	Birth	(Sato et al., 2002)
	E127A	Very mild	-	(Pollak et al., 1993)
	E127K	Severe hypocalcemic symptoms	Birth	(Lienhardt et al., 2014)
	F128L	-	-	(Pearce et al., 1996)
	C129F	-	adult	(Lienhardt et al., 2001)
	C129R	-	-	(Cole et al., 2009)
	C129S	Convulsions	7 months	(Hirai et al., 2001)

C131F	Tonic seizures	1 month	(Suzuki et al., 2005)
C131W	Tetany	Birth	(Watanabe et al., 2002)
T151M	Fatigue, paresthesia, muscular cramps	Childhood	(Fadil M Hannan et al., 2012)
L173F	-	-	(Fadil M Hannan et al., 2012)
E191K	-	-	(Pearce et al., 1996)
P221L	Seizures (baby) / tetany (mother)	Birth + adult	(Chikatsu et al., 2003)
E228G	Hand tremor	Adult (54 years)	(Nakajima et al., 2009)
E228K	-	-	(Cole et al., 2009)
E228Q	Nephrolithiasis	Childhood + Adolescent	(Conley et al., 2000)
E241K	Convulsions	Childhood (7 years)	(F. M. Hannan et al., 2012)
Q245R	Hypocalcemic seizures	Birth + Childhood	(Conley et al., 2000)
E297D	Severe hypocalcemic symptoms	Birth	(Silve et al., 2005)
E556K	Epileptic seizures	Adult (54 years)	(Livadariu et al., 2011)

Table 2

Zone	Location	Secondary Structures	Mutations		
			<i>Inhibiting</i>	<i>Activating</i>	
MAD	542-612	<i>β-sheets</i>	549, 550, 551 , 553, 555, 557, 562, 565, 568, 573, 582 , 591 , 595	556	
Extended Dimerization Domain	-	-	27 , 39 , 40, 158, 159, 161 , 173 ^a , 174, 178, 180, 215, 220	29, 47, 104, 116, 151, 173 ^a , 245	
Crown Domain	117-136	<i>Flexible loop</i>	-	118, 124, 125, 127, 128, 129, 131	
Calcium Binding Sites	CBS-1	147, 170, 190, 218, 297	-	190, 218, 297 ^a	191, 297 ^a
	CBS-2	215, 240, 244, 248, 253	-	-	241 ^b
	CBS-3	224, 228, 229, 231, 232	-	221 ^{a,b} , 225 ^b , 227 ^b	221 ^{a,b} , 228
	CBS-4	350, 353, 354	-	-	-
	CBS-5	378, 379, 396	-	395 ^b , 397 ^b	-
Internal Domain	-	<i>7 α-helices and 3 β-sheets</i>	42, 53, 55, 62 , 66 , 69 , 81, 100, 137, 138, 143, 166, 171, 185 , 212, 271, 321, 339, 423, 459, 461, 465	-	
Non specific domain	-	-	60 , 208, 236, 509, 530	-	

^a Site of both inhibiting and activating mutations

^b Mutation expected to modify the nearby CBS.

Discussion concernant l'article 4

Peu de temps avant de soumettre cet article, une étude cristallographique du domaine extracellulaire de CasR est parue (Geng *et al.*, 2016).

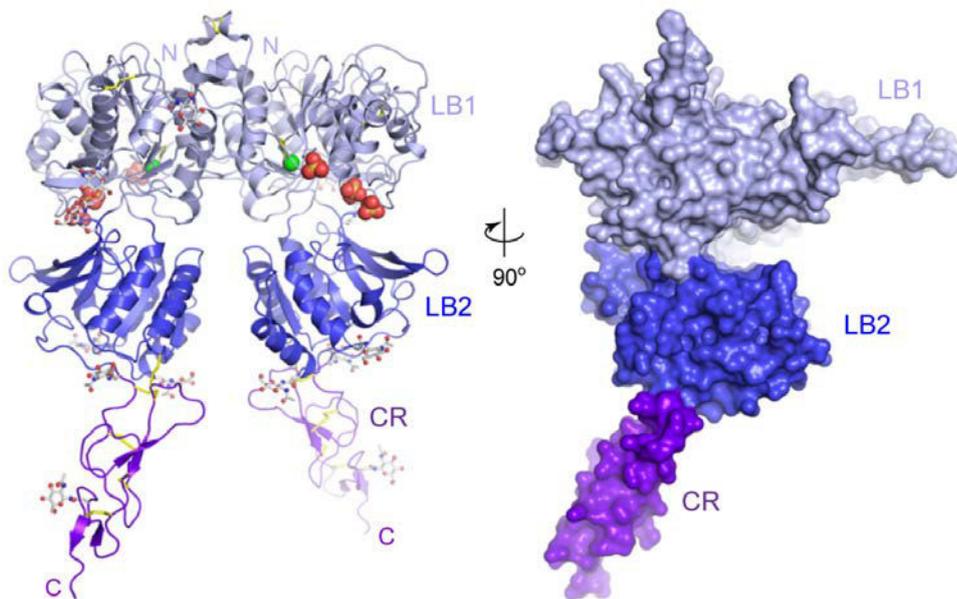


Figure 38 : Structure cristallographique du domaine extracellulaire de CasR humaine

La structure tridimensionnelle issue de nos modélisations est très proche de celle obtenue par cristallographie. Les auteurs ont identifié des domaines protéiques similaires à ceux que nous avons identifiés, à l'exception du « crown domain », qui nous semble cependant être un domaine très important. Nous allons donc orienter notre travail en ce sens afin de comparer nos résultats et ceux obtenus par Geng et ses collaborateurs. Nos résultats expérimentaux et notre cartographie des mutations sont novateurs et permettent de compléter les connaissances sur l'activation de CasR.

Une fois ce travail effectué, nous avons souhaité effectuer la même procédure pour la protéine PMP22. Cependant, une étude sur la structure utilisant cette même méthode est parue (Mittendorf *et al.*, 2014b). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé la même méthode que nous avons employée lors de notre travail sur CasR. Tout d'abord, ils ont utilisé une protéine présentant une forte homologie avec PMP22 : la claudine 15 murine (Figure 39).

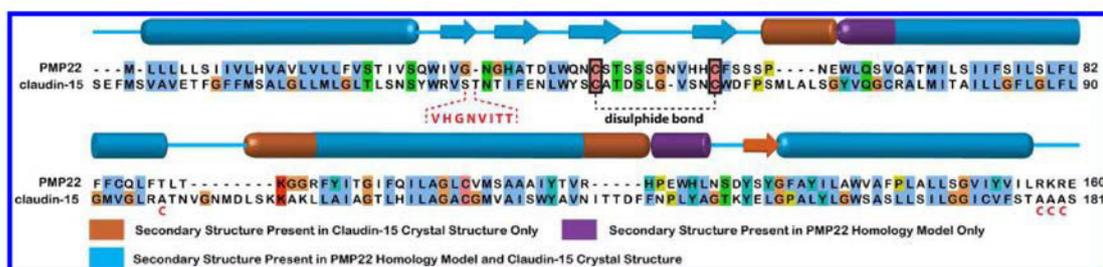


Figure 39 : Alignement final de PMP22 humaine avec la claudine 15 murine utilisée pour l'homologie modèle.

Grâce à la technique de dynamique moléculaire, les auteurs ont été capables de fournir une structure tridimensionnelle de la protéine PMP22.

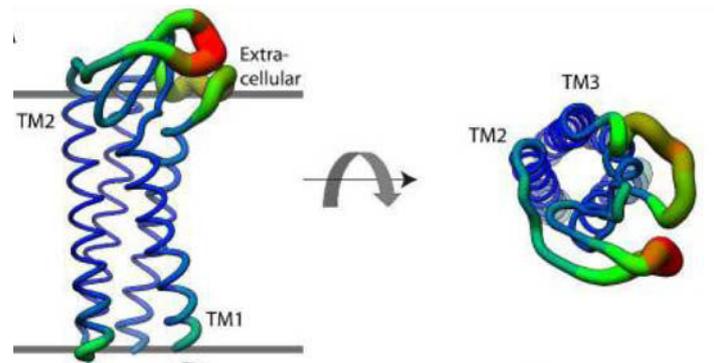


Figure 40 : Structure tridimensionnelle de la protéine PMP22 (Mittendorf et al., 2014a)

Cette étude représente une avancée notable sur l'étude de PMP22. Elle fournit le premier modèle de PMP22 en haute résolution, et qui plus est, fiable. De nombreuses études découleront de ce modèle.

Discussion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons cherché à approfondir le rôle de la protéine PMP22, et son implication dans les diverses neuropathies dont elle est responsable.

Il est possible d'étudier une protéine et son rôle grâce à plusieurs méthodes et plusieurs supports. Les échantillons provenant des prélèvements de patients sont une source précieuse d'informations dans la compréhension d'une maladie. Il est aussi possible d'utiliser des animaux modèles. On attend de ces animaux qu'ils « copient » de la manière la plus fiable possible la maladie qu'ils reproduisent. Il est aussi possible de créer des modèles cellulaires. En effet, les techniques permettant la création de modèles cellulaires ont énormément progressé ces dernières années et ouvrent la porte à de nombreuses perspectives. Enfin, il est possible d'utiliser des outils de modélisation et d'étude informatiques. Chacun de ces supports possède ses avantages et ses inconvénients.

Durant mon travail, j'ai eu accès à des échantillons de patients, des modèles animaux, ainsi qu'à des méthodes de modélisation moléculaire.

Chapitre 1. Etude de PMP22 et des intégrines sur un modèle animal

1.1. Le modèle de rats CMT1A

Il s'agit d'un modèle généré chez le rat (M Sereda *et al.*, 1996). Comme décrit précédemment, les animaux hétérozygotes portent 3 transgènes supplémentaires de *PMP22* de souris, les animaux homozygotes en portent 6. Le choix d'utilisation du rat comme animal modèle pour étudier les neuropathies périphériques n'est pas anodin. Le rat, la souris et l'homme partagent 90 % de gènes en commun. Mais l'utilisation du rat pour l'étude du système nerveux périphérique nous semble plus avantageux que la souris : 1) la taille de l'animal présente un avantage net dans l'étude du nerf (nerf sciatique plus large et plus long), 2) les tests comportementaux (ex : test de la poutre) sont aisément réalisables.

De plus, en 2012, une étude a été publiée, confortant l'idée que ces animaux étaient de très bons modèles du CMT1A humain (Fledrich, Schlotter-Weigel, Tuuli J Schnizer, *et al.*, 2012). Comme décrit dans l'article 3, les auteurs ont montré que le phénotype des animaux copiait celui des patients CMT1A et que le niveau d'expression de marqueurs de la maladie, tels que des facteurs de croissance (par exemple, GdnF), des gènes de protéines du cytosquelette (par exemple, Nefl), des gènes impliqués dans l'inflammation (par exemple, Cxcl12) ... sur des échantillons de nerf et de biopsies de peau, étaient similaires chez l'humain et chez le rat CMT1A. Ces résultats vont dans le sens que ces animaux modèles représentent un bon outil pour l'étude de la CMT1A. Par ailleurs, les animaux présentent une source de matériel permettant l'étude de la maladie. Au cours de notre travail, nous avons utilisé des nerfs sciatiques de rats qui présentent l'avantage d'être des nerfs transportant à la fois de l'information sensitive et motrice. Ces échantillons de nerfs seraient difficiles à obtenir sur l'humain. En effet, les biopsies nerveuses ne sont plus faites de manière routinière sur les patients CMT1A, mais seulement lorsque la maladie est trop difficile à identifier et qu'une biopsie est le dernier recours. Et même dans ces conditions, divers obstacles sont présents : consentement du patient, quantité de matériel, séquelles... De plus, l'étude sur un organisme entier et en vie présente aussi un atout évident. C'est pourquoi l'utilisation de ces animaux modèles représente une nécessité dans l'étude de cette neuropathie.

Cependant, sans pour autant remettre en cause un tel modèle, comment peut-on expliquer qu'il faille au moins 3 copies supplémentaire de *PMP22* pour reproduire le CMT1A humain quand une seule copie supplémentaire de *PMP22* suffit à provoquer un CMT1A chez l'homme ? A notre connaissance, il n'existe pas de modèle du CMT1A avec une seule copie supplémentaire de *PMP22*. Mais un tel

modèle ne présenterait peut-être pas de symptômes. En effet, les rats CMT1A hétérozygotes jeunes adultes (3-5 mois) sont souvent asymptomatiques et souvent, en vieillissant, leurs symptômes sont assez légers avec une faible perte de force et de sensibilité des membres (Fledrich, Schlotter-Weigel, Tuuli J. Schnizer, *et al.*, 2012; M Sereda *et al.*, 1996) ; alors que chez les patients CMT1A, une seule copie de *PMP22* supplémentaire peut induire de très graves handicaps pouvant conduire le patient à utiliser un fauteuil roulant. Une des explications pourrait provenir du phénomène de dispersion du signal : chez l'homme, les symptômes commencent aux extrémités des membres, l'atteinte semble donc « longueur dépendante ». Or, la longueur des nerfs humains est bien plus grande que celle des nerfs de rats (2-3 centimètres contre plus d'1 mètre chez l'homme).

Aussi, les rats CMT1A hétérozygotes présentent généralement peu, voire pas de symptômes durant leurs 4 premiers mois de vie, alors que les rats homozygotes ont un taux de survie supérieur à l'âge de 2 mois très faible. Comment expliquer que la présence de 5 copies de *PMP22* soit presque asymptomatique et 8 soient létales dans la majorité des cas ? En effet, durant notre étude nous avons rencontré de très fortes difficultés à faire grandir des rats homozygotes.

1.2. La difficulté d'obtenir des animaux homozygotes

Au cours de notre étude, nous avons cherché à étudier l'effet de différentes concentrations géniques de *PMP22*. Pour ce faire, nous avons croisé des mâles hétérozygotes adultes avec des femelles hétérozygotes adultes. Selon (M Sereda *et al.*, 1996), les répartitions suivaient les proportions mendéliennes. Cependant, au cours de ces 3 ans d'étude, nous avons pu remarquer que ce n'était pas réellement le cas pour les animaux homozygotes, qui étaient bien plus rares que prévus au sein des portées. Au lieu d'un rapport de 50 % d'individus hétérozygotes, 25 % d'individus homozygotes mutés et 25 % d'individus normaux, nous constatons plutôt un rapport de 70 % d'individus hétérozygotes et 30 % d'individus normaux, suggérant une mortalité in-utero de la majorité des fœtus homozygotes mutés (Figure 41). Il est possible que *PMP22* atteigne une dose toxique entraînant la dégénérescence des cellules de Schwann, et donc la mort du fœtus. Chez l'homme, il a déjà été présenté des cas de patients homozygotes avec la duplication de la zone 17q11.2 (LeGuern *et al.*, 1997). Les patients présentaient globalement les mêmes symptômes que les patients hétérozygotes. Cependant, les patients homozygotes présentent aussi une forte variabilité des symptômes. La sur-expression de *PMP22* avec 4 copies de *PMP22* ne semble pas létale in utero.

N° de portée	Individus normaux	Individus hétérozygotes	Individus Homozygote	Note
1	2	8	0	
2	2	5	0	
3	3	7	1	Homozygote mort après 3 semaines
4	3	7	0	
5	3	3	1	
6	2	4	1	Prélevé à 1,5 mois
7	1	6	0	
8	3	3	1	Prélevé a 7 mois
9	2	6	0	
10	2	5	1	Mort après 2 semaines
11	3	4	0	
12	2	5	2	Morts après 3 semaines
13	3	5	0	
14	2	2	0	
Totaux	33	70	7	Total : 110

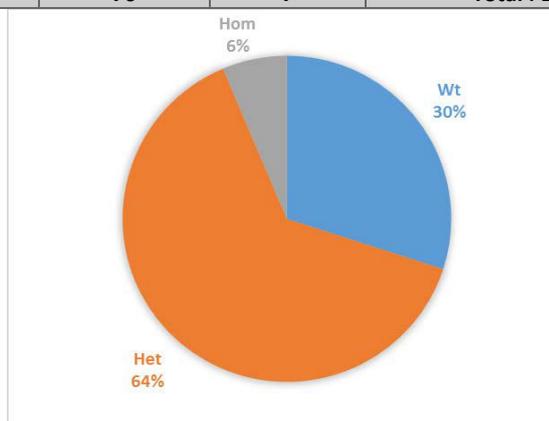


Figure 41 : Pourcentage d'individus normaux, hétérozygotes et homozygotes en 14 croisements de 2 rats hétérozygotes (Hom : homozygotes ; Het : hétérozygotes ; Wt : sauvages)

Par ailleurs, dès la naissance, les ratons homozygotes apparaissent comme les avortons de la portée. En quelques jours, ils étaient identifiables : ils étaient plus maigres et complètement paralysés du tronc arrière (Figure 42). Tous ces phénotypes allaient en progressant jusqu'à des animaux convulsant en cas de stress, ils présentaient aussi une hypersensibilité les rendant très difficiles à manipuler. Peu d'entre eux réussissaient à dépasser les 3 semaines de survie : nombre d'entre eux mourraient d'eux-mêmes, passé cette date, ou bien étaient tués par leurs congénères. La mort des jeunes ratons est probablement due à une extrême faiblesse et une hypersensibilité due à l'absence de gaine de myéline autour des axones.



Figure 42 : Photo de 3 ratons de la même portée, tous 3 âgés de 3 mois.

Un seul raton a pu atteindre l'âge de 7,5 mois, c'est pourquoi nous manquons de reproductibilité concernant les rats homozygotes. Cependant, les résultats obtenus sur ces animaux ne font que confirmer les résultats obtenus chez les rats hétérozygotes mais avec un effet d'accentuation.

1.3. Interaction de PMP22 avec les intégrines

1.3.1. Des différences d'expressions géniques et protéiques entre les rats normaux, hétérozygotes et homozygotes

Comme stipulé précédemment, nous avons cherché à étudier l'effet d'une duplication de *PMP22* sur l'expression des intégrines. Pour éviter différents biais, nous avons utilisé des rats d'une même portée, et donc du même âge. 3 d'entre eux étaient normaux, 3 d'entre eux étaient hétérozygotes (5 copies de *PMP22*) et 1 seul d'entre eux était homozygote (8 copies de *PMP22*). Tous étaient âgés de 7,5 mois lors de leurs sacrifices et des différents prélèvements.

Que ce soit par les études de qRT-PCR, de Western-Blot et d'immunohistochimie, nous avons observé des différences notables d'expression entre les individus normaux, hétérozygotes et homozygotes. Par ailleurs, même au sein du groupe hétérozygote, nous avons pu observer une assez forte variabilité d'expression entre les individus. Néanmoins, une tendance générale a été observée. Bien entendu, de faibles variations peuvent être « manipulateur-dépendant ». Afin de diminuer ce biais, les qRT-PCR ont été réalisées 3 fois consécutives, et comme le montrent les écarts types, les résultats sont assez constants (voir article 1). On observe aussi l'intérêt d'avoir plusieurs animaux témoins normaux permettant de s'assurer d'une constance dans les résultats. Par ailleurs, la variabilité des résultats obtenus entre les animaux du groupe hétérozygote a déjà été mise en évidence lors du test comportemental de la poutre (Figure 43). Cette forte variabilité des phénotypes a été observée chez les patients CMT1A et chez les rats (Fledrich, Schlotter-Weigel, Tuuli J. Schnizer, *et al.*, 2012).

