



**HAL**  
open science

# Caractérisation des défauts cérébraux chez le modèle murin d’Incontinentia Pigmenti, maladie génétique liée à la voie NF-kB

Anna Senegas

► **To cite this version:**

Anna Senegas. Caractérisation des défauts cérébraux chez le modèle murin d’Incontinentia Pigmenti, maladie génétique liée à la voie NF-kB. Neurosciences. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV075 . tel-01685368

**HAL Id: tel-01685368**

**<https://theses.hal.science/tel-01685368v1>**

Submitted on 16 Jan 2018

**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.

## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Neurosciences, Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Anna SENEGAS**

Thèse dirigée par **Gilles COURTOIS**

préparée au sein du laboratoire **Biologie à Grande Echelle** de  
**l'Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble**  
**(BIG), CEA-Grenoble**  
dans l'École Doctorale **Chimie et Sciences du Vivant (ED218)**

## **Caractérisation des défauts cérébraux chez le modèle murin d'Incontinentia Pigmenti, maladie génétique liée à la voie NF- $\kappa$ B**

Thèse soutenue publiquement le **20 septembre 2016**,  
devant le jury composé de :

**Mr Yves DE KEYZER**

Directeur de Recherche, Paris, France, Rapporteur

**Mr Jean-Luc POYET**

Directeur de Recherche, Paris, France, Rapporteur

**Mme Sandrine HUMBERT**

Directrice de Recherche, Grenoble, France, Examinatrice et Présidente

**Mr Fabrice AGOU**

Directeur de Recherche, Paris, France, Examineur

**Mr Gilles COURTOIS**

Directeur de Recherche, Grenoble, France, Directeur de Thèse





## **Remerciements scientifiques :**

Je tiens à remercier tout d'abord, le Dr Gilles Courtois de m'avoir sélectionnée au concours Irtelis pour venir réaliser une thèse au CEA-Grenoble. Merci pour ton expertise scientifique pointue.

Je tiens aussi à remercier le Dr Sandrine Humbert d'avoir acceptée d'être examinatrice et présidente de mon jury de thèse. Merci aux Dr Yves de Keyzer et Jean-Luc Poyet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse et merci aux Dr Fabrice Agou et Jean-Christophe Deloulme d'avoir été dans mon Comité de Suivi de Thèse : vos commentaires toujours pertinents m'ont permis d'avancer au mieux dans mon travail.

Je tiens aussi à remercier les Dr Annie Andrieux et Eric Denarier pour leur aide et leur expertise dans mon travail. Nos réunions ensemble m'ont permis de développer des pistes scientifiques très intéressantes.

Je remercie aussi les zootechniciens de BIG, Soumalamaya Bama, Nicolas Chaumontel et Irene Jeannin, pour leur travail et leur sympathie, j'ai toujours apprécié venir à l'animalerie pour discuter avec eux de mes expériences. De même, merci au Dr Jean-Philippe Kleman pour son aide et sa bonne humeur dans mes études 3D sur Imaris, ce fut un plaisir de travailler avec toi. Je remercie aussi Morgane Belle et David Godefroy pour leur aide et leurs conseils sur iDISCO. Je remercie par ailleurs le Dr Alain Chedotal d'avoir accepté mes brefs séjours au sein de son équipe.

Je souhaiterais aussi remercier l'association Incontinentia pigmenti France (IPF) pour leur gentillesse lors de nos différentes rencontres, que ce soit au cours du week-end des familles ou lors de réunions. Merci à vous d'avoir accepté de financer mes recherches sur Incontinentia pigmenti.

Je souhaiterais aussi remercier Cyril Goudet et Sylvie Claeysen qui m'ont permis de découvrir le monde de la Recherche et des laboratoires, tôt dans mon cursus. Merci pour vos conseils, votre gentillesse et pour tout ce que vous m'avez apporté. Je remercie aussi Nadine Mestre-Francès et Stéphanie Sabatier qui m'ont fait adorer les Neurosciences et l'étude du comportement animal.

J'ai par ailleurs, une pensée pour Didier Grunwald, qui nous a tous, un jour au moins, aidé à voir la beauté de nos expériences de microscope.

## Remerciements personnels :

Je tiens tout d'abord à remercier mes parents et mes sœurs, qui ont fait de leurs encouragements un leitmotiv permanent, qui m'a toujours aidé à avancer quels que soient les obstacles. John et Petit Chou, vos surnoms passent à la postérité, merci pour votre humour, vos sourires et votre soutien. J'espère moi aussi être aussi « helpful » que vous l'êtes pour moi. Je remercie aussi ma famille au sens plus étendu, qui avec sa bonne humeur de chaque instant et parfois, son accent, m'a permis d'avoir le soleil à jamais dans mon cœur, même dans la cuvette grenobloise. Je vous aime.

Laetitia, ce paragraphe pourrait tout aussi bien t'aller, mais je préfère t'en dédier un à toi toute seule, pour ces dix années avec toi de rires, sourires, d'histoires rocambolesques et surtout d'amitié à l'épreuve de tout. Une amitié comme ça, il n'y en a qu'une par vie. Alors, « vers l'infini et au-delà », n'a jamais eu autant de sens.