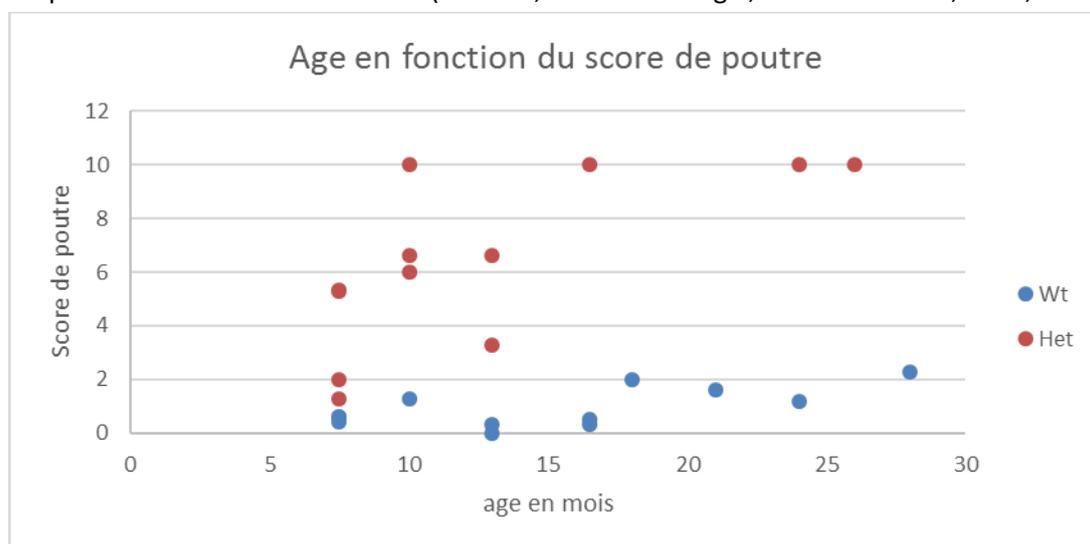


Figure 43 : graphique représentant la réussite des rats au test de la poutre en fonction de leur âge

Un score de 0 présente un animal capable de réaliser le test sans erreur, et 10 présente un animal incapable de réaliser le test. En bleu, les animaux normaux sont tous capable d'effectuer le test, quel que soit leur âge. En rouge les animaux hétérozygotes qui, en vieillissant, présentent de plus en plus de difficultés à réussir le test. Cependant, même pour des individus du même âge, une très forte variabilité de réussite est visible, à 10 mois par exemple, un rat a été incapable de réaliser le test alors qu'un autre a réussi avec quelques légères erreurs.

Nous n'avons pas pu strictement corrélérer les scores d'atteinte avec les expressions des intégrines et les expressions de *PMP22*. Ceci peut avoir plusieurs causes : premièrement, le nombre d'individus

pour une telle corrélation doit être plus important. En effet, les scores de test de poutre sont dépendants de nombreux paramètres, dont l'expérimentateur, le caractère de l'animal, et sa santé. Le biais que ces paramètres induisent peut être diminué en augmentant fortement le nombre d'individus. Aussi, la sur-expression de PMP22 entraîne sûrement des mécanismes compensatoires, comme nous le laisse penser les études de transcriptomique des intégrines et de PMP22. Ces mécanismes compensatoires varient probablement entre les individus. La cause de la génétique étant la même, il est imaginable que les mécanismes de compensation issus de grandes cascades de signalisation n'aient pas le même effet entre les individus. Cette vérification pourra se faire par l'étude de la transcriptomique des différents facteurs de transcription des gènes de PMP22 et des intégrines.

Cependant, d'un point de vue pathologique, l'atteinte du nerf est bien corrélée au score des tests comportementaux. Un animal avec un mauvais score de poutre présente une myélinisation significativement plus faible. Ces différences sont d'autant plus visibles sur les axones de larges diamètres (Figure 44).

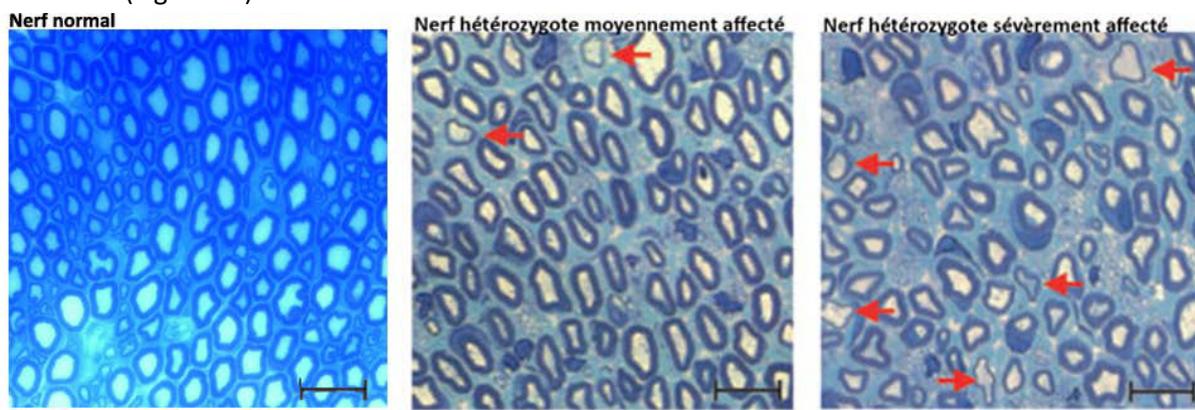


Figure 44 : coupe semi fine de nerfs de rats hétérozygotes moyennement et sévèrement affectés.

Les flèches rouges montrent des axones qui sont anormalement sous myélinisés.

Les différences observées entre les animaux normaux et les animaux hétérozygotes sont significatives, et dues à la sur-expression de PMP22, mais peut-on en dire autant pour les nerfs de rats homozygotes ? Comme nous pouvons le voir sur les images en microscopie électronique ainsi que sur les images d'immunohistochimie, les nerfs des animaux homozygotes sont extrêmement désorganisés. Les variations d'expression des différentes protéines sont-elles dues à une sur-expression de PMP22 ou à une désorganisation trop importante du tissu ? Concernant les animaux homozygotes, il serait nécessaire d'augmenter leur nombre pour conclure statistiquement sur nos résultats, mais malgré nos efforts, cela n'a pas été possible.

1.3.2. PMP22 interagit directement avec $\alpha 6$?

Lors de notre étude présentant l'effet de la sur-expression de PMP22 sur l'expression des intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 6\beta 1$, nous avons émis l'hypothèse que PMP22 surexprimée n'est plus correctement exprimée à la membrane des cellules de Schwann myélinisantes, mais est aussi en très forte concentration au sein du cytoplasme Schwannien. Notre hypothèse est que cette sur-expression de PMP22 permet une séquestration de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ au sein du cytoplasme Schwannien. Cette expression anormale du complexe $\alpha 6\beta 4$ au sein du cytoplasme diminuerait le nombre d'interactions entre les complexes $\alpha 6\beta 4$ et les laminines, diminuant ainsi la transduction du signal induite par la queue cytoplasmique de $\beta 4$.

La capacité d'interaction de PMP22 avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ a déjà été mise en évidence (Amici *et al.*, 2006). Par ailleurs, nous avons montré une colocalisation de PMP22 avec ce complexe dans le nerf normal. Nous avons aussi identifié une colocalisation de PMP22 avec $\alpha 6 \beta 4$ dans les nerfs hétérozygotes et homozygotes. Cependant, peut-on parler d'interaction directe de PMP22 avec ces protéines chez ces animaux ? Pour cela, nous devons passer par des techniques différentes, telles que la co-immunoprécipitation, qui n'est pas non plus idéale car elle ne permet pas de confirmer une interaction directe entre deux protéines mais permet plutôt de confirmer la présence de protéines dans un complexe. Le FRET pourrait aussi être une alternative intéressante mais la complexité de la technique fait qu'elle est parfois difficile à mettre en œuvre.

1.3.3. PMP22 agit-elle sur l'expression d'autres intégrines ?

Au cours de nos études, nous avons mis l'accent sur l'effet d'une duplication de *PMP22* sur certaines intégrines, à savoir les complexes $\alpha 6 \beta 4$ et $\alpha 6 \beta 1$. Cependant, d'autres intégrines sont exprimées au sein du nerf, notamment lors des mécanismes de réparation du nerf et de croissance axonale (Figure 45).

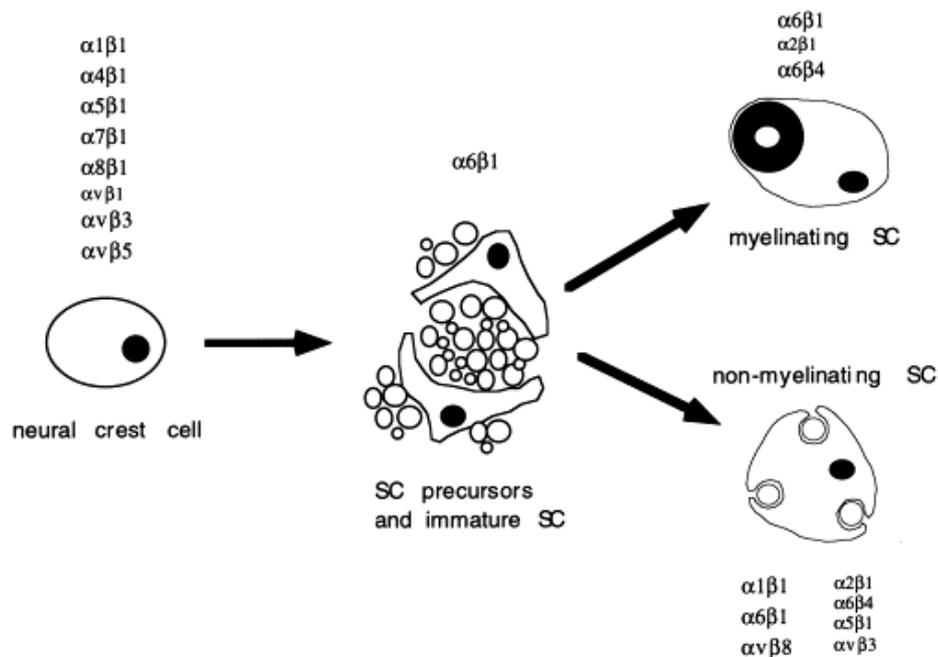


Figure 45 : intégrines connues pour être exprimée dans le SNP.

Nous nous sommes intéressés à la sous-unité d'intégrine $\beta 1$ en partant du principe qu'elle s'associerait avec $\alpha 6$ pour former le complexe $\alpha 6 \beta 1$. Cependant, $\beta 1$ peut se lier avec de nombreuses sous-unités α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\alpha \nu$) (Previtali *et al.*, 2001). Un des candidats les plus intéressants est $\alpha 7 \beta 1$, ce complexe est exprimé en même temps qu' $\alpha 6 \beta 1$ et tous deux sont nécessaires pour le tri axonal permettant l'orientation des cellules de Schwann en cellules myélinisantes ou non. Par ailleurs, $\alpha 7 \beta 1$ était capable de compenser l'absence de $\alpha 6 \beta 4$ (Nodari *et al.*, 2008) ce mécanisme compensatoire devra être vérifié sur les nerfs de nos animaux en ajoutant l'étude du gène *ITGB7* et de la sous-unité d'intégrine $\alpha 7$ pour lequel il code. Une telle compensation pourrait aussi expliquer la myélinisation presque normale des animaux hétérozygotes. Au niveau de l'expression génique, en cas de suppression de l'expression génique de *ITGB4* (par de shRNA) sur des cellules du cancer de la prostate, des changements d'expression d'autres sous-unité d'intégrine telles que *ITGB1* ont été observés (Knyazev *et al.*, 2015) (Figure 46).

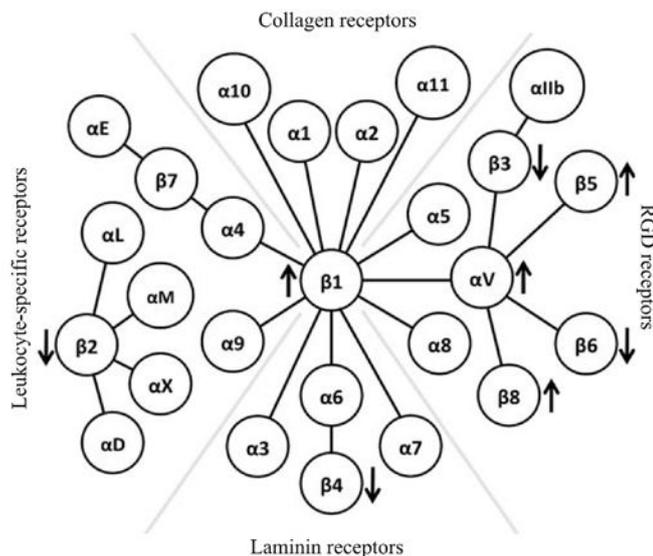


Figure 46 : Classification fonctionnelle des intégrines et changements d'expression génique observés dans la famille des intégrines en condition de suppression du gène *ITGB4* codant la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ (Knyazev et al., 2015).

L'expression génique d'autres intégrines vient compenser l'inactivation d'*ITGB4* par des shRNA. Les auteurs ont constaté une augmentation significative de l'expression d'*ITGB1*, mais aussi des variations d'expression de récepteurs autre que les laminines (des récepteurs spécifiques aux leucocytes et des récepteurs RGD).

Sur nos animaux *CMT1A*, il serait intéressant de constater ces mécanismes de compensations géniques sur *ITGB1*. Parmi les sous-unités d'intégrines qui varient dans l'étude de Knyazev et ses collaborateurs certaines sont exprimées dans les cellules de Schwann ($\beta 3$, $\beta 8$, $\alpha 5$) : les expressions géniques et protéiques de ses devront être étudiée dans le futur afin de constater d'autre désordres dans la signalisation des intégrines.

Les intégrines sous-forme de complexes agissent comme des récepteurs, $\alpha 6\beta 4$ ainsi que $\alpha 6\beta 1$, et sont capables de fixer les laminines (composants de la matrice extracellulaire). Il serait intéressant de constater l'effet de la sur-expression de la protéine *PMP22* sur les composants de la matrice extracellulaire tels que les laminines spécifiques de $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 6\beta 1$: les laminines 332 et 511/521 (Nishiuchi *et al.*, 2006). En effet, nos études en microscopie électronique des nerfs de rats *CMT1A* hétérozygotes et homozygotes ont montré des altérations de la lame basale : une prolifération, des décollements et des interruptions. La lame basale est produite par les cellules de Schwann, nous laissant imaginer qu'une altération de ses récepteurs pourrait entraîner une altération des niveaux de ses constituants et une altération de sa structure. Des études transcriptomiques des gènes des laminines de la lame basale nous permettrait de confirmer cette hypothèse.

1.3.4. La sur-expression de *PMP22* active-t-elle des facteurs de transcription ?

Grâce à la qRT-PCR, nous avons mis en évidence une activation de l'expression du gène *PMP22*. L'étude des facteurs de transcription de *PMP22* apporterait de nombreuses informations, à savoir, quelle voie de signalisation est impliquée dans les mécanismes de compensation en réponse à la duplication de *PMP22*. Plusieurs facteurs de transcription de *PMP22* sont désormais connus. Sox 10 (SRY sex determining region Y-box 10) et *EGR2/Krox 20* (Early growth response protein 2) ont la capacité de fixer des activateurs distaux présents en amont de *PMP22* (Britsch *et al.*, 2001; Topilko *et*

al., 1994). D'autres facteurs de transcription de *PMP22* ont été mis en évidence plus récemment (Lopez-Anido *et al.*, 2016) : Tead1 et deux co-activateurs Yap et Taz activeraient de préférence le promoteur 1 de *PMP22*, connu pour être fortement activé durant la myélinisation (Lopez-Anido *et al.*, 2016; Poitelon *et al.*, 2016). YAP et TAZ contrôlent également l'expression des récepteurs des laminines : à savoir les sous-unité $\alpha 6$, $\beta 4$, $\beta 1$ et $\alpha 7$. En effet, les niveaux de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ sont réduits dans les nerfs avec une inactivation de Taz et avec une inactivation hétérozygote de l'expression de Yap. La diminution des niveaux d' $\alpha 6$ entraîne une absence de la sous-unité $\beta 4$ qui, d'après les auteurs, est due à l'absence de son seul et unique partenaire d'interaction. Tead1 quant à lui, peut fixer un site activateur de *ITGA6* et est donc un facteur de transcription d'*ITGA6*. Toutes ces informations nous procurent des pistes intéressantes pour de nouvelles investigations sur nos rats CMT1A.

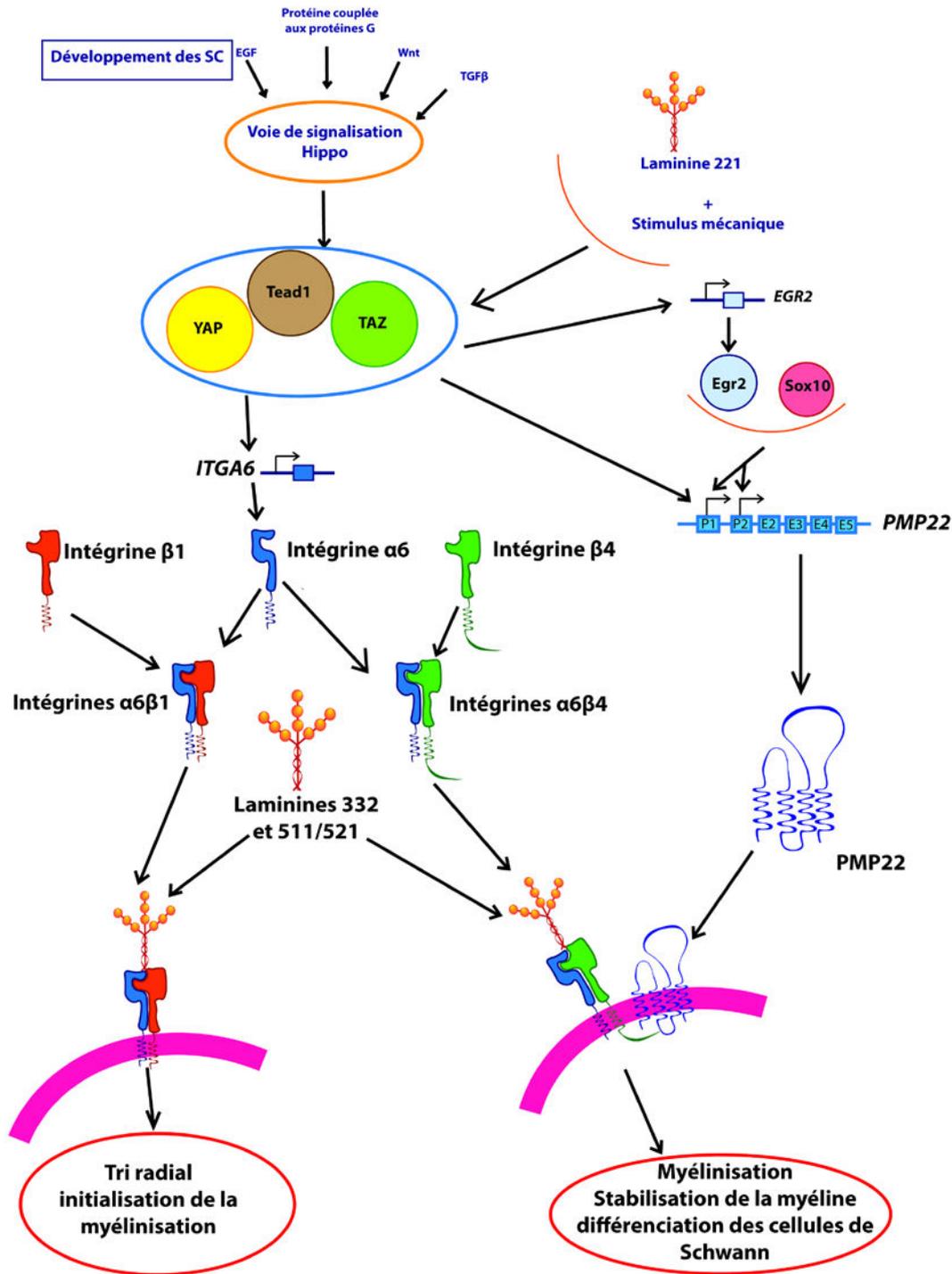


Figure 47 : représentation schématique de l'activation du gène de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ et de PMP22 par les facteurs de transcription TEAD1, YAP et TAZ

Les facteurs de transcription YAP, TAZ et TEAD 1 sont activés lors du développement des cellules de Schwann via diverses voies d'activation (Poitelon et al., 2016). Ces facteurs sont capables d'activer le gène ITGA6 codant la sous-unité $\alpha 6$, nécessaire à la formation des complexes $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$. Ces deux complexes sont des récepteurs des laminines 332 et 511/521 (Nishiuchi et al., 2006). YAP, TAZ et TEAD1 sont aussi des facteurs de transcription de PMP22 avec une très forte affinité pour l'activation du promoteur P1 de PMP22 (Lopez-Anido et al., 2016). Ces facteurs de transcription sont aussi capables d'activer PMP22 indirectement via l'activation d'Egr2, qui est un facteur de transcription de PMP22. L'interaction au niveau protéique des laminines et de $\alpha 6\beta 1$ dans la membrane des cellules de Schwann est nécessaire au tri-radial, ainsi qu'à l'initialisation de la myélinisation (Pellegatta et al., 2013). La présence du complexe PMP22 - $\alpha 6\beta 4$ interagissant avec les laminines est, quant à lui nécessaire à la maturation des cellules de Schwann myélinisantes, à la myélinisation et à la stabilisation de la myélinisation.

Dans le futur, il sera donc indispensable de s'intéresser au niveau d'expression des facteurs de transcription de *PMP22* : *Egr2*, *Sox10* mais aussi à *TEAD1*, *YAP* et *TAZ* qui concernent à la fois *PMP22* et les intégrines. Connaître leur niveau d'expression dans le CMT1A permettrait de savoir quelle voie de signalisation est activée lors du mécanisme compensatoire de la sur-expression de *PMP22*. Pour cela, l'utilisation de puces d'expression ARN semble être une bonne solution. Elles permettraient l'étude simultanée de nombreux gènes. Combinées à des études de protéomiques, les voies de signalisation impliquées dans le CMT1A pourraient être mise en évidence.

1.3.5. L'effet de la diminution d'expression de $\alpha\beta4$

Nous avons observé dans les cellules de Schwann des rats CMT1A une forte diminution de l'expression du complexe $\alpha\beta4$ (-60%). Le domaine intracytoplasmique de $\beta4$ est le plus long de toutes les sous-unités d'intégrine (1000 acides aminés contre 50 pour les autres intégrines). Ce domaine intracytoplasmique est impliqué dans l'activation de nombreuses voies de signalisations liées à la stabilité de la myéline et la myélinisation (Figure 48) (Giancotti and Tarone, 2003b; Heller *et al.*, 2014; Okuda *et al.*, 2004).

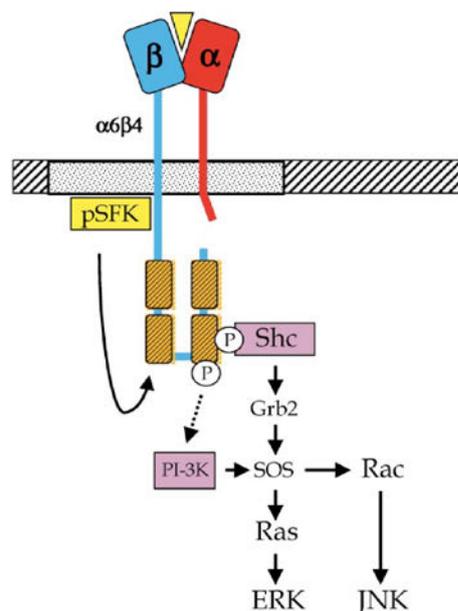


Figure 48 : Activation spécifique de la voie PI-3K et SHC par le domaine intracytoplasmique de la sous-unité d'intégrine 64 d'intégrine (Giancotti and Tarone, 2003b).

La voie PI-3K est impliquée dans la myélinisation dès les premières étapes jusqu'à la formation de la myéline mature grâce à $\alpha\beta4$ (Figure 49)(Heller *et al.*, 2014).

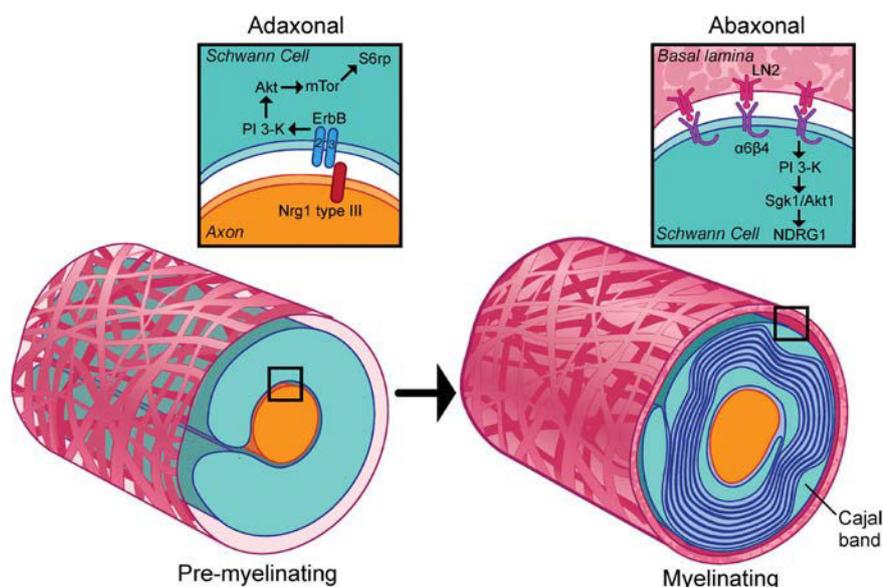


Figure 49 : Représentation Schématique de la voie de signalisation PI3-K durant la myélinisation.

A gauche, les cellules de Schwann promyélinisantes, la neuréguline 1 dirige la myélinisation en activant TORC1 via une activation de la voie PI3-K/Akt. Dans les cellules de Schwann myélinisantes (à droite), la myélinisation est régulée par le signal de $\alpha6\beta4$ activé par les laminines. Ce signal active aussi la voie de signalisation PI3-K/Akt.

Notre hypothèse est qu'une diminution de l'expression du complexe $\alpha6\beta4$ à la membrane des cellules de Schwann myélinisantes va déréguler les voies de signalisations activées par le domaine intracytoplasmique de $\beta4$. Entraînant les défauts de myélinisation observés chez les rats CMT1A. Cette hypothèse devra être vérifiée dans un futur proche. Si cette voie de signalisation est modifiée lors du CMT1A, elle pourrait représenter une cible thérapeutique dans le cadre du traitement du CMT1A. Par exemple, une molécule comme AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), qui est une molécule d'origine naturelle utilisée comme produit dopant est capable de stimuler l'activation de AMPK qui à son tour activera AKT par la phosphorylation de sa thréonine 308 (Hales *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2016). Compenser les effets de la diminution d'expression de $\beta4$ dans les cellules de Schwann myélinisantes en agissant sur les voies de signalisations perturbées pourrait être une solution thérapeutique intéressante. Pour démontrer cela, nous pourrions inoculer de telles molécules sur nos rats CMT1A et observer leurs effets sur l'épaisseur de la gaine de myéline via un calcul du g-ratio.

1.4. Utilisation d'autres modèles

Au cours de notre étude portant sur l'effet de la sur-expression de PMP22 sur l'expression des intégrines, nous avons utilisé un modèle de rat. Cependant, il existe d'autres modèles d'études qui nous permettraient d'en apprendre plus sur PMP22 et ses différents partenaires protéiques.

1.4.1. Autres modèles animaux

1.4.1.1. Un modèle de CMT1E : les souris trembler J

Les souris trembler J sont porteuses d'une mutation homozygote L16P sur la protéine PMP22, qui entraîne une neuropathie périphérique rappelant celle de l'homme, le CMT1E. Cette mutation entraîne une mauvaise conformation de la protéine PMP22. Ce mauvais repliement protéique entraîne alors une accumulation de la protéine PMP22 dans le réticulum endoplasmique par les mécanismes

de contrôle de la qualité protéique ERAD (Hara *et al.*, 2014). Donc, contrairement au modèle de rat que nous avons utilisé, ce n'est pas une sur-expression de la protéine PMP22 qui est constatée, mais une mutation ponctuelle qui entraîne la maladie. Pourtant, les symptômes observés chez ces animaux sont très proches de ceux constatés chez les animaux CMT1A et chez les patients CMT1A. Il serait donc intéressant de constater l'expression des intégrines chez ces animaux modèles.

1.4.2. L'homme : le meilleur modèle

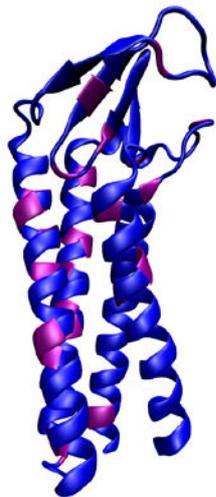
Au cours de notre étude concernant PMP22 et les intégrines, nous avons utilisé des animaux modèles du CMT1A et mis en évidence un effet de PMP22 sur l'expression des intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha6\beta1$. Malgré une forte homologie entre PMP22 murin et humain et entre les intégrines murine et humaine, de légères différences demeurent. L'étape suivante de ce travail sera de vérifier nos résultats sur plusieurs échantillons de nerfs de patients CMT1A, HNPPP.

Chapitre 2. A partir du modèle tridimensionnel de PMP22

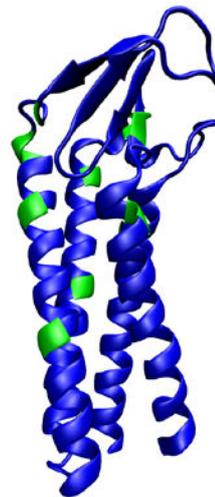
Notre travail sur la protéine CasR m'aura permis de connaître la technique permettant de modéliser la structure tridimensionnelle d'une protéine par homologie de séquence, puis par dynamique moléculaire.

2.1. Une cartographie des mutations de PMP22

A partir du modèle proposé par Mittendorf et ses collaborateurs (Mittendorf *et al.*, 2014b) nous avons effectué une cartographie des mutations responsables soit de CMT1A, soit d'HNPP dont nous disposons via les banques de données du CHU et via les mutations publiées (Figure 50 Tableau 5).



Cartographie des mutations ponctuelles de PMP22 responsables de CMT1A



Cartographie des mutations ponctuelles de PMP22 responsables d'HNPP

Figure 50 : Cartographie des mutations ponctuelles de PMP22 responsables soit de CMT1A (en violet), soit d'HNPP (en vert)

N° résidus	HNPP	CMT	Domaine
16		p.Leu16Pro	TM1
22	p.Ser22Phe		TM1
23		P.Thr23Arg	TM1
28		P.Trp28Arg	TM1
30	p.Val30Met		TM1
37		p.Asp37Val	EC1
39		p.Cys42Arg	EC1
42	p.Glu60Lys		EC1
60		p.Val65phe	TM2
67	p.Ala67Thr	p.Ala67Pro	TM2
69		p.Met69Arg	TM2
72		p.Ser72Pro/Trp/Leu	TM2
78		p.Ser79Cys	TM2
86		p.Gly93Arg	IC2
103		p.Leu105Arg	TM3
107		p.Gly107Val	TM3
109		p.Cys109Arg	TM3
118	p.Thr118Met	p.Thr118Met	TM3
131		p.Ser131cys	EC2
157		p.Arg157gly	IC3

Tableau 5 : Mutations de PMP22 entraînant soit une HNPP, soit un CMT1A. Les mutations ponctuelles non publiées sont présentées en rouge. (TM domaine transmembranaire, EC domaine extracellulaire, IC domaine intracellulaire).

Cependant, ce travail ne permet pas de mettre en évidence des régions qui seraient spécifiques d'une atteinte. Cependant, cette cartographie met en évidence l'importance des domaines transmembranaires. Pour l'avenir, il sera important de s'intéresser au caractère hydrophile ou hydrophobe de l'acide aminé muté, ainsi qu'au caractère déstabilisant pour les hélices α de PMP22. Ce sont ces acides aminés de remplacement qui doivent être déterminants pour l'effet de la mutation qui causera, soit une HNPP, soit un CMT, ou restera sans effet. Par exemple, un remplacement de l'alanine en position 67 par une thréonine va entraîner une HNPP, alors qu'un remplacement de cette même alanine par une proline va entraîner un CMT1A. L'alanine est un acide aminé hydrophobe alors que la thréonine et la proline ne le sont pas. Par ailleurs, la proline est un acide aminé cyclique. Un tel changement de structure pour l'hélice α n'est certainement pas anodin. Il est imaginable que les changements de propriétés électrostatiques et structurelles suffisent à déstabiliser la protéine. Cependant, les hélices α hydrophobes sont transmembranaires. Donc si nous souhaitons modéliser une protéine PMP22 avec une structure fiable, il faudrait considérer l'environnement que représente la membrane des cellules de Schwann pour PMP22.

2.2. Ajout d'une membrane lipidique au modèle tridimensionnel de PMP22

Lorsque nous avons travaillé sur la protéine CasR, nous n'avons élucidé que le domaine extracellulaire. PMP22 est, quant à elle, une protéine avec 4 domaines traversant de part en part la membrane. Donc si nous voulons étudier la protéine PMP22, il est préférable de considérer son inclusion dans un modèle de membrane en plus du solvant habituel. En effet, la structure tridimensionnelle d'une protéine s'établit aussi en fonction de son environnement. Les liaisons électrostatiques d'une protéine ne sont pas les mêmes avec de l'eau ou avec des lipides : Les hélices α , qui sont composées d'acides aminés essentiellement hydrophobes ont besoin d'une bicouche lipidique pour les protéger du solvant aqueux. Ces éléments suffisent à justifier l'utilisation d'une membrane. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de PMP22 développé par Mittendorf et ses collaborateurs (Mittendorf et al., 2014a), auquel nous avons ajouté une membrane bilipidique. Les

modèles de membranes sont des avancées très récentes de la dynamique moléculaire et en deux ans, les progrès ont été fantastiques. Le modèle disponible se rapprochant le plus de la myéline est le modèle POPC (Figure 48).

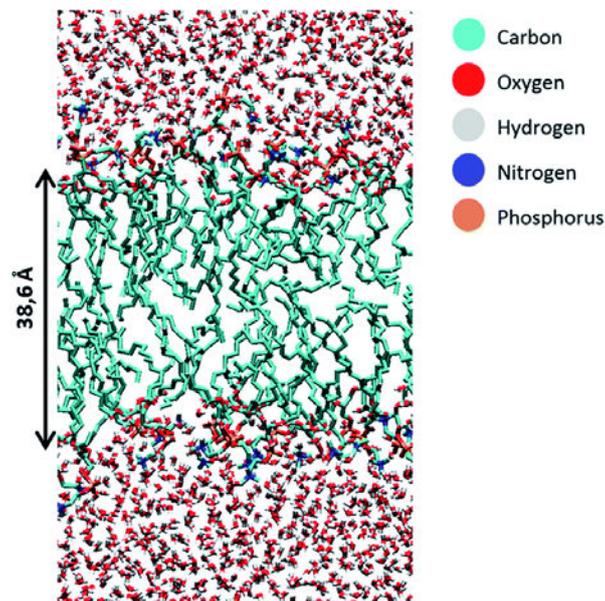


Figure 51 : Membrane POPC avec son solvant.

Cette membrane est composée d'une bicouche bilipidique, organisée en deux feuillets continus. Ce modèle présente une simulation numérique de 200 phospholipides (POPC – 1-palitoyl-2oleoyl-phosphatidylcholine) (Figure 52) en présence de molécules d'eau.

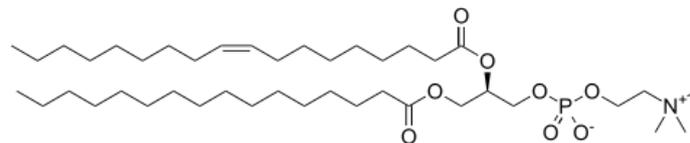


Figure 52 : 1-palitoyl-2oleoyl-phosphatidylcholine

Dans un premier temps, nous avons incorporé la protéine PMP22 au sein de cette membrane bilipidique. Puis à cette structure, nous avons ajouté le solvant aqueux de part et d'autre de la bicouche bilipidique (Figure 53). Cette structure nous permet d'étudier la protéine PMP22 dans des conditions proches de celles rencontrées dans la membrane des cellules de Schwann.

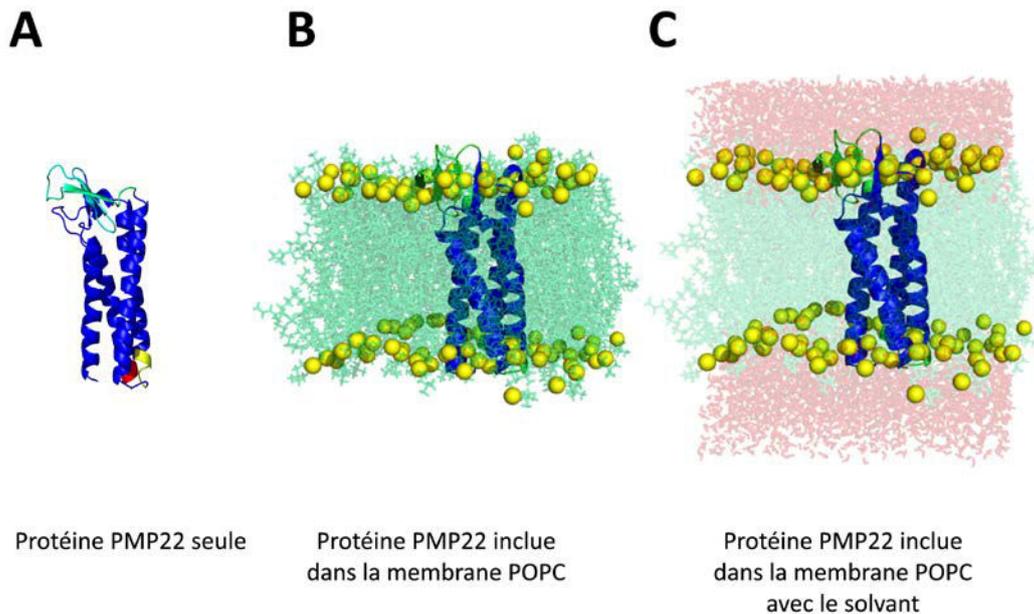


Figure 53 : Inclusion de la structure tridimensionnelle de PMP22 dans la membrane

- A- Structure tridimensionnelle de la protéine PMP22 fournie par (Mittendorf et al., 2014a).
- B- Inclusion de la protéine PMP22 dans la membrane bilipidique POPC. Les sphères jaunes représentent les têtes des phospholipides et les filaments verts représentent les bras phospholipidiques.
- C- Ajout du solvant, constitué de molécules d'eau, au-dessus et en-dessous de la membrane phospholipidique (en rouge).

Cette structure nous sera utile pour de futures investigations concernant les mutations présentées dans le tableau, détectées par nos collaborateurs au CHU. Nous pourrions alors simuler des mutations sur ce modèle et après une étape de dynamique moléculaire, nous pourrions constater les changements de structure occasionnés par les mutations. Grâce à des algorithmes, nous pouvons facilement évaluer la structure et la stabilité d'une protéine et peut-être ainsi prédire la pathogénicité d'une mutation.

2.3. Autre utilisation de ce modèle

2.3.1. Un modèle de la myéline : une double bicouche bilipidique

Bien que la technique soit encore balbutiante, il serait aussi intéressant d'étudier les interactions de PMP22 avec ses partenaires. Nous souhaiterions construire un modèle de double bicouche de membrane bilipidique (Figure 54), nous permettant d'étudier l'interaction d'une protéine PMP22 dans un feuillet avec une autre protéine dans un autre feuillet.

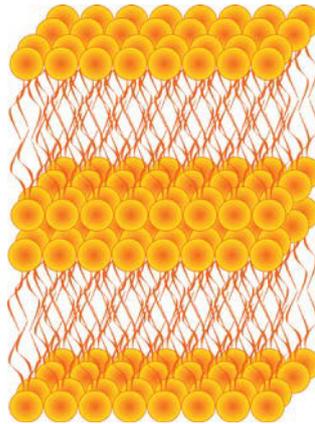


Figure 54 : Projet de double bicouche bilipidique

Ce projet est à l'étude à l'heure actuelle et nous permettrait une meilleure compréhension de l'intégration des protéines dans la myéline compacte, qui est un empilement de couches bilipidiques sans cytoplasme entre deux lamelles. Après avoir constitué ce modèle de bicouche bilipidique, il nous faudra effectuer une étape de dynamique moléculaire sans autres protéines afin d'éprouver sa stabilité.

2.3.2. Utilisation du modèle de myéline

En plus d'étudier l'intégration des protéines dans la myéline, nous pourrions envisager une étude des partenaires d'interaction de PMP22 ; plus particulièrement P0, qui est aussi un partenaire d'interaction de PMP22 : P0 et PMP22 sont capables tous deux de former des homo et hétérodimères.

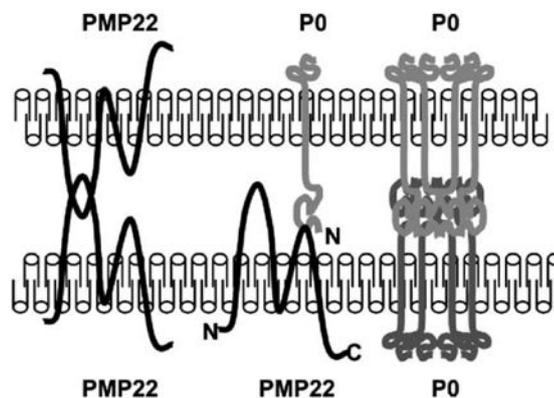


Figure 55 : représentation schématique des 3 types de trans-interactions entre PMP22 et P0 dans la myéline périphérique (Hasse et al., 2004).

La modélisation de ces interactions nous permettrait de mettre en évidence des changements de conformations de ces deux protéines, s'il y en a. Cette modélisation nous apporterait aussi des informations sur le type d'interaction reliant ces deux protéines.

2.3.3. Vers une modélisation d'intégrines

Concernant les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha6\beta1$, leur structure tridimensionnelle n'a pas encore été complètement établie, il serait donc intéressant d'élucider leurs structures par homologie de séquences, puis par dynamique moléculaire. Cependant, $\beta4$ est une très grosse sous-unité protéique avec un large domaine intracellulaire. La modélisation de ces protéines risque d'être complexe et de

prendre beaucoup de temps de calcul avant d'obtenir un résultat concret. Par la suite, nous étudierons l'interaction du complexe $\alpha 6\beta 4$ avec PMP22. A la différence de PO et de PMP22, nous ne connaissons pas le site, ni le motif permettant à PMP22 d'interagir avec ce complexe. Cependant, pouvoir étudier les interactions de PMP22 avec ses différents ligands est un enjeu de taille pour la compréhension des mécanismes des CMT1E, des HNPP et des CMT1A.

Chapitre 3. Vers des cellules souches pluripotentes induites (IPS) de rats CMT1A et de patients CMT1A

Au cours de cette étude, nous avons étudié PMP22 au travers de modèles animaux, de patients, ainsi qu'au moyen de l'outil informatique via la chimie théorique. La culture cellulaire pourrait aussi être un support d'étude intéressant.

3.1. Modèles cellulaires utilisés dans l'étude du CMT1A

Il existe déjà des modèles cellulaires permettant l'étude du CMT1A.

La culture seule de cellules de Schwann provenant d'animaux CMT1A comme ceux employés durant notre étude. Cette technique est utilisée pour étudier les cellules de Schwann (Nobbio *et al.*, 2014) mais elle est assez réductrice : il est impossible d'étudier les fonctions des cellules de Schwann dans la myélinisation avec ce modèle seul. Le principal et le plus complet des modèles est le système de co-culture d'explants de racines de ganglions dorsaux de rat avec des cellules de Schwann. Si les cellules proviennent de modèles animaux, on s'attend à ce qu'elle reproduisent les processus pathologiques (Callizot *et al.*, 2011). On a déjà observé, sur ces modèles, une prolifération des cellules de Schwann et un alignement le long des axones ; ainsi que l'établissement d'une lame basale et des processus de myélinisation (Callizot *et al.*, 2011). Cependant, ce modèle permet difficilement l'étude sur des cellules d'origine humaine. Il ne permet pas, non plus, d'étudier le phénomène de tri axonal permettant aux cellules de Schwann de se différencier en cellules de Schwann non myélinisantes ou en cellules de Schwann myélinisantes.

3.2. Le modèle cellulaire à partir de cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites pourraient aussi être un support d'étude intéressant. Les cellules IPS sont des cellules reprogrammées provenant de n'importe quel type de cellules différenciées. Cette technique a été créée par Takahashi et Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006).

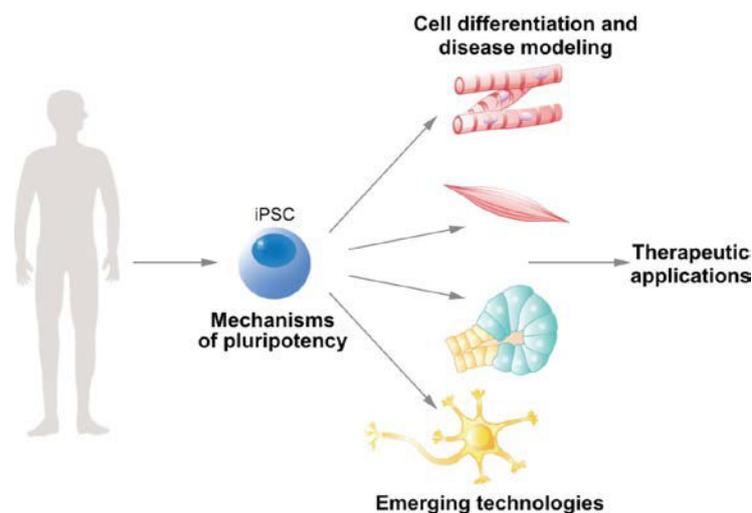


Figure 56 : Applications des cellules IPS (Karagiannis and Eto, 2016)

L'avantage de cette technique est qu'elle permet de travailler sur des cellules pluripotentes de patients sans rencontrer les problèmes éthiques des cellules souches. Après reprogrammation, les IPS

peuvent être différenciées en différents types cellulaires, incluant des neurones et de la myéline, offrant une source illimitée de cellules dérivées de patients adultes. L'étude des cellules de Schwann de patients souffrant d'un CMT1A permettrait l'étude des voies de signalisations impliquées dans le CMT1A. Le net avantage de cette technique, c'est qu'elle nous permet de travailler sur un type cellulaire isolé, nous évitant des interférences d'autres tissus ou types cellulaires. La création de cellules IPS de patient CMT1A permettrait un suivi en temps réel de la myélinisation. Cependant, la myélinisation est régie par 2 types cellulaires différents : à savoir des axones et des cellules de Schwann. Ce type de culture est possible en co-culture et doit donc être possible sur des cellules IPS. Nous pourrions développer des cellules IPS de cellules de Schwann qui se différencieraient de manière concomitante. Nous serions à même d'observer les cellules de Schwann et leur enroulement autour des axones. Nous pourrions facilement suivre par transcriptomique les voies de signalisation qui sont impliquées en un temps donné, de la cellule de Schwann immature à la myéline. Il s'agit d'un des enjeux futurs de notre laboratoire, afin de créer un modèle IPS de myélinisation.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons étudié PMP22 selon plusieurs axes d'étude. Dans un premier temps, nous avons **précisé l'implication des intégrines dans le CMT1A**. En conditions normales, PMP22 est exprimée au sein de la membrane des cellules de Schwann myélinisantes, alors qu'une sur-expression de la protéine PMP22 entraîne son agrégation au sein des cytoplasmes des cellules de Schwann myélinisantes. PMP22 n'est plus adressée correctement à la membrane. L'un des partenaires d'interactions de PMP22 en conditions normales semble suivre le même profil d'expression. Il s'agit d'un récepteur des laminines : l'intégrine $\alpha6\beta4$. Nous avons émis différentes hypothèses. Nous pensons que PMP22 séquestrerait, au moins partiellement, l'intégrine $\beta4$ dans le cytoplasme des cellules de Schwann lors de la formation d'agrégats de PMP22. Ainsi, les niveaux d'expression de $\alpha6\beta4$ au niveau de la membrane seraient diminués, réduisant alors les cascades dont $\alpha6\beta4$ est responsable (lorsqu'elle interagit normalement avec les laminines). Cette diminution des cascades de signalisation initiées par $\alpha6\beta4$ diminuerait aussi l'expression génique de *ITGB4* et *ITGB6* (les deux gènes codant pour les intégrines $\alpha6$ et $\beta4$). La diminution d'expression protéique de l'intégrine $\beta4$ permettrait un maintien anormalement important de l'expression du complexe $\alpha6\beta1$. Normalement, ce complexe est exprimé lors de la différenciation des cellules de Schwann myélinisantes et lors de l'initialisation de la myélinisation. Son niveau d'expression anormalement haut montre un retard dans la différenciation des cellules de Schwann et dans leurs maturations, expliquant l'épaisseur anormalement fine de la myéline des rats et des patients CMT1A. La mise en évidence des perturbations de telles voies de signalisation dans le CMT1A présente un intérêt notable pour la recherche médicale. En effet, à ce jour toutes les tentatives visant à contrecarrer la sur-expression de PMP22 ont échoués. La mise en évidence de voie de signalisation en aval de PMP22 nous offre de nouvelles cibles thérapeutiques pour le CMT1A.

Notre seconde étude portant sur l'absence de PMP22 chez un patient humain nous a permis de confirmer **le rôle indispensable de PMP22 dans la myélinisation**. En effet, ce patient, hétérozygote composite de PMP22, et qui a été suivi durant plus de 20 ans, présente une absence congénitale de myélinisation. Grâce à la microscopie électronique, **nous avons pu identifier précisément l'étape durant laquelle la maturation des cellules de Schwann était bloquée**. En effet, le tri axonal permettant aux cellules de Schwann d'évoluer vers la différenciation de cellules de Schwann immatures en cellules de Schwann non myélinisantes ou en cellules de Schwann myélinisantes s'opère de manière normale. Les cellules de Schwann promyélinisantes s'associent normalement aux axones de large diamètre et commencent à les entourer pour former le mésaxone. Cependant, les extensions cytoplasmiques s'arrêtent avant d'entrer en contact et avant de former le mésaxone. **PMP22 apparaît donc nécessaire pour l'initialisation de la myélinisation**. L'absence de PMP22 entraîne aussi des défauts au sein de la matrice extracellulaire, plus précisément au sein de la lame basale, qui est déstabilisée et semble proliférer anarchiquement à une distance anormale de la cellule de Schwann. Ceci n'est pas sans rappeler l'étude précédente : nous supposons une altération de l'expression des intégrines qu'il nous faudra confirmer prochainement.

L'étude des mutations de PMP22 est un outil indispensable à l'étude de son rôle dans le SNP. Pour cela, de nombreux animaux modèles mimant les pathologies humaines ont été générés. Dans une troisième étude, nous avons examiné différents exemples de modèles animaux de CMT1A, CMT1E ou d'HNPP que nous avons comparés à des pathologies de patients. La quasi-totalité des 14 modèles étudiés reproduisent fidèlement l'atteinte des nerfs des patients. Seul le modèle sans PMP22 présentait des différences avec le patient. Le patient présentait une absence congénitale de myéline alors que certains axones du nerf de la souris étaient myélinisés, nous laissant supposer une autre voie permettant l'initialisation de la myélinisation chez la souris.

Enfin, nous avons tenté d'établir une structure tridimensionnelle de la protéine PMP22 par un procédé différent de la cristallographie. Bien qu'une étude similaire soit parue avant l'élucidation de la structure de PMP22 par notre équipe, nous disposons désormais **d'une structure tridimensionnelle fiable** sur laquelle nous appuyer pour de prochaines études impliquant des modèles d'interactions de PMP22 avec d'autres protéines, ainsi que l'étude de mutations de PMP22 mise en évidence par le CHU de Limoges mais non publiée à ce jour.

Ces 4 études nous auront permis d'étudier PMP22 et la myélinisation en utilisant des animaux modèles, des échantillons de patients et des modèles informatiques. Une des perspectives d'avenir pour l'étude de PMP22 serait l'établissement d'un modèle de CMT1A via les cellules souches pluripotentes induites de patients. Notre laboratoire dispose du savoir-faire permettant la création d'un tel modèle nous permettant une étude plus précise de l'implication de PMP22 dans la dynamique de l'initialisation de la myéline ainsi que la myélinisation.

Bibliographie

1. Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka K, Suter U. Hypermyelination and demyelination peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nature* 1995; 11: 274–280.
2. Aguayo AJ, Charron L, Bray GM. Potential of Schwann cells from unmyelinated nerves to produce myelin: a quantitative ultrastructural and radiographic study. *J. Neurocytol.* 1976; 5: 565–73.
3. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 2009; 457: 675–7.
4. Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 2002; 22: 6458–70.
5. Amici S a, Dunn W a, Murphy AJ, Adams NC, Gale NW, Valenzuela DM, et al. Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J. Neurosci.* 2006; 26: 1179–89.
6. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong J-P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19: 495–507.
7. Arroyo EJ, Scherer SS. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell Biol.* 2000; 113: 1–18.
8. Arroyo EJ, Xu YT, Zhou L, Messing A, Peles E, Chiu SY, et al. Myelinating Schwann cells determine the internodal localization of Kv1.1, Kv1.2, Kvbeta2, and Caspr. *J. Neurocytol.* 1999; 28: 333–47.
9. Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ. Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* 2009; 122: 165–70.
10. Bachmann M, Conscience JF, Probstmeier R, Carbonetto S, Schachner M. Recognition molecules myelin-associated glycoprotein and tenascin-C inhibit integrin-mediated adhesion of neural cells to collagen. *J. Neurosci. Res.* 1995; 40: 458–70.
11. Bai Y, Zhang X, Katona I, Saporta MA, Shy ME, O'Malley H a, et al. Conduction block in PMP22 deficiency. *J. Neurosci.* 2010; 30: 600–8.
12. Barca-Mayo O, Lu QR. Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front. Neurosci.* 2012; 6: 13.
13. Bejaoui K, Wu C, Scheffler MD, Haan G, Ashby P, Wu L, et al. SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1. *Nat. Genet.* 2001; 27: 261–2.
14. Benjamins JA, Morell P. Proteins of myelin and their metabolism. *Neurochem. Res.* 1978; 3: 137–74.
15. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7 Suppl 1: 200–5.
16. Bennett M V, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 1991; 6: 305–20.
17. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, et al. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; 262: 2039–42.
18. Bermingham JR, Scherer SS, O'Connell S, Arroyo E, Kalla KA, Powell FL, et al. Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev.* 1996; 10: 1751–62.
19. Berti C, Bartesaghi L, Ghidinelli M, Zambroni D, Figlia G, Chen Z-L, et al. Non-redundant function of dystroglycan and {beta}1 integrins in radial sorting of axons. *Development* 2011; 138: 4025–4037.
20. Berti C, Nodari A, Wrabetz L, Feltri ML. Role of Integrins in Peripheral Nerves and Hereditary Neuropathies. *Neuromolecular Med.* 2006; 8: 175–190.
21. Birchmeier C, Nave KA. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives schwann cell growth and differentiation. *Glia* 2008; 56: 1491–1497.

22. Borradori L, Sonnenberg A. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996; 8: 647–56.
23. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 2001; 15: 66–78.
24. Bronner-Fraser M, Artinger M, Muschler J, Horwitz AF. Developmentally regulated expression of alpha 6 integrin in avian embryos. *Development* 1992; 115: 197–211.
25. Brückner K. Blood cells need glia, too: a new role for the nervous system in the bone marrow niche. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 493–5.
26. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 1996; 238: 1–27.
27. Bunge MB, Bunge RP. Linkage between Schwann cell extracellular matrix production and ensheathment function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986; 486: 241–7.
28. Bunge MB, Clark MB, Dean a. C, Eldridge CF, Bunge RP. Schwann cell function depends upon axonal signals and basal lamina components. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990; 580: 281–287.
29. Callizot N, Combes M, Steinschneider R, Poindron P. A new long term in vitro model of myelination. *Exp. Cell Res.* 2011; 317: 2374–2383.
30. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, et al. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 1993; 72: 143–151.
31. Charnas L, Trapp B, Griffin J. Congenital absence of peripheral myelin: abnormal Schwann cell development causes lethal arthrogryposis multiplex congenita. *Neurology* 1988; 38: 966–74.
32. Chernousov M a, Yu W-M, Chen Z-L, Carey DJ, Strickland S. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia* 2008; 56: 1498–1507.
33. Chiu SY, Ritchie JM. On the physiological role of internodal potassium channels and the security of conduction in myelinated nerve fibres. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 1984; 220: 415–22.
34. Clegg DO, Wingerd KL, Hikita ST, Tolhurst EC. Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front. Biosci.* 2003; 8: d723-50.
35. Condic ML, Letourneau PC. Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature* 1997; 389: 852–6.
36. Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 2002; 298: 1245–8.
37. Court F a, Wrabetz L, Feltri ML. Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006; 16: 501–7.
38. D’Urso D, Prior R, Greiner-Petter R, Gabreëls-Festen AA, Müller HW. Overloaded endoplasmic reticulum-Golgi compartments, a possible pathomechanism of peripheral neuropathies caused by mutations of the peripheral myelin protein PMP22. *J. Neurosci.* 1998; 18: 731–40.
39. Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat J-M, Charnay P. Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J. Neurosci.* 2006; 26: 9771–9779.
40. DeFreitas MF, Yoshida CK, Frazier WA, Mendrick DL, Kypta RM, Reichardt LF. Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron* 1995; 15: 333–43.
41. Dezawa M, Mutoh T, Dezawa A, Adachi-Usami E. Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 1998; 85: 663–7.
42. Dickson KM, Bergeron JJM, Shames I, Colby J, Nguyen DT, Chevet E, et al. Association of calnexin with mutant peripheral myelin protein-22 ex vivo: a basis for ‘gain-of-function’ ER diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99: 9852–7.
43. Doyu M, Sobue G, Ken E, Kimata K, Shinomura T, Yamada Y, et al. Laminin A, B1, and B2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: regulation by axonal signals. *J. Neurochem.* 1993; 60: 543–51.

44. Eldridge CF, Bunge MB, Bunge RP. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro: II. Control of myelin formation by basal lamina. *J. Neurosci.* 1989; 9: 625–38.
45. Fannon AM, Sherman DL, Ilyina-Gragerova G, Brophy PJ, Friedrich VL, Colman DR. Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J. Cell Biol.* 1995; 129: 189–202.
46. Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, et al. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J. Cell Biol.* 2002; 156: 199–209.
47. Feltri ML, Porta DG, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, et al. Conditional disruption of β 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J. Cell Biol.* 2002; 156: 199–209.
48. Feltri ML, Scherer SS, Nemni R, Kamholz J, Vogelbacker H, Scott MO, et al. Beta 4 integrin expression in myelinating Schwann cells is polarized, developmentally regulated and axonally dependent. *Development* 1994; 120: 1287–1301.
49. Feltri ML, Wrabetz L. Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2005; 10: 128–143.
50. Fernandez-Valle C, Gwynn L, Wood PM, Carbonetto S, Bunge MB. Anti-beta 1 integrin antibody inhibits Schwann cell myelination. *J. Neurobiol.* 1994; 25: 1207–26.
51. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science* 2002; 298: 556–62.
52. Finzsch M, Schreiner S, Kichko T, Reeh P, Tamm ER, Bösl MR, et al. Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage. *J. Cell Biol.* 2010; 189: 701–712.
53. Finzsch M, Schreiner S, Kichko T, Reeh P, Tamm ER, Bösl MR, et al. Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage. *J. Cell Biol.* 2010; 189: 701–12.
54. Fitzner D, Schneider A, Kippert A, Möbius W, Willig KI, Hell SW, et al. Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *EMBO J.* 2006; 25: 5037–5048.
55. Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Wichert SP, Stassart RM, Meyer zu Hörste G, et al. A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain* 2012; 135: 72–87.
56. Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer TJ, Wichert SP, Stassart RM, Meyer Zu Hörste G, et al. A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain* 2012; 135: 72–87.
57. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001; 305: 285–98.
58. Fortun J, Dunn W a, Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J. Neurosci.* 2003; 23: 10672–80.
59. Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA, Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol. Dis.* 2006; 22: 153–64.
60. Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol. Dis.* 2007; 25: 252–65.
61. Fu Q, Goodrum JF, Hayes C, Hostettler JD, Toews AD, Morell P. Control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells. *J. Neurochem.* 1998; 71: 549–55.
62. Funalot B, Topilko P, Arroyo MAR, Sefiani A, Hedley-Whyte ET, Yoldi ME, et al. Homozygous deletion of an EGR2 enhancer in congenital amyelinating neuropathy. *Ann. Neurol.* 2012; 71: 719–23.
63. Gallego RG, Blanco JL, Thijssen-van Zuylen CW, Gotfredsen CH, Voshol H, Duus JØ, et al. Epitope diversity of N-glycans from bovine peripheral myelin glycoprotein P0 revealed by mass

- spectrometry and nano probe magic angle spinning ^1H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 30834–44.
64. Garbay B, Domez C, Fournier M, Bonnet J. Developmental expression of the P0 glycoprotein and basic protein mRNAs in normal and trembler mutant mice. *J. Neurochem.* 1989; 53: 907–11.
 65. Geng Y, Mosyak L, Kurinov I, Zuo H, Sturchler E, Cheng TC, et al. Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *Elife* 2016; 5: 1–25.
 66. Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003a; 19: 173–206.
 67. Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003b; 19: 173–206.
 68. Gillen C, Korfhage C, Muller HW. Gene Expression in Nerve Regeneration. *Neurosci.* 1997; 3: 112–122.
 69. Gottschalk K-E. A coiled-coil structure of the $\alpha\text{11}\beta\text{3}$ integrin transmembrane and cytoplasmic domains in its resting state. *Structure* 2005; 13: 703–12.
 70. Gottschalk KE, Günther R, Kessler H. A three-state mechanism of integrin activation and signal transduction for integrin $\alpha\text{(v)}\beta\text{(3)}$. *Chembiochem* 2002; 3: 470–3.
 71. Griffin JW, George R, Ho T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1993; 52: 553–60.
 72. Hales EC, Taub JW, Matherly LH. New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: Targeted therapy of $\gamma\text{-secretase}$ inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell. Signal.* 2014; 26: 149–161.
 73. Hara T, Hashimoto Y, Akuzawa T, Hirai R, Kobayashi H, Sato K. Rer1 and calnexin regulate endoplasmic reticulum retention of a peripheral myelin protein 22 mutant that causes type 1A Charcot-Marie-Tooth disease. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6992.
 74. Hasse B, Bosse F, Hanenberg H, Müller HW. Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: domain specific trans-interactions. *Mol. Cell. Neurosci.* 2004; 27: 370–8.
 75. Heller B a., Ghidinelli M, Voelkl J, Einheber S, Smith R, Grund E, et al. Functionally distinct PI 3-kinase pathways regulate myelination in the peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* 2014; 204: 1219–1236.
 76. Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AE, Sonnenberg A. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J.* 1990; 9: 765–70.
 77. Horowitz SH, Spollen LE, Yu W. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: fulminant development with axonal loss during military training. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2004; 75: 1629–31.
 78. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* 2000; 28: 311–39.
 79. Humphries MJ. Monoclonal antibodies as probes of integrin priming and activation. *Biochem. Soc. Trans.* 2004; 32: 407–11.
 80. Hynes RO. Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors , integrins. 2002; 110: 673–687.
 81. Inoue K, Dewar K, Katsanis N, Reiter LT, Lander ES, Devon KL, et al. The 1.4-Mb CMT1A duplication/HNPP deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes. *Genome Res.* 2001; 11: 1018–1033.
 82. Inouye H, Tsuruta H, Sedzik J, Uyemura K, Kirschner DA. Tetrameric assembly of full-sequence protein zero myelin glycoprotein by synchrotron x-ray scattering. *Biophys. J.* 1999; 76: 423–437.
 83. Jaakkola S, Savunen O, Halme T, Uitto J, Peltonen J. Basement membranes during development of human nerve: Schwann cells and perineurial cells display marked changes in their expression profiles for laminin subunits and beta 1 and beta 4 integrins. *J. Neurocytol.* 1993; 22: 215–30.
 84. Jessen KR, Mirsky R. THE ORIGIN AND DEVELOPMENT OF GLIAL CELLS IN PERIPHERAL NERVES. 2005; 6: 671–682.

85. Jones E a, Brewer MH, Srinivasan R, Krueger C, Sun G, Charney KN, et al. Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease gene PMP22. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21: 1581–91.
86. Jouaud M, Gonnaud P-M, Richard L, Latour P, Ollagnon-Roman E, Sturtz FG, et al. Congenital hypomyelinating neuropathy due to the association of a truncating mutation in PMP22 with the classical HNPP deletion. *Neuromuscul. Disord.* 2016
87. Juguelin H, Heape A, Boiron F, Cassagne C. A quantitative developmental study of neutral lipids during myelinogenesis in the peripheral nervous system of normal and trembler mice. *Brain Res.* 1986; 390: 249–52.
88. Jurevics HA, Morell P. Sources of cholesterol for kidney and nerve during development. *J. Lipid Res.* 1994; 35: 112–20.
89. Kang SWS, Haydar G, Taniane C, Farrell G, Arias IM, Lippincott-Schwartz J, et al. AMPK Activation Prevents and Reverses Drug-Induced Mitochondrial and Hepatocyte Injury by Promoting Mitochondrial Fusion and Function. *PLoS One* 2016; 11: e0165638.
90. Karagiannis P, Eto K. Ten years of induced pluripotency: from basic mechanisms to therapeutic applications. *Development* 2016; 143
91. Kasman M, Bernstein L, Schulman S. Chronic polyradiculoneuropathy of infancy. A report of three cases with familial incidence. *Neurology* 1976; 26: 565–73.
92. Knyazev EN, Nyushko KM, Alekseev BY, Samatov TR, Shkurnikov MY. Suppression of ITGB4 Gene Expression in PC-3 Cells with Short Interfering RNA Induces Changes in the Expression of β -Integrins Associated with RGD-Receptors. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 159: 541–545.
93. Korenova M, Zilka N, Stozicka Z, Bugos O, Vanicky I, Novak M. NeuroScale, the battery of behavioral tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. *J. Neurosci. Methods* 2009; 177: 108–14.
94. Kuhn TB, Schmidt MF, Kater SB. Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron* 1995; 14: 275–85.
95. Kuhn TB, Williams C V, Dou P, Kater SB. Laminin directs growth cone navigation via two temporally and functionally distinct calcium signals. *J. Neurosci.* 1998; 18: 184–94.
96. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; 84: 381–8.
97. LeBlanc AC, Poduslo JF. Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve. *J. Neurosci. Res.* 1990; 26: 317–26.
98. Lefcort F, Venstrom K, McDonald JA, Reichardt LF. Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development* 1992; 116: 767–82.
99. LeGuern E, Gouider R, Mabin D, Tardieu S, Birouk N, Parent P, et al. Patients homozygous for the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Ann. Neurol.* 1997; 41: 104–8.
100. Li J, Krajewski K, Lewis RA, Shy ME. Loss-of-function phenotype of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Muscle Nerve* 2004; 29: 205–10.
101. Li J, Krajewski K, Shy ME, Lewis RA. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: the electrophysiology fits the name. *Neurology* 2002; 58: 1769–73.
102. Li J, Parker B, Martyn C, Natarajan C, Guo J. The PMP22 gene and its related diseases. *Mol. Neurobiol.* 2013; 47: 673–98.
103. Litjens SHM, de Pereda JM, Sonnenberg A. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 376–83.
104. Liu J, Casaccia P. Epigenetic regulation of oligodendrocyte identity. *Trends Neurosci.* 2010; 33: 193–201.
105. Llorens F, Gil V, del Río JA. Emerging functions of myelin-associated proteins during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *FASEB J.* 2011; 25: 463–75.
106. Lobsiger CS, Taylor V, Suter U. The Early Life of a Schwann Cell. *Biol. Chem.* 2002; 383: 245–53.
107. Lopez-Anido C, Poitelon Y, Gopinath C, Moran JJ, Ma KH, Law WD, et al. Tead1 regulates the

- expression of Peripheral Myelin Protein 22 during Schwann cell development. *Hum. Mol. Genet.* 2016
108. Luo B-H, Carman C V, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 619–47.
 109. Lupski JR. Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 1998; 14: 417–422.
 110. Maddalo G, Shariatgorji M, Adams CM, Fung E, Nilsson U, Zubarev RA, et al. Porcine P2 myelin protein primary structure and bound fatty acids determined by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 397: 1903–10.
 111. Magnaghi V, Ballabio M, Roglio I, Melcangi RC. Progesterone derivatives increase expression of Krox-20 and Sox-10 in rat Schwann cells. *J. Mol. Neurosci.* 2007; 31: 149–57.
 112. Magnaghi V, Cavarretta I, Galbiati M, Martini L, Melcangi RC. Neuroactive steroids and peripheral myelin proteins. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2001; 37: 360–71.
 113. Majava V, Polverini E, Mazzini A, Nanekar R, Knoll W, Peters J, et al. Structural and functional characterization of human peripheral nervous system myelin protein P2. *PLoS One* 2010; 5: e10300.
 114. Margadant C, Frijns E, Wilhelmsen K, Sonnenberg A. Regulation of hemidesmosome disassembly by growth factor receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008; 20: 589–96.
 115. Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, et al. Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat. Neurosci.* 2004; 7: 930–8.
 116. Martini R. The effect of myelinating Schwann cells on axons. *Muscle Nerve* 2001; 24: 456–66.
 117. Martini R, Mohajeri MH, Kasper S, Giese KP, Schachner M. Mice doubly deficient in the genes for PO and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J. Neurosci.* 1995; 15: 4488–4495.
 118. Matsumura K, Chiba A, Yamada H, Fukuta-Ohi H, Fujita S, Endo T, et al. A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 13904–10.
 119. Matthieu JM, Widmer S, Herschkowitz N. Biochemical changes in mouse brain composition during myelination. *Brain Res.* 1973; 55: 391–402.
 120. McKee KK, Yang D-H, Patel R, Chen Z-L, Strickland S, Takagi J, et al. Schwann Cell Myelination Requires Integration of Laminin Activities. *J. Cell Sci.* 2012
 121. Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L. Steroid metabolism and effects in central and peripheral glial cells. *J. Neurobiol.* 1999; 40: 471–83.
 122. Metcalf DG, Kulp DW, Bennett JS, DeGrado WF. Multiple approaches converge on the structure of the integrin α 5 β 3 transmembrane heterodimer. *J. Mol. Biol.* 2009; 392: 1087–101.
 123. Michailov G V, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, et al. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 2004; 304: 700–3.
 124. Milner R. Understanding the molecular basis of cell migration; implications for clinical therapy in multiple sclerosis. *Clin. Sci. (Lond).* 1997; 92: 113–22.
 125. Mittendorf KF, Kroncke BM, Meiler J, Sanders CR. The Homology Model of PMP22 Suggests Mutations Resulting in Peripheral Neuropathy Disrupt Transmembrane Helix Packing. *Biochemistry* 2014a
 126. Mittendorf KF, Kroncke BM, Meiler J, Sanders CR. The homology model of PMP22 suggests mutations resulting in peripheral neuropathy disrupt transmembrane helix packing. *Biochemistry* 2014b; 53: 6139–41.
 127. Miyazaki T, Takeda Y, Murakami Y, Kawano H, Shimazu T, Toya S, et al. Distribution of PASII/PMP22 and connexin 32 proteins in the peripheral nervous system. *Neurochem. Int.*; 27: 377–83.
 128. Mizisin AP, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol.* 2011; 121: 291–312.

129. Mobley CK, Myers JK, Hadziselimovic A, Ellis CD, Sanders CR. Purification and initiation of structural characterization of human peripheral myelin protein 22, an integral membrane protein linked to peripheral neuropathies. *Biochemistry* 2007; 46: 11185–95.
130. Monuki ES, Kuhn R, Lemke G. Repression of the myelin P0 gene by the POU transcription factor SCIP. *Mech. Dev.* 1993; 42: 15–32.
131. Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, et al. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab. Invest.* 2003; 83: 175–85.
132. Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 2187–97.
133. Murinson BB. Degeneration of Myelinated Efferent Fibers Prompts Mitosis in Remak Schwann Cells of Uninjured C-Fiber Afferents. *J. Neurosci.* 2005; 25: 1179–1187.
134. Myers JK, Mobley CK, Sanders CR. The Peripheral Neuropathy-Linked Trembler and Trembler-J Mutant Forms of. 2008: 10620–10629.
135. Narayanan V, Kaestner KH, Tennekoon GI. Structure of the mouse myelin P2 protein gene. *J. Neurochem.* 1991; 57: 75–80.
136. Nave K-A. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010; 11: 275–83.
137. Nave K-A, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006; 16: 492–500.
138. Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, et al. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: A comprehensive survey of laminin–integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *Matrix Biol.* 2006; 25: 189–197.
139. Nobbio L, Visigalli D, Mannino E, Fiorese F, Kassack MU, Sturla L, et al. The Diadenosine Homodinucleotide P18 Improves In Vitro Myelination in Experimental Charcot-Marie-Tooth Type 1A. *J. Cell. Biochem.* 2014; 115: 161–167.
140. Nodari A, Previtali SC, Dati G, Occhi S, Court FA, Colombelli C, et al. $\alpha 6\beta 4$ Integrin and Dystroglycan Cooperate to Stabilize the Myelin Sheath. *J. Neurosci.* 2008; 28
141. Notterpek L, Snipes GJ, Shooter EM. Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination. *Glia* 1999; 25: 358–69.
142. Occhi S, Zambroni D, Del Carro U, Amadio S, Sirkowski EE, Scherer SS, et al. Both laminin and Schwann cell dystroglycan are necessary for proper clustering of sodium channels at nodes of Ranvier. *J. Neurosci.* 2005; 25: 9418–27.
143. Okuda T, Higashi Y, Kokame K, Tanaka C, Kondoh H, Miyata T. Ndr1-deficient mice exhibit a progressive demyelinating disorder of peripheral nerves. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 3949–56.
144. Palix C, Coignet J. [A case of neonatal peripheral polyneuritis due to demyelination]. *Pediatric* 1978; 33: 201–7.
145. Pareek S, Notterpek L, Snipes GJ, Naef R, Sossin W, Laliberté J, et al. Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J. Neurosci.* 1997; 17: 7754–62.
146. Pareek S, Suter U, Snipes GJ, Welcher AA, Shooter EM, Murphy RA. Detection and processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 10372–9.
147. Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Wingfield Digby P, Fedorova M, Parkinson DB, et al. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 2010; 143: 145–55.
148. Peirano RI, Goerich DE, Riethmacher D, Wegner M. Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 3198–209.
149. Pellegatta M, De Arcangelis A, D’Urso A, Nodari A, Zambroni D, Ghidinelli M, et al. $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 7\beta 1$ integrins are required in Schwann cells to sort axons. *J. Neurosci.* 2013; 33: 17995–8007.
150. de Pereda JM, Ortega E, Alonso-García N, Gómez-Hernández M, Sonnenberg A. Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh. Migr.* 2009; 3: 361–4.

151. de Pereda JM, Wiche G, Liddington RC. Crystal structure of a tandem pair of fibronectin type III domains from the cytoplasmic tail of integrin alpha6beta4. *EMBO J.* 1999; 18: 4087–95.
152. Phillips K, Luisi B. The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J. Mol. Biol.* 2000; 302: 1023–39.
153. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 21785–8.
154. Podratz JL, Rodriguez EH, DiNonno ES, Windebank AJ. Myelination by Schwann cells in the absence of extracellular matrix assembly. *Glia* 1998; 23: 383–8.
155. Poitelon Y, Lopez-anido C, Catignas K, Berti C, Palmisano M, Williamson C, et al. YAP and TAZ control peripheral myelination and the expression of laminin receptors in Schwann cells. *Nat. Neurosci.* 2016; 19: 879–887.
156. Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, et al. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron* 1999; 24: 1037–47.
157. Poliak S, Matlis S, Ullmer C, Scherer SS, Peles E. Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J. Cell Biol.* 2002; 159: 361–72.
158. Poliak S, Peles E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 968–980.
159. Previtali SC, Archelos JJ, Hartung HP. Expression of integrins in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol.* 1998; 44: 611–21.
160. Previtali SC, Feltri ML, Archelos JJ, Quattrini A, Wrabetz L, Hartung H. Role of integrins in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2001; 64: 35–49.
161. Previtali SC, Nodari A, Taveggia C, Pardini C, Dina G, Villa A, et al. Expression of laminin receptors in schwann cell differentiation: evidence for distinct roles. *J. Neurosci.* 2003a; 23: 5520–5530.
162. Previtali SC, Nodari A, Taveggia C, Pardini C, Dina G, Villa A, et al. Expression of laminin receptors in schwann cell differentiation: evidence for distinct roles. *J. Neurosci.* 2003b; 23: 5520–30.
163. Quarles RH. Myelin sheaths: Glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59: 1851–1871.
164. Rezniczek GA, de Pereda JM, Reipert S, Wiche G. Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J. Cell Biol.* 1998; 141: 209–25.
165. Richard L, Topilko P, Magy L, Decouvelaere A-V, Charnay P, Funalot B, et al. Endoneurial fibroblast-like cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012; 71: 938–47.
166. Robertson a M, Huxley C, King RH, Thomas PK. Development of early postnatal peripheral nerve abnormalities in Trembler-J and PMP22 transgenic mice. *J. Anat.* 1999; 195 (Pt 3: 331–9.
167. Robertson a M, King RH, Muddle JR, Thomas PK. Abnormal Schwann cell/axon interactions in the Trembler-J mouse. *J. Anat.* 1997; 190 (Pt 3: 423–432.
168. Robertson AM, Perea J, McGuigan A, King RHM, Muddle JR, Gabreëls-Festen AA, et al. Comparison of a new pmp22 transgenic mouse line with other mouse models and human patients with CMT1A. *J. Anat.* 2002; 200: 377–90.
169. Rosso G, Negreira C, Sotelo JR, Kun A. Myelinating and demyelinating phenotype of Trembler-J mouse (a model of Charcot-Marie-Tooth human disease) analyzed by atomic force microscopy and confocal microscopy. *J. Mol. Recognit.* 2012; 25: 247–55.
170. Rouse I, Robitaille R. Calcium signaling in Schwann cells at synaptic and extra-synaptic sites: active glial modulation of neuronal activity. *Glia* 2006; 54: 691–9.
171. Ruskamo S, Yadav RP, Sharma S, Lehtimäki M, Laulumaa S, Aggarwal S, et al. Atomic resolution view into the structure-function relationships of the human myelin peripheral membrane protein P2. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2014; 70: 165–76.

172. Ryan MC, Notterpek L, Tobler AR, Liu N, Shooter EM. Role of the Peripheral Myelin Protein 22 N-Linked Glycan in Oligomer Stability. *J. Neurochem.* 2002; 75: 1465–1474.
173. Saher G, Quintes S, Möbius W, Wehr MC, Krämer-Albers E-M, Brügger B, et al. Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *J. Neurosci.* 2009; 29: 6094–6104.
174. Salzer JL. Clustering sodium channels at the node of Ranvier: close encounters of the axon-glia kind. *Neuron* 1997; 18: 843–6.
175. Salzer JL. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 2003; 40: 297–318.
176. Saporta ASD, Sottile SL, Miller LJ, Feely SME, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann. Neurol.* 2011; 69: 22–33.
177. Saporta MA, Katona I, Zhang X, Roper HP, McClelland L, Macdonald F, et al. Neuropathy in a Human Without the. 2011; 68: 814–821.
178. Schachner M, Bartsch UDO. Multiple Functions of the MAG (siglec-4a) in Formation and Maintenance of Myelin. 2000; 165: 154–165.
179. Scherer SS, Deschênes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J. Neurosci.* 1995; 15: 8281–94.
180. Schleich JP, Narayan M, Alford C, Mittendorf KF, Carter BD, Li J, et al. Conformational Stability and Pathogenic Misfolding of the Integral Membrane Protein PMP22. *J. Am. Chem. Soc.* 2015: 150623132439009.
181. Schlierf B, Ludwig A, Klenovsek K, Wegner M. Cooperative binding of Sox10 to DNA: requirements and consequences. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 5509–16.
182. Schmitt S, Cantuti Castelvetri L, Simons M. Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 2014; 1851: 999–1005.
183. Schubert T, Friede RL. The role of endoneurial fibroblasts in myelin degradation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1981; 40: 134–54.
184. Sedzik J, Jastrzebski JP. High-resolution structural model of porcine P2 myelin membrane protein with associated fatty acid ligand: fact or artifact? *J. Neurosci. Res.* 2011; 89: 909–20.
185. Sedzik J, Jastrzebski JP, Ikenaka K. Sequence motifs of myelin membrane proteins: towards the molecular basis of diseases. *J. Neurosci. Res.* 2013; 91: 479–93.
186. Sereda M, Griffiths I, Pu A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmermann F, et al. A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease. 1996; 16: 1049–1060.
187. Sereda M, Griffiths I, Pühlhofer a, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, et al. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 1996; 16: 1049–60.
188. Siironen J, Sandberg M, Vuorinen V, Rönttö M. Expression of type I and III collagens and fibronectin after transection of rat sciatic nerve. Reinnervation compared with denervation. *Lab. Invest.* 1992; 67: 80–7.
189. Simske JS. Claudins reign: The claudin/EMP/PMP22/ γ channel protein family in *C. elegans*. *Tissue barriers* 2013; 1: e25502.
190. Snipes GJ. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J. Cell Biol.* 1992; 117: 225–238.
191. Snipes GJ, Suter U. Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. *J. Anat.* 1995; 186 (Pt 3): 483–94.
192. Spray DC, Dermietzel R. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap-junction diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 256–62.
193. Stevens A, Schabet M, Schott K, Wiethölter H. Role of endoneurial cells in experimental allergic neuritis and characterisation of a resident phagocytic cell. *Acta Neuropathol.* 1989; 77: 412–9.
194. Stewart HJ, Turner D, Jessen KR, Mirsky R. Expression and regulation of alpha1beta1 integrin in Schwann cells. *J. Neurobiol.* 1997; 33: 914–28.
195. Stewart RL, O'Connor KL. Clinical significance of the integrin $\alpha6\beta4$ in human malignancies. 2016; 21: 193–201.
196. Suresh S, Wang C, Nanekar R, Kursula P, Edwardson JM. Myelin basic protein and myelin protein 2 act synergistically to cause stacking of lipid bilayers. *Biochemistry* 2010; 49: 3456–

- 63.
- 197.Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, et al. Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 25795–808.
- 198.Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, et al. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 1992; 356: 241–4.
- 199.Suzuki S, Naitoh Y. Amino acid sequence of a novel integrin beta 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* 1990; 9: 757–63.
- 200.Svaren J, Meijer D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia* 2008; 56: 1541–51.
- 201.Swiss VA, Nguyen T, Dugas J, Ibrahim A, Barres B, Androulakis IP, et al. Identification of a gene regulatory network necessary for the initiation of oligodendrocyte differentiation. *PLoS One* 2011; 6: e18088.
- 202.Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
- 203.Tao-Cheng JH, Rosenbluth J. Axolemmal differentiation in myelinated fibers of rat peripheral nerves. *Brain Res.* 1983; 285: 251–63.
- 204.Taskinen HS, Heino J, Røyttä M. The dynamics of beta 1 integrin expression during peripheral nerve regeneration. *Acta Neuropathol.* 1995; 89: 144–51.
- 205.Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, et al. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 2005; 47: 681–694.
- 206.Taylor V, Welcher AA, Program AE, Suter U. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 28824–33.
- 207.Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* 1999; 194 (Pt 1: 1–14.
- 208.Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The Molecular Biology of Axon Guidance. *Science* (80-.). 1996; 274
- 209.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; 11: 839–58.
- 210.Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 1994; 371: 796–9.
- 211.Tortora GJ., Grabowski SR. *Principes d’anatomie et de physiologie.* 2001.
- 212.Toyota B, Carbonetto S, David S. A dual laminin/collagen receptor acts in peripheral nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; 87: 1319–22.
- 213.Traka M, Dupree JL, Popko B, Karagogeos D. The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3016–24.
- 214.Trapp BD, McIntyre LJ, Quarles RH, Sternberger NH, Webster HD. Immunocytochemical localization of rat peripheral nervous system myelin proteins: P2 protein is not a component of all peripheral nervous system myelin sheaths. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979; 76: 3552–6.
- 215.Uyemura K, Yoshimura K, Suzuki M, Kitamura K. Lipid binding activities of the P2 protein in peripheral nerve myelin. *Neurochem. Res.* 1984; 9: 1509–14.
- 216.Vabnick I, Trimmer JS, Schwarz TL, Levinson SR, Risal D, Shrager P. Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns. *J. Neurosci.* 1999; 19: 747–58.
- 217.Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, et al. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann. Neurol.* 1996; 39: 813–817.
- 218.Verheijen MHG, Chrast R, Burrola P, Lemke G. Local regulation of fat metabolism in peripheral

- nerves. *Genes Dev.* 2003; 17: 2450–64.
219. Visigalli D, Castagnola P, Capodivento G, Geroldi A, Bellone E, Mancardi G, et al. Alternative Splicing in the Human PMP22 Gene: Implications in CMT1A Neuropathy. *Hum. Mutat.* 2016; 37: 98–109.
220. Voshol H, van Zuylen CW, Orberger G, Vliegenthart JF, Schachner M. Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P0. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 22957–60.
221. Vougioukas VI, Roeske S, Michel U, Brück W. Wallerian degeneration in ICAM-1-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 1998; 152: 241–9.
222. Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 1993; 365: 75–9.
223. Wang W, Luo B-H. Structural basis of integrin transmembrane activation. *J. Cell. Biochem.* 2010; 109: 447–52.
224. Wegener KL, Campbell ID. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review). *Mol. Membr. Biol.* 2008; 25: 376–87.
225. Wegner M, Stolt CC. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 2005; 28: 583–8.
226. Weinberg HJ, Spencer PS, Raine CS. Aberrant PNS development in dystrophic mice. *Brain Res.* 1975; 88: 532–7.
227. Welcher AA, De Leon M, Suter U, Snipes GJ, Meakin SO, Shooter EM. Isolation of transcriptionally regulated sequences associated with neuronal and non-neuronal cell interactions. *Prog. Brain Res.* 1992; 94: 163–76.
228. Weterman M a J, van Ruissen F, de Wissel M, Bordewijk L, Samijn JP a, van der Pol WL, et al. Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010; 18: 421–8.
229. Williams MJ, Hughes PE, O'Toole TE, Ginsberg MH. The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol.* 1994; 4: 109–12.
230. Willis DE, Twiss JL. The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006; 16: 111–118.
231. Woodhoo A, Alonso MBD, Droggiti A, Turmaine M, Antonio D, Parkinson DB, et al. NIH Public Access. 2009; 12: 839–847.
232. Xu W, Manichella D, Jiang H, Vallat JM, Lilien J, Baron P, et al. Absence of P0 leads to the dysregulation of myelin gene expression and myelin morphogenesis. *J. Neurosci. Res.* 2000; 60: 714–24.
233. Yamashita H, Shang M, Tripathi M, Jourquin J, Georgescu W, Liu S, et al. Epitope mapping of function-blocking monoclonal antibody CM6 suggests a "weak" integrin binding site on the laminin-332 LG2 domain. *J. Cell. Physiol.* 2010; 223: 541–8.
234. Yates AJ, Wherrett JR. Changes in the sciatic nerve of the rabbit and its tissue constituents during development. *J. Neurochem.* 1974; 23: 993–1003.
235. Van der Zee CEEM, Kreft M, Beckers G, Kuipers A, Sonnenberg A. Conditional deletion of the *Itgb4* integrin gene in Schwann cells leads to delayed peripheral nerve regeneration. *J. Neurosci.* 2008; 28: 11292–303.
236. Zenker J, Stettner M, Ruskamo S, Domnech-Estvez E, Baloui H, Mardard JJ, et al. A role of peripheral myelin protein 2 in lipid homeostasis of myelinating Schwann cells. *Glia* 2014; 62: 1502–1512.
237. Zhang F, Seeman P, Liu P, Weterman MAJ, Gonzaga-Jauregui C, Towne CF, et al. Mechanisms for Nonrecurrent Genomic Rearrangements Associated with CMT1A or HNPP: Rare CNVs as a Cause for Missing Heritability. *Am. J. Hum. Genet.* 2010; 86: 892–903.
238. Zhu J, Luo B-H, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol. Cell* 2008; 32: 849–61.
239. Zody MC, Garber M, Adams DJ, Sharpe T, Harrow J, Lupski JR, et al. DNA sequence of human

chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. *Nature* 2006; 440: 1045–1049.

240. Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, Schmalenbach C, Müller HW. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *EMBO J.* 1995; 14: 1122–8.

Annexes

Fiche n°1 : protocole d'immunohistochimie sur coupes de nerfs de rats congelés

C'est une technique d'immunofluorescence indirecte. Pour cela, nous utilisons 2 anticorps successivement : le premier anticorps cible notre protéine d'intérêt (anticorps primaire), et le second anticorps (dit anticorps secondaire), alors fluorescent, va cibler cet anticorps primaire.

Cette technique rapide et fiable présente un avantage : l'anticorps primaire présentant plusieurs sites de fixation, plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur un seul anticorps primaire. Cela améliore la fluorescence.

Protocole d'immunohistochimie :

- Prélèvement de nerfs sciatiques de rats
- Congélation des nerfs dans de la résine
- Coupe des blocs de résine à 8 µm d'épaisseur et dépôt sur des lames « Superfrost™ Plus »
- Fixation au paraformaldéhyde (PFA) 4 % durant 10 minutes
- 2 rinçages de 5 minutes au tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline ou PBS)
- Saturation des sites antigéniques avec du sérum d'albumine bovin (Bovine Serum Albumine ou BSA) 10 % durant une heure à température ambiante
- Ajout des anticorps primaires dilués en différentes concentrations selon l'anticorps (voir table ci-dessous), les anticorps incubent durant une nuit à 4°C
- 3 rinçages de 5 minutes au PBS le lendemain
- Ajout des anticorps secondaires spécifiques des anticorps primaires, concentrés au 1/500^{ème}
- 3 rinçages de 5 minutes au PBS
- Marquage de 3 minutes des noyaux à la bis-benzimidine concentrée au 1/5000^{ème}
- 3 rinçages de 5 minutes au PBS
- Montage des lames avec une solution de montage (DAKO mounting solution)
- Observation des lames au microscope à fluorescence

Liste des anticorps et des conditions utilisées :

Référence	Nom	Hôte	Concentration	Protocole	Anticorps secondaire	Résultats
sc 6597	Anti-α6	Chèvre	1/25 ^{ème}	PFA 4 % :10min SDS 10 % : 5min BSA 10 % : 2h	Alexa fluor anti chèvre	Bon marquage mais temps d'exposition de 2s
AB 77693	Anti-β4	Lapin	1/500 ^{ème}	PFA 4 % :10min SDS 10 % : 5min BSA 10 % : 2h	Alexa fluor anti lapin	Bon marquage mais un peu de bruit de fond dans axone

p 0078	Anti PMP22	Lapin	1/200 ^{ème}	PFA 4 % : 10min SDS 10 % : 5min BSA 10 % : 2h	Alexa fluor anti lapin	Bon marquage avec un peu de bruit de fond axonal
Ab15506	Anti PMP22	Lapin	1/50 ^{ème}	PFA 4 % : 10min SDS 10 % : 5min BSA 10 % : 2h	Alexa fluor anti lapin	Moins bon marquage que p0078
NBP167670	Anti PMP22	Lapin	1/200 ^{ème} ; 1/500 ^{ème} ; 1/1000 ^{ème}	PFA 4 % : 10min SDS 10 % : 5min BSA 10% : 2h	Alexa fluor anti lapin	Pas de marquage
SAB 4502217	C-term de PMP22	Lapin	1/200 ^{ème} ; 1/500 ^{ème} ; 1/1000 ^{ème}	PFA 4 % : 10min SDS 10 % : 5min BSA 10 % : 2h	Alexa fluor anti lapin	Pas de marquage
MCA2034G	Anti-α6	Souris	1/50 ^{ème}	PFA 4 % : 10min SDS 10 % : 5min BSA 10 % : 2h	Alexa fluor anti lapin	Moins bon marquage sc 6597

Fiche n°2 : génotypage des rats CMT1A

Cette technique permet de mettre en évidence la présence, ainsi que le nombre de copies d'un gène en fonction d'un gène de référence. Cette technique permet de savoir si nos rats sont porteurs du plasmide transgénique contenant le gène *PMP22*, elle permet aussi de faire la différence entre les rats normaux (non porteurs du plasmide), les rats hétérozygotes (porteur d'une copie du plasmide contenant 3 copies du gène de *PMP22* de souris) et les rats homozygotes (porteurs de deux copies des plasmides contenant 3 copies du gène *PMP22*). Cette technique est subdivisée en plusieurs parties : (i) extraction et purification des ADN issus d'une biopsie de queue de rat en utilisant le kit d'extraction d'ADN QIAamp DNA mini Kit, (ii) suivi par un dosage des ADN extraits et purifiés grâce à un spectromètre (Nanodrop) puis (iii) d'une PCR en temps réel utilisant les amorces de du gène *PMP22* de souris et du gène de référence, dans notre cas GDAP1. En comparant les Ct (Threshold cycle) nous pouvons mettre en évidence les différences de copies du gène *PMP22* entre les animaux.

Extraction des ADN à partir de biopsie de queue :

Kit utilisé : QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN référence : 51304

Prélèvement tissulaire

Les biopsies de queue sont effectuées sur des animaux sous anesthésie générale (isoflurane 3 %, Oxygène X %) en prélevant un fragment d'environ 25 mg de tissus.

Lyse tissulaire

- Dans une boîte de Pétri, couper le prélèvement très finement à l'aide d'un scalpel
- Les fragments sont placés dans un tube de 2 ml
- Ajouter 180 µl de tampon ATL pour 25 mg de tissu. On augmente la quantité de tampon proportionnellement à celle de tissus.
- Ajouter 20 µL de protéinase K (on augmente la quantité de protéinase K proportionnellement à celle de tissus).
- Vortexer pendant 30 secondes au moins
- Incuber à 56°C pendant une nuit (jusqu'à la lyse complète) dans un bain-marie agité. Eventuellement, vortexer de temps en temps. Rajouter de la protéinase K le lendemain si la lyse n'est pas complète.
- Ajouter 200 µl de tampon ATL. Augmenter la quantité de tampon proportionnellement à celle de tissus.
- Vortexer pendant 30 secondes
- Incuber à 70°C pendant 10 minutes
- Centrifuger brièvement

Fixation sur la membrane

- Ajouter 200 µl d'éthanol à 100 %. Augmenter la quantité d'éthanol proportionnellement à celle de tissu.
- Vortexer pendant 30 secondes
- Centrifuger brièvement. Un précipité peut se former à cette étape ; il est nécessaire de bien le récupérer pour la phase suivante.
- Placer des colonnes sur des tubes collecteurs propres de 2ml
- Mettre le mélange précédant dans une colonne
- Centrifuger à 8500 tours / minutes pendant une minute
- Jeter le filtrat

Lavage

- Replacer la colonne sur son tube collecteur de 2ml
- Ajouter 500 µl de tampon AW1 dans la colonne
- Centrifuger à 8500 tours / minutes pendant une minute
- Jeter le filtrat
- Replacer la colonne sur son tube collecteur de 2ml
- Ajouter 500 µl de tampon AW2
- Centrifuger à 14500 tours / minutes pendant 3 minutes
- Jeter le filtrat
- Recommencer la centrifugation pour bien éliminer le tampon

Elution

- Placer la colonne sur un tube collecteur propre de 2ml
- Ajouter 200 µl de tampon AE
- Incuber à température ambiante pendant 5 minutes
- Centrifuger à 8500 tours / minutes pendant une minute
- Garder le filtrat
- Les ADN sont gardés à -20°C

Dosage des ADN au Nanodrop

La concentration et la qualité des ADN peuvent être mesurées grâce au spectrophotomètre NanoDrop 1000. Ce dosage nous permettra de diluer tous nos échantillons au 20 ng/µl pour la PCR en temps réel.

Matériel utilisé : NonoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech)

- Bien nettoyer le Spectrophotomètre en déposant une goutte d'eau de 1 µl sur le capteur
- Essuyer le capteur avec du papier d'essuyage optique
- Faire le blanc en déposant 1 µl de tampon AE
- Déposer 1 µl d'échantillon et effectuer la mesure
- Bien essuyer entre chaque échantillon
- Dilution de chaque échantillon au 20 µg/µl

PCR quantitative

Cette technique permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à une sonde fluorescente. La sonde fluorescente utilisée est le SYBR green 1 qui se lie à toute molécule d'ADN double brin en émettant une fluorescence détectable à 521 nm. La fluorescence émise, détectée par un spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé.

Les gènes *GDAP1* et *PMP22* de souris sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel grâce au thermocycleur Rotor-gene 6000 real time PCR cycler (RG ; Corbett Life Science, Sydney, Australia) et au kit SYBR green RT-PCR kit (Qiagen, Germany). *GDAP1* sert de gène de référence pour normaliser la quantité d'ADN de chaque échantillon.

Protocole de la PCR quantitative en temps réel

Mettre dans un tube adapté au Rotor-gene 6000 :

- 5 µl d'ADNg dilué au 20 ng/µl
- 1 µl de mix d'amorces (amorces sens et anti sens diluées au 25 µM)
- 6,5 µl d'H₂O
- 12,5 µL de Master Mix (SYBR green RT-PCR kit) contenant l'enzyme Taq DNA polymerase et le fluorochrome

Les séquences d'amorces utilisées sont les suivantes :

Gènes	Amorces	Taille des amplicons
GDAP1	Amorce sens : 5'-ACTTGACCATGAGATGCCCA-3' Amorce antisens : 5'-GAGCCATGAAGACTGCCCTA-3'	106 pb
PMP22	Amorce sens : 5'-GACAAACCCAGACAGTTG-3' Amorce antisens : 5'-CCAGAAAGCCAGGGAAGTC-3'	494 pb

Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

- Dénaturation initiale 95°C pendant 10 minutes
- 40 cycles de :
 - Dénaturation à 95°C pendant 10 secondes
 - Hybridation des amorces à 62°C pendant 10 secondes
 - Elongation à 72°C pendant 30 secondes avec acquisition
- Courbe de fusion : 72-95°C

Méthode de calcul

Grâce à la PCR en temps réel, les « crossing points » (Cp) pour chaque tube est déterminé en utilisant un seuil de 10^{-1} . Cette valeur a été choisie comme la valeur seuil permettant de faire la différence entre le bruit de fond et une réelle fluorescence.

Les courbes de fusion permettent de vérifier la présence d'un seul amplicon spécifique lors de la PCR avec une température de fusion spécifique au couple d'amorce.

La quantité relative d'une copie du gène *PMP22* est normalisée sur celle du gène de référence *GDAP1* ou *MBP*. Le nombre de copie de ce gène ne varie pas entre les individus. Le ratio du nombre de copie de *PMP22* par rapport à celui de *MBP* peut-être calculé à l'aide de la formule suivante :

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta C_{p_{target}}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta C_{p_{ref}}(control-sample)}}$$

Ratio est le ratio la quantité de *PMP22* chez un rat par rapport à un rat dit de référence.

« E_{target} » et « E_{ref} » sont respectivement l'efficacité de la PCR pour le couple d'amorce de *PMP22* et le couple d'amorce *GDAP1*, dans notre cas cette équation peut être simplifiée par 2.

« $\Delta C_{p_{target}}$ » est la différence des Cp de *PMP22* entre le rat de référence et le rat étudié.

« $\Delta C_{p_{ref}}$ » est la différence des Cp de *GDAP1* entre le rat de référence et le rat étudié.

Ainsi un ratio de 2 voudra dire qu'il y a deux fois plus de *PMP22* chez le rat étudié par rapport au rat de référence.

Fiche n°3 : extraction d'ARN à partir de biopsie de peau (pour l'homme) de queue

(pour le rat)

L'extraction d'ARN est réalisée avec le Kit Qiagen « Rneasy » (Qiagen, Courtaboeuf, France). Cette technique repose sur l'accrochage sélectif des ARN totaux sur une colonne de Silice. L'utilisation d'un tampon fortement concentré en sels permet l'accrochage de plus de 100 µg d'ARN d'une taille pouvant atteindre 200 bases.

Protocole :

Lyse des cellules

- Découper la biopsie conservée dans le RNAlater au scalpel
- Ajouter 900 µl de Qiazol
- Ajouter 3 billes de broyage
- Broyer deux fois 2 minutes et si nécessaire, broyer une fois ou deux supplémentaires.
- Récupérer le broyat avec une seringue de 1ml et le transvaser dans un tube de 1,5 ml

Elimination de l'ADN génomique

- Ajouter 100 µl de gDNA eliminator
- Agiter vigoureusement 15 secondes

Extraction des ARN totaux

- Ajouter 180 µl de chloroforme
- Agiter vigoureusement et laisser reposer 2-3 minutes
- Centrifuger à 12 000 tours / minute pendant 15 minutes à 4°C
- Transférer le surnageant dans un tube de 1,5ml en évaluant le volume
- Ajouter 1 volume d'éthanol et mélanger à la pipette
- Transférer sur une colonne de 700 µl
- Centrifuger 15 secondes à 10 000 tours / minute
- Jeter l'éluat
- Recommencer les 3 étapes précédentes pour le restant
- Ajouter 700 µl de tampon RWT et centrifuger 15 secondes à 10 000 tours / minute
- Ajouter 500 µl de tampon RPE et centrifuger 15 secondes à 10 000 tours / minute
- Ajouter 500 µl de tampon RPE et centrifuger 2 minutes à 13 000 tours / minute
- Changer de tubes collecteurs et centrifuger 1 minutes à 13 000 tours / minute

Elution des ARN totaux

- Placer sur un tube Eppendorf 1,5ml
- Eluer avec 30 µl de RNase free water
- Laisser en contact 1 minute et centrifuger 1 minute à 13 000 tours / minute
- Conserver les ARN à - 80°C

Mesure de la concentration en ARN

La densité optique des échantillons est lue avec un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA) à 260 nm (longueur d'ondes d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) afin de s'assurer de la pureté des échantillons.

Sachant qu'une unité de densité optique correspond à 40 µg d'ARN simple brin, la concentration en ARN contenue dans les échantillons peut être calculée à partir de leur absorbance à 260 nm

- Bien nettoyer le spectrophotomètre en déposant une goutte d'eau de 1 µl sur le capteur
- Essuyer le capteur avec du papier d'essuyage optique

- Faire le blanc en déposant 1 μ l d'eau RNase free
- Déposer 1 μ l d'échantillon et effectuer la mesure
- Bien essuyer entre chaque échantillon

Fiche n°4 : transcription inverse d'ARN totaux

La transcription inverse consiste à synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Cette technique est réalisée grâce au « Quantitect reverse transcription kit » (Qiagen®, Courtabœuf, France).

Protocole

- Calculer les volumes nécessaires pour apporter 750ng d'ARN pour la réaction

Elimination des ADNg restants

- Ajouter dans un tube à PCR conservé à 4°C de préférence :
 - 3 µl de gGNA wipeout
 - Le volume d'ARN calculé précédemment (750 ng)
 - 21 µl d'eau q.s.p.
- Mettre les tubes dans un thermocycleur et lancer le programme :
 - 2 minutes à 42°C
 - Maintien à 4°C

Reverse transcription

- Préparer le mix à part :
 - 6 µl de Rt buffer
 - 1,5µl de RT primer Mix
 - 1,5µl de reverse transcriptase
- Ajouter les 9 µl de mix RT dans les 21 µl de la solution précédente
- Lancer le programme RT :
 - 15 minutes à 42°C
 - 3 minutes à 95 °C
 - Maintien à 4°C
- Conserver les ADNc à -20°C

Fiche n°5 : PCR en temps réel quantitative des ADNc

Cette technique permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. La sonde fluorescente utilisée lors de ces manipulations est le SYBR green 1 qui se lie à toutes les molécules d'ADN double brin en émettant une fluorescence détectable à 521 nm. La fluorescence émise, détectée par un spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé.

Cette technique nous aura été utile deux fois, la première dans la mise en évidence du mécanisme de RNA decay chez un patient portant une mutation ponctuelle sur un allèle de *PMP22* et une délétion de *PMP22* sur l'autre allèle. La seconde dans l'étude de la transcription de *PMP22* chez les rats CMT1A hétérozygotes et normaux.

Les transcrits des gènes *PMP22*, *TBP* et *HPRT* sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel grâce au thermocycleur Rotor-gene 6000 real time PCR cyclor (RG ; Corbett Life Science, Sydney, Australia) et au kit SYBR green RT-PCR kit (Qiagen, Germany). Les gènes *TBP* et *HPRT* servent de gènes de référence pour normaliser la quantité d'ADNc de chaque échantillon.

Protocole de la PCR quantitative en temps réel

Mettre dans un tube adapté au Rotor-gene 6000 :

- 2 µl d'ADNg dilué au 20 ng/µl
- 1 µl de mix d'amorces (amorces sens et anti sens diluées au 25 µM)
- 9,5 µl d'H₂O
- 12,5 µL de Master Mix (SYBR green RT-PCR kit) contenant l'enzyme Taq DNA polymerase et le fluorochrome

Les séquences d'amorces utilisées sur l'homme sont les suivantes :

Gènes	Amorces	Taille des amplicons
TBP	Amorce sens : 5'- AGCGCAAGGGTTTCTGGTTT-3' Amorce antisens : 5'- CTGAATAGGCTGTGGGGTCA-3'	106 pb
HPRT	Amorce sens : 5'- AAGGACCCACGAAGTGTG-3' Amorce antisens : 5'- GCAGATGGCCACAGAAGTACA-3'	250 pb
PMP22	Amorce sens : 5'- CTGGTCTGTGCGTGATGAGT -3' Amorce antisens : 5'- AGATGACACCGCTGAGAAGG -3'	141 pb

Les séquences d'amorces utilisées sur les rats CMT1A sont les suivantes :

Gènes	Amorces	Taille des amplicons
TBP-1	Amorce sens : 5'-TGGGATTGTACCACAGCTCCA-3' Amorce antisens : 5'-CTCATGATGACTGCAGCAAACC-3'	132 pb
TBP-2	Amorce sens : 5'- ACCGTGAATCTTGGCTGTAAAC-3' Amorce antisens : 5'- CGCAGTTGTTCTGGCTCTC-3'	123 pb
TBP-3	Amorce sens : 5'- AAGTGTGAGCCTCTCCAAGG-3' Amorce antisens : 5'- AAGCCCTGAGCATAAGGTGG-3'	265 pb
HPRT-1	Amorce sens : 5'- CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3' Amorce antisens : 5'- GCAGGTCAGCAAAGAAGTATAGCC-3'	123 pb
HPRT-2	Amorce sens : 5'- GTCAAGCAGTACAGCCCCAA-3' Amorce antisens : 5'- TGGCCACATCAACAGGACTC-3'	256 pb

PMP22 Rat spécifique	Amorce sens : 5'- GCGTACACCATTGGTCTGG-3' Amorce antisens : 5'- GTCCTGTGTCCATTGCCCT-3'	163 pb
PMP22 Souris spécifique	Amorce sens : 5'-TTACACCATTGGTCTGCAGG-3' Amorce antisens : 5'-GTCGTGTGTCCATTGCCCA-3'	165 pb
PMP22 Rat/souris	Amorce sens : 5'- GTTCCTGTTCTTCTGCCAGC -3' Amorce antisens : 5'- CCTCATTCGCGTTTCCGCA -3'	246 pb

Le programme d'amplification utilisé pour l'homme est le suivant :

- Dénaturation initiale 95°C pendant 5 minutes
- 40 cycles de :
 - Dénaturation à 95°C pendant 5 secondes
 - Hybridation/élongation des amorces à 60°C pendant 10 secondes
- Courbe de fusion 72-95°C

Le programme d'amplification utilisé pour le rat est le suivant :

- Dénaturation initiale 95°C pendant 5 minutes
- 40 cycles de :
 - Dénaturation à 95°C pendant 5 secondes
 - Hybridation/élongation des amorces à 60°C pendant 10 secondes
- Courbe de fusion 72-95°C

Méthode de calcul

Grâce à la PCR en temps réel, les « crossing points (Cp) pour chaque tube est déterminé en utilisant un seuil de 10⁻¹. Cette valeur a été choisie comme la valeur seuil permettant de faire la différence entre le bruit de fond et une réelle fluorescence.

Les « curves » permettent de vérifier la présence d'un seul amplicon spécifique lors de la PCR avec une température de fusion spécifique au couple d'amorce.

La quantité relative d'une copie du gène *PMP22* est normalisée sur celle du ou des gènes de référence (HPRT et TBP). Le nombre de copie de ce gène ne varie pas entre les individus. Le ratio de la quantité de transcrits de *PMP22* par rapport aux transcrits des gènes de références peut être calculé à l'aide de la formule suivante :

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Cpt_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta Cp_{ref}(control-sample)}}$$

Ratio est le ratio la quantité de transcrits de *PMP22* chez un rat par rapport à un rat dit de référence.

« E_{target} » et « E_{ref} » sont respectivement l'efficacité de la PCR pour le couple d'amorce de *PMP22* et le couple d'amorce de référence, dans notre cas cette équation peut être simplifiée par 2. « ΔCp_{target} » est la différence des Cp de *PMP22* entre le rat de référence et le rat étudié. « ΔCp_{ref} » est la différence des Cp du gène de référence entre le rat de référence et le rat étudié. Ainsi, un ratio de 2 voudra dire qu'il y a deux fois plus de transcription de *PMP22* chez le rat étudié par rapport au rat de référence.

Fiche n°6 : microscopie électronique de nerfs de rats ou biopsie de nerfs humains

La microscopie électronique est une technique permettant d'observer des structures avec un fort pouvoir de résolution. Les microscopes électroniques peuvent obtenir des grossissements allant jusqu'à 5 millions de fois, à la différence des microscopes optiques, qui s'avèrent limités à un grossissement de 2000 fois. Le microscope électronique utilise des lentilles électrostatiques et électromagnétiques pour former l'image en contrôlant le faisceau d'électrons et le faire converger sur un plan particulier par rapport à l'échantillon. Ce mode est similaire à la façon dont un microscope optique utilise des lentilles en verre pour converger la lumière sur ou au travers de l'échantillon pour former une image.

Nous utilisons cette technique afin d'étudier les coupes de nerfs sciatiques en les observant à l'échelle de l'organite (de l'ordre du micromètre) en utilisant un microscope électronique en transmission. Ainsi, les principales structures du nerf sont facilement observables : feuillet de la myéline, lame basale, axone, collagène...

Néanmoins, cette technique nécessite une longue préparation des échantillons que nous pouvons séparer en 4 étapes principales :

- La première est la fixation du nerf sciatique de rat et la préparation de l'échantillon
- La deuxième est l'inclusion des nerfs dans une résine en araldite.
- La troisième est la préparation des semi-fines
- La quatrième est la découpe au microtome et la préparation des grilles pour observation au microscope électronique

Fixation du nerf sciatique

- Préparation du fixateur : ajouter aux 9 ml de tampon Soerensen, 1ml de glutaraldéhyde sigma à 25 %
- Plonger les nerfs coupés en fragments de 1 à 2 mm³ dans le fixateur, puis laisser fixer durant 12 heures à 4°C
- Rincer les échantillons avec du tampon Soerensen
- Garder les échantillons au réfrigérateur
- Plonger les échantillons dans mélange constitué de 50 % d'acide osmique concentré à 2 % et de 50 % de tampon palade pendant 24h à 4°C
- Rincer les échantillons au tampon palade

Inclusion des nerfs dans une résine en araldite

Préparation de la résine

- Dans 55 ml de D.D.S.A. ajouter 25 ml d'Epon 812
- Ajouter 15 ml d'araldite
- Ajouter 3 ml de phthalate
- Conserver cette résine à -20°C dans des seringues de 20 ml

Déshydratation

On effectue la déshydratation des échantillons dans des bains d'acétone diluée à l'eau selon un gradient de concentration :

- Acétone à 25 % pendant 10 minutes
- Acétone à 50 % pendant 10 minutes
- Acétone à 50 % pendant 10 minutes
- Acétone à 70 % pendant 10 minutes
- Acétone à 90 % pendant 10 minutes
- Acétone à 90 % pendant 10 minutes

- Acétone pure pendant 15 minutes
- Acétone pure pendant 20 minutes
- Acétone pure pendant 20 minutes

Substitution de l'acétone par la résine

On effectue une substitution progressive de l'acétone par de la résine en faisant différents bains avec une concentration croissante de résine :

- 25 % de résine dans de l'acétone pendant 1 heure
- 50 % de résine dans de l'acétone pendant 5 heures
- 50 % de résine dans de l'acétone pendant 5 heures
- 75 % de résine dans de l'acétone pendant 2 heures

Imprégnation

Cette étape permet d'imprégner complètement l'échantillon avec de la résine

- Plonger les échantillons dans de la résine pure pendant 3 heures à 20°C
- Plonger les échantillons dans de la résine à 3 % de DMP30 pendant 3 heures à température ambiante

Inclusion

Les échantillons sont inclus dans des gélules de résine permettant d'obtenir finalement des blocs de résines contenant nos échantillons

- Etiqueter les prélèvements
- Mettre une goutte de résine à 3 % de DMP30 au fond de chaque gélule
- Déposer le prélèvement puis le recouvrir de résine à 3 % de DMP30
- Orienter le prélèvement

Polymérisation

Laisser la résine polymériser pendant 48 heures à 60°C

Préparation des coupes semi fines

Les coupes semi fines permettent une première observation du bloc, permettant ainsi d'évaluer sa qualité. Ces coupes permettent surtout de choisir la zone d'intérêt afin d'éliminer le surplus pour les coupes ultra fines observables au microscope électronique. Les coupes semi fines sont ensuite colorées au bleu de toluidine et au nitrate d'argent.

Préparation des blocs pour la coupe

- A partir des blocs de gélule, découper la gélatine de la gélule en haut du bloc, à la lame de rasoir
- Tailler le bloc en tronc de pyramide avec le pyramitome (machine à dresser les blocs)
- Faire les 4 faces puis la surface en s'approchant au maximum du tissu. La surface idéale d'un bloc est de 1mm².

Coupe des semi-fines

- Monter le bloc sur le porte objet du microtome.
- Effectuer des coupes de 1 à 2 µm

Coloration au bleu de toluidine et nitrate d'argent

Cette coloration colore les noyaux en bleu foncé et les cytoplasmes en bleu clair. Le nitrate d'argent accentue le contraste de toutes les structures.

Solutions :

- Bleu de toluidine
 - Bleu de toluidine 1g
 - Na₂CO₃ 0,5 g
 - H₂O distillée 100ml
- Nitrate d'argent

Les grilles sont enfin observables au microscope électronique.

Fiche n°7 : extraction protéique à partir de tissus

Cette technique permet de purifier les protéines en vue de faire, par la suite, un dosage, puis des Western Blot. Cette technique se résume en deux étapes : une étape de lyse mécanique par des billes de céramique dans un tampon d'extraction, puis une étape de centrifugation afin de culoter les déchets cellulaires. Attention cette technique est d'autant plus efficace lorsque la température des échantillons est maintenue le plus possible à 4°C. Nous avons utilisé cette technique sur des nerfs de rats afin d'étudier des protéines de la myéline.

Protocole :

- Prélever environ 30mg de tissus juste avant l'extraction pour de meilleurs résultats
- Déposer le prélèvement dans un tube contenant des microbilles de céramiques et ajouter 150 µl de tampon d'extraction RIPA :
 - o 150 mM NaCl
 - o 1 % triton X-100
 - o 0,5 % sodium déoxycholate
 - o 0,1 % sodium dodécyl sulfate (SDS)
 - o 50 mM Tris
 - o Ph = 8
 - o Supplémenté d'inhibiteur de protéases (complete EDTA-free, Roche).
- Les échantillons sont alors broyés à l'aide d'un lyseur de tissus (bioruptor) 2 fois pendant 40 secondes à 25 000 vibrations par minute.
- Les échantillons sont placés sur glace pendant 20 minutes en vortexant 2 fois durant cet intervalle
- Centrifugation à 4°C pendant 30 minutes à 10 000 tours par minute
- Récupération du surnageant contenant les protéines
- Stockage à -20°C pour une courte durée ou -80°C pour une plus longue durée

Fiche n°8 : dosage de protéine de BRADFORD

Cette technique est une technique simple de dosage colorimétrique des protéines. Pour ce faire, on utilise une gamme étalon avec des concentrations protéiques connues grâce à la BSA. Le colorant utilisé est le bleu de Coomassie, qui, sous forme libre, est de couleur marron et quand il est lié à une protéine, est de couleur bleue.

Protocole

Préparation de la gamme étalon :

La gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de BSA contenant : 10 mg de BSA + 1ml d'eau : SM = 10 µg/µl

- [S6] = 2 µg/µl = 800µl H₂O + 200 µl SM
- [S5] = 1,5 µg/µl S5 = 850 µl H₂O + 150 µl SM
- [S4] = 1 µg/µl = 900 µl H₂O + 150 µl SM
- [S3] = 0,75 µg/l = 300 µl H₂O + 300 µl S5
- [S2] = 0,50 µg/l = 300 µl H₂O + 300 µl S4
- [S1] = 0,25 µg/l = 300 µl H₂O + 300 µl S2
- [S0] = sans BSA juste eau = Blanc

On dépose 2 µl dans chaque puits sur une plaque 96 puits.

Pour les échantillons :

On dépose 0,4 µl de protéines issues de l'extraction (fiche technique n°7) auxquels on ajoute 1,6 µl d'H₂O

Ajout du réactif Bradford :

- En fonction du nombre de puits, compter 200 µl par puits pour obtenir la Vf
- On effectue une dilution au 1/5^{ème} de Bradford dans de l'eau → Vf
- On ajoute 200µl du réactif Bradford dilué dans chaque puits
- On agite la plaque 96 puits sur plaque d'agitation pendant 1 minute.

Lecture de la spectrométrie à 595 nm :

Sur l'appareil de lecture de plaque 96 puits :

- Protocole OK / Pierre Bradford Ok / START
- Mettre la plaque sans couvercle / START
- Insérer une clé USB
- File / exporter format texte
- Retirer la plaque / fermer

Tableur :

GAMME ETALON		
[]	DO ₅₉₅	DO ₅₉₅ -DO _{blanc}

- Insertion / nuage de point
- Clic droit sur un point
- Ajouter une courbe de tendance linéaire
- Afficher l'équation $y=ax+b$
- Afficher le coefficient de détermination : R^2 doit être proche de 1

ECHANTILLONS						
N°	DO ₅₉₅	DO ₅₉₅ -DO _{blanc}	$x = \frac{(y - b)}{a}$	$x \times 5$ (Dilution)	Volume à prélever pour avoir 40 mg	Volume d'H ₂ O à ajouter pour Vf de 10 µl

Fiche n°9 : Western Blot

Cette technique permet d'observer des différences de quantité d'expression de protéines. Dans notre cas, cette technique nous aura surtout servi à faire la différence d'expression de protéines de la myéline entre des nerfs de rats normaux hétérozygotes et homozygotes.

Cette technique a pour principe la séparation des protéines en fonction de leurs tailles sur un gel d'acrylamide, suivie d'un transfert sur une membrane de nitrocellulose et enfin une incubation avec des anticorps spécifiques des protéines que l'on souhaite observer.

Protocole :

Préparation des échantillons protéiques préalablement extraits et dosés (fiches techniques 7 & 8) :

- Dans des tubes de PCR
- On prépare 10 µl de solution protéique contenant 40 ng de protéines (fiche technique n°8)
- Auxquels on ajoute 10 µl d'une solution tampon préparée au préalable :
 - o Dtt : dilution au 1/5^{ème} : 5 µl de DTT et 45 µl de tampon de charge (2X)

Chauffage des tubes au thermocycleur :

- Appuyer sur START
- Sélectionner Clémentine puis presser D puis sélectionner protéines et presser D de nouveau
- Dénaturation des protéines à 95°C pendant 5 minutes

Liste du matériel :

- Cuve
- Système courant (fil platine)
- Cassette (1 par gel) x 2
- Système de blocage

Préparation des gels

1^{er} gel : acrylamide (pour des protéines de 45-100 kDa) : augmenter le pourcentage pour des protéines plus petites. Attention suivre l'ordre du protocole suivant est primordial :

- Eau (permettant la dilution de l'acrylamide) 4,8 ml
- Acrylamide (gardé à 4°C, porter des gants) 2,5 ml
- Tris-HCL 8,8 (permettant l'équilibre du pH du gel, conservé à 4°C) 2,5 ml
- SDS 10 % (détergent moussieux, dénaturation) 0,1 ml
- APS (Ammonium Persulfate) (0,1 g à peser repris dans 1ml d'H2O) 0,1 ml
(dénaturation des protéine et initialisation de la polymérisation)
- TEMED (finalise la polymérisation) 0.004ml

Vt = 10 ml

Nous préparons 10 ml mais seulement 7,5 ml sont nécessaires dans chaque cassette. Le reste nous sert de témoin de polymérisation.

Avec une pipette de 10 ml : remplir la cassette (jusque sous l'avant dernier trait) en mettant l'appoint de la pipette dans l'angle de la cassette.

Ajouter de l'éthanol au-dessus pour aligner le gel.

Second gel : acrylamide à 4 %, il s'agit du gel de stacking permettant de retenir toutes les grosses protéines ou les débris cellulaires qui n'auraient pas été éliminés lors des phases de purification des protéines.

Dans l'ordre :

- Eau (permettant la dilution de l'acrylamide) 6,3 ml
- Acrylamide (gardé à 4°C, porter des gants) 1 ml
- Tris-HCL 8,8 (permettant l'équilibre du pH du gel, conservé à 4°C) 2,5 ml
- SDS 10 % (détergent moussieux, dénaturation) 0,1 ml

- Mettre le gel dans le tampon de transfert
- Rincer la cuve à l'eau du robinet
- Montage pour deux gels :
 - 3 éponges imbibées de tampon de transfert
 - 1 papier Wattman imbibé
 - Le gel
 - La membrane (utiliser une pince, puis chasser les bulles entre le gel et la membrane)
 - 1 papier
 - 1 éponge
 - 1 papier
 - L'autre gel
 - 1 membrane
 - 1 papier
 - 3 éponges
- Mettre le système bien imbriqué dans une cuve
- Remplir la cuve avec du tampon de transfert, commencer avec le tampon neuf (si besoin utiliser celui du bac à membrane)
- Transfert à ampérage 100 mA pendant 1h30 (voltage automatique)

Saturation de la membrane

Pour ce, faire nous utilisons soit de la BSA (Bovin Serum Albumine) ou du lait (caséine). Cette étape permet de combler les sites de fixation aspécifiques des anticorps sur la membrane. Le choix BSA ou lait s'opère grâce aux notices d'utilisation des anticorps que nous utiliserons par la suite.

Préparation de la BSA 5 % :

- Peser 5mg de BSA
- Diluer dans 100 ml de TBS tween :
 - o pH 7,4
 - o Tris base
 - o NaCl
 - o Tween 0,1 % (attention le tween mousse, c'est un détergent, prélever avec un cône coupé et laisser le cône dans la solution finale)
- Dans un tube de 50 mL mettre 10 mL de BSA 5 %

Préparation du lait à 4 % :

- Peser 4 g de lait
- Diluer dans 100 ml de TBS-tween :
 - o pH 7,4
 - o Tris base
 - o NaCl
 - o Tween 0,1% (attention le tween mousse, c'est un détergent, prélever avec un cône coupé et laisser le cône dans la solution finale)
- Dans un tube de 50 ml mettre 10 ml de lait à 4 %

- Mettre la membrane dans le tube (protéines vers l'intérieur)
- Mettre sur plaque d'agitation

Anticorps primaires

Dans un tube de 50 ml, mettre la membrane ainsi que l'anticorps primaire dilué à la concentration adaptée, soit dans le lait à 4 % ou dans la BSA à 5 %.

Mettre sur plaque d'agitation durant la nuit entière à 4°C

Lavages

Cette étape permet d'éliminer les anticorps non fixés

Dans un petit bac sur plaque d'agitation contenant du TBS tween, déposer la membrane.

Agiter pendant 15 minutes en changeant le TBS tween 4 à 5 fois.

Anticorps secondaires

On utilise lors de cette étape, un anticorps spécifique de l'espèce du premier anticorps.

Dans un tube de 50 ml, ajouter l'anticorps secondaire dilué, soit dans la BSA, soit dans le lait. Y déposer la membrane : toujours orienter les protéines vers l'intérieur du tube.

Incuber pendant une heure à température ambiante.

Lavages : idem

Révélation :

- Dans un tube à hémolyse, ajouter le réactif 1 et le réactif B en quantité volume = volume.
- Entourer le tube avec de l'aluminium car une fois que ces deux réactifs sont rassemblés, ils sont photosensibles
- Dans la salle Gbox du second étage :
 - o Logiciel : genesys :
 - Autocapture
 - Blot
 - Chemi
 - Série
 - Reagent : ECL plus
 - Cocher la case marqueur visible
 - Nombre d'images : 4 add contents of previous
 - Utiliser la même exposition pour toutes les images (45s) si aucune bande n'est visible, augmenter les temps d'expositions
 - o Verser dans un bac le mélange A/B
 - o Y déposer la membrane et laisser incuber pendant 1 minute
 - o Mettre la membrane sur un plateau noir dans la Gbox, il doit être droit
 - o Pour les photos, jouer avec les contrastes

- Enregistrer les images en Tif individally et/ou la totalité des photos prises dans un fichier GeneSys nous permettant de modifier les contrastes par la suite.
- Penser à récupérer les membranes et à fermer la Gbox avant de fermer le logiciel GeneSys
- Les membranes sont conservables à 4°C.

Fiche n°10 : test fonctionnel, analyse de la marche d'un rat sur une poutre

Le test de marche sur une poutre (Beam Walking Test) permet d'évaluer les performances sensori-motrices des animaux en examinant leur capacité à rester en équilibre et à marcher sur une poutre de 2 m de long et 3 cm de large. La poutre est fixée à 80 cm du sol. L'aire de départ est composée d'une plate-forme de 30 cm de côté surplombée d'une lampe de 50W produisant une lumière aversive. L'aire d'arrivée se compose d'une boîte noire de 30 cm de côté pouvant accueillir le rat, lui permettant ainsi de se cacher de la lumière. Les animaux sont tout d'abord soumis à une phase d'apprentissage qui dure 3 jours à raison de 3 essais par jour avant le test final. Chaque session comprend 3 essais consécutifs. Entre chaque essai, l'animal est placé 1 minute dans la boîte. Les performances des animaux sont évaluées grâce à une échelle de score empruntée à (Korenova et al., 2009) et adaptée. Les scores de latence (temps mis à traverser la poutre) et de fautes au niveau de la coordination motrice (patte dans le vide, chute) correspondent aux moyennes mesurées sur trois essais consécutifs. Un score total de 0 indique une grande facilité dans l'exécution de la tâche alors qu'un score de 10 signifie que l'animal est incapable de l'accomplir.

Latence (s)	Score	Nombre de fautes Moyenne de 3 essais	Score
≤4	0	≤8	0
>4 et ≤8	1	>8 et ≤16	1
>8 et ≤12	2	>16 et ≤24	2
>12 et ≤20	3	>24 et ≤40	3
>20	4	>40	4
L'animal n'est pas capable de réaliser la tâche	5	L'animal n'est pas capable de réaliser la tâche	5

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique du système nerveux.....	11
Figure 2 : Organisation schématique du système nerveux périphérique (D'après Neurosciences, Exploring the brain, 2nd édition, 2001).....	12
Figure 3 : Structure d'un neurone typique.....	14
Figure 4 : représentation schématique de la structure d'un nerf.....	14
Figure 5 : Direction de la propagation des influx nerveux moteurs et sensoriels (Tortora and Grabowski, 2001)	15
Figure 6 : Structure typique d'une synapse chimique	17
Figure 7 : Cellule de Schwann formant une gaine de myéline (Nave, 2010)	19
Figure 8 : Coupe longitudinale schématique d'une fibre myélinisée autour du nœud de Ranvier (Poliak and Peles, 2003)	20
Figure 9 : Schéma de sections longitudinales et transversales de fibres myélinisées	21
Figure 10 : Les trois types de jonctions autotypiques de la myéline non-compacte, les jonctions adhérentes, serrées et communicantes font intervenir la E-cadhérine interagissant respectivement avec la β -caténine, les claudines et les connexines. D'après Oguievetskaia et al., 2005	22
Figure 11 : Constituants cellulaire de l'endonèvre d'un nerf périphérique (Mizisin and Weerasuriya, 2011)	23
Figure 12 : Biopsie de nerf humain normal. (Richard et al., 2012)	24
Figure 13 : Principales glycoprotéines de la myéline compacte (Quarles, 2002)	25
Figure 14 : Schéma du processus de maturation des CS (Mizisin and Weerasuriya, 2011)	30
Figure 15 : Facteurs influençant la différenciation les CS vers un phénotype myélinisant (Jessen and Mirsky, 2005).....	31
Figure 16 : Deux programmes transcriptionnels s'affrontent au sein des CS pour le contrôle de l'engagement dans la myélinisation (Svaren and Meijer, 2008).....	32
Figure 17 : Le chromosome 17, la région entourant PMP22, le gène PMP22	34
Figure 18 : Comparaison des niveau d'expression des ARNm des 6 variants de PMP22 au sein de 3 différents tissus (Visigalli et al., 2016).....	35
Figure 19 : Comparaison des séquences d'acides aminés de la protéine PMP22 entre différentes espèces. (Humain, Chimpanzé, rat, souris, xénope et poisson zèbre).....	36
Figure 20 : Représentation topologique de la protéine PMP22	37
Figure 21 : Localisation de l'expression de la protéine PMP22	38
Figure 22 : représentation schématique des 3 types de trans-interactions entre PMP22 et P0 dans la myéline périphérique (Hasse et al., 2004).....	40
Figure 23 : Représentation de la protéine PMP22 avec les mutations ponctuelles connues.....	42
Figure 24 : Section transversale ultrafine de fibres nerveuses périphériques marquées grâce au protocole immunogold avec un anticorps anti-PMP22 (Vallat et al., 1996).....	43
Figure 25 : Micrographe électronique de sections transversales de nerfs de patients normaux HNPP et CMT1A ainsi qu'une photo d'une fibre isolée.....	44
Figure 26 : Fragments du Cosmide contenant le gène PMP22	49
Figure 27 : structure générale d'une intégrine	51
Figure 28 : structure des domaines transmembranaires des sous-unités α II (bleu) et β 3 (rouge).	54

Figure 29 : Régulation de la conformation des intégrines.....	55
Figure 30 : Distribution des récepteurs de la matrice extracellulaire durant le développement des cellules de Schwann (Berti et al., 2006).....	57
Figure 31 : La structure du complexe $\alpha 6\beta 4$ et l'assemblage de l'hémidesmosome.....	59
Figure 32 : activation de la voie PI3-K par $\alpha 6\beta 4$	60
Figure 33 : Schéma de la voie de signalisation PI3-K activée durant la myélinisation.....	61
Figure 34 : Représentation schématique de l'insertion du gène rapporteur Lac -Z en remplacement des exons 2 et 3 de PMP22 (Amici et al., 2006a).....	64
Figure 35 : Coupes ultrafines de nerfs de souris déficientes en PMP22 (Fortun et al., 2006).....	65
Figure 36 : Section transversale ultrafine de fibre nerveuse de souris sans PMP22.....	66
Figure 37 : Structure primaire (a), secondaire (b), tertiaire (c) et quaternaire (d) d'une protéine.....	143
Figure 38 : Structure cristallographique du domaine extracellulaire de CasR humaine.....	181
Figure 39 : Alignement final de PMP22 humaine avec la claudine 15 murine utilisée pour l'homologie modèle.....	181
Figure 40 : Structure tridimensionnelle de la protéine PMP22 (Mittendorf et al., 2014a).....	182
Figure 41 : Pourcentage d'individus normaux, hétérozygotes et homozygotes en 14 croisements de 2 rats hétérozygotes (Hom : homozygotes ; Het : hétérozygotes ; Wt : sauvages).....	186
Figure 42 : Photo de 3 ratons de la même portée, tous 3 âgés de 3 mois.....	186
Figure 43 : graphique représentant la réussite des rats au test de la poutre en fonction de leur âge.....	187
Figure 44 : coupe semi fine de nerfs de rats hétérozygotes moyennement et sévèrement affectés.....	188
Figure 45 : intégrines connues pour être exprimée dans le SNP.....	189
Figure 46 : Classification fonctionnelle des intégrines et changements d'expression génique observés dans la famille des intégrines en condition de suppression du gène ITGB4 codant la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ (Knyazev et al., 2015).....	190
Figure 47 : représentation schématique de l'activation du gène de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ et de PMP22 par les facteurs de transcription TEAD1, YAP et TAZ.....	192
Figure 48 : Activation spécifique de la voie PI-3K et SHC par le domaine intracytoplasmique de la sous-unité d'intégrine $\beta 4$ d'intégrine (Giancotti and Tarone, 2003b).....	193
Figure 49 : Représentation Schématique de la voie de signalisation PI3-K durant la myélinisation.....	194
Figure 50 : Cartographie des mutations ponctuelles de PMP22 responsables soit de CMT1A (en violet), soit d'HNPP (en vert).....	196
Figure 51 : Membrane POPC avec son solvant.....	198
Figure 52 : 1-palitoyl-2oleoyl-phosphatidylcholine.....	198
Figure 53 : Inclusion de la structure tridimensionnelle de PMP22 dans la membrane.....	199
Figure 54 : Projet de double bicouche bilipidique.....	200
Figure 55 : représentation schématique des 3 types de trans-interactions entre PMP22 et P0 dans la myéline périphérique (Hasse et al., 2004).....	200
Figure 56 : Applications des cellules IPS (Karagiannis and Eto, 2016).....	202

Table des tableaux

Tableau 1 : liste des 6 variants de PMP22 humain	35
Tableau 2 : Liste des animaux modèles avec une mutation sur le gène PMP22 ou des variations du nombre de copies de PMP22.	48
Tableau 3 : Liste des sous-unités α et β des mammifères	52
Tableau 4 : Les 16 intégrines principales parmi les 24 rencontrées chez les vertébrés	53
Tableau 5 : Mutations de PMP22 entraînant soit une HNPP, soit un CMT1A. Les mutations ponctuelles non publiées sont présentées en rouge. (TM domaine transmembranaire, EC domaine extracellulaire, IC domaine intracellulaire).	197

Résumé

Des modifications du gène *PMP22* (Peripheral Myelin Protein 22) sont responsables de neuropathies du système nerveux périphérique : l'Hypersensibilité à la Pression (HNPP : Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsy) lorsqu'il est délété, CMT1A (Charcot-Marie-Tooth type 1A) lorsqu'il est dupliqué et CMT1E ou HNPP lors de mutations ponctuelles. Cependant, le rôle de la protéine PMP22 dans ces neuropathies demeure obscur. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux partenaires d'interactions potentiels de PMP22 : l'intégrine $\alpha6\beta4$ (un récepteur des laminines), pourrait être impliqué dans le CMT1A. Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de rat transgénique portant des copies supplémentaires de *PMP22* de souris. Chez ce modèle, nous avons mis en évidence des variations d'expression génique des intégrines, ainsi qu'une mauvaise localisation cellulaire de celles-ci. Ces variations des niveaux d'expression des intégrines sont les témoins d'un retard de la maturation des cellules de Schwann myélinisantes, expliquant la diminution de l'épaisseur des gaines de myéline, observée chez les rats CMT1A. Dans un second temps, nous avons étudié le cas particulier d'un patient sans expression de PMP22, en raison de deux mutations composites sur les deux allèles de *PMP22*. Nous avons observé que l'absence de PMP22 chez l'homme entraîne une absence complète de myéline due à un blocage de l'initialisation de la myélinisation lors de la formation du mésaxone. Dans un troisième temps, nous avons effectué une étude comparative de modèles animaux et de patients atteints de CMT1A / 1E et d'HNPP permettant de valider l'utilisation de tels modèles dans l'étude de ses neuropathies. Enfin, nous nous sommes intéressés d'un point de vue informatique à la structure tridimensionnelle de différentes protéines dont PMP22 grâce à la dynamique moléculaire. Ce modèle tridimensionnel de PMP22 est le point de départ de l'étude des mutations ponctuelles ainsi que des interactions de PMP22 avec son environnement. Grâce aux animaux modèles et à l'étude de patients, nous avons montré le rôle indispensable de PMP22 dans l'initialisation de la myélinisation ainsi que son effet sur les intégrines dans le CMT1A. L'utilisation de modèles informatiques tridimensionnels créés de PMP22 permettra de comprendre les effets des mutations ponctuelles sur sa structure, et ses interactions.

Mots clés : PMP22, Intégrines, CMT1A, HNPP, modèle animal, modèle informatique

Abstract

Interactions study of PMP22 protein with integrins in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A pathogenesis
Changes in the *PMP22* gene (Peripheral Myelin Protein 22) are responsible for peripheral nervous system neuropathies: Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsy (HNPP) when *PMP22* is deleted, Charcot Marie Tooth disease subtype 1A (CMT1A) when *PMP22* is duplicated and CMT1E or HNPP when point mutations are present on the *PMP22* gene. However, the PMP22 role in these neuropathies remains unclear. Firstly, we studied one of the PMP22 interaction partner: the $\alpha6\beta4$ integrin (a laminin receptor), which could be involved in the CMT1A. During this study, we used a transgenic rat model carrying supplementary copies of *PMP22* gene from mouse. With this model, we showed variations of expression of integrins genes and a mislocalization of integrins proteins. These variations of integrins witnesses a delay in myelinating Schwann cells maturation, explaining the reduction of myelin sheath thickness observed on CMT1A rats. In a second time, we studied the case of a patient without PMP22 expression, carrying compound mutations one the two alleles of *PMP22*. We showed that the lack of PMP22 on human leads to a complete lack of myelin due to a blocking in mesaxon formation. In a third time, we conducted a comparative study of animal models and patients with CMT1A / 1E and HNPP. This study allows us to validate the use of such models in the study of neuropathies. Finally, thanks to computational tools we studied the three-dimensional structure of different protein, including PMP22 by using molecular dynamics. This three-dimensional model is the starting point of point mutations study as well as PMP22 interactions with its environments. With animal models and through the study of patients, we have demonstrated the indispensable role of PMP22 in myelin initiation as well as, its effect on integrins expression in CMT1A. The use of PMP22 three-dimensional computational model will help us to understand effects of point mutation on PMP22 structure and interactions.

Keywords: PMP22, Integrins, CMT1A, HNPP, Animal model, Computational model