Jacques, merci à toi pour nos discussions philosophiques, nos promenades et le Lindy-Hop : garde ta façon de penser et ton intelligence, car c'est trop rare en ce bas-monde pour le perdre. J'en profite pour remercier mes amis grenoblois Ks (ma future CEO), Morgane (ma future Responsable scientifique), Shak pour son déhanché, Geoffrey parce que « Ici, c'est Montpellier », Tomtom pour ses épisodes romantiques à rebondissements. Merci aussi à Naila et Souad pour leur soutien, leur bonne humeur et nos moments ensemble. Je remercie bien sûr Dominique, Florent, Geoffroy, Guillaume, Judy, Maxime, Sophie, Veronica pour nos rendez-vous hebdomadaires qui rendent toujours le cœur plus léger à la fin du repas... Et mes murs/ sols plus sales (Crêpes, crème chantilly...). Je remercie aussi les gens d'AITAP et de Glob'Alps pour ces 3 ans vraiment sympa à vos côtés ! Chebu, tu as aussi tes remerciements pour m'avoir aidé dans les moments pré-thèse car tu as supporté pas mal de choses.

Je remercie bien sûr ma Cathy, en qualité de maitre zen (la feuille, les plumes de canard... Des enseignements pour la vie !), pour ses conseils pro, perso... Et même de traduction ! Ton sourire était une joie de chaque matin ! Je remercie aussi Alice, ma (ex-) postdoc préférée mais expatriée, pour son aide au labo mais aussi nos repas grenoblois car Grenoble, sans toi, c'est quand même moins sympa ! Je te souhaite le meilleur pour la suite, en espérant que nos chemins se recroiseront bientôt. J'en profite aussi pour remercier l'équipe Gen&Chem passée et présente pour les bons moments passés ensemble, en apéro, gâteaux, raclette et randonnée : je suis tombée dans la parfaite équipe pour ça !

Et puisque c'est d'usage et que moi, je n'aurais jamais ton dernier paragraphe de remerciements, merci à toi, « Lava » de soutien, d'humour et d'amour. Merci d'être là et de toujours me redonner le sourire, quel que soit le problème.

Bien sûr, tous ces remerciements ne sont que des mots, qu'une infime partie de ce que je dois à chacun, soyez-en sûrs.

*« À l'école, quand on m'a demandé d'écrire ce que je voulais être plus tard, j'ai répondu "heureux". Ils m'ont dit que je n'avais pas compris la question, je leur ai répondu qu'ils n'avaient pas compris la vie. »*

John Lennon



<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>10</b>
<b>ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....</b>	<b>12</b>
<b>PREAMBULE.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>18</b>
<b>I. La voie de signalisation NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>18</b>
<i>A. Définition .....</i>	<i>18</i>
1. La protéine NF- $\kappa$ B .....	18
2. Les membres de la famille NF- $\kappa$ B.....	18
3. Les membres de la famille I $\kappa$ B.....	19
<i>B. L'activation de NF-<math>\kappa</math>B par la voie canonique.....</i>	<i>20</i>
1. La voie canonique .....	20
2. Les principaux constituants de la voie NF- $\kappa$ B canonique.....	22
(a) Le complexe IKK.....	22
(b) Le complexe TAK.....	24
<i>C. L'activation de NF-<math>\kappa</math>B par la voie non canonique.....</i>	<i>24</i>
<i>D. Le mécanisme de l'ubiquitination.....</i>	<i>25</i>
1. L'ubiquitine.....	25
2. Le processus d'ubiquitination.....	26
3. Les différentes familles d'E3.....	27
4. Les différents types d'ubiquitination .....	28
(a) La monoubiquitination .....	28
(b) La polyubiquitination.....	29
5. La déubiquitination .....	30
<i>E. Mécanismes moléculaires d'activation .....</i>	<i>32</i>
1. Activation de NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$ .....	32
2. Activation de NF- $\kappa$ B par le CD40-L.....	34
<i>F. Les différents rôles de la voie NF-<math>\kappa</math>B dans l'organisme .....</i>	<i>35</i>
1. NF- $\kappa$ B dans le processus inflammatoire.....	36
2. NF- $\kappa$ B dans le processus immunitaire.....	37
3. NF- $\kappa$ B dans le développement des cancers .....	38
<i>G. Les modèles murins d'étude de la voie NF-<math>\kappa</math>B.....</i>	<i>38</i>
<b>II. Les maladies génétiques associées à la voie NF-<math>\kappa</math>B canonique.....</b>	<b>40</b>
<i>A. Maladies associées à NEMO .....</i>	<i>40</i>
1. Incontinentia pigmenti.....	40
(a) Historique.....	40
(b) Signes cliniques .....	41
(c) Bases génétiques et moléculaires .....	45
(d) Le phénomène de lyonisation et son impact dans IP.....	50
(e) Physiopathologie .....	52



(f) Dépistage de la maladie et traitements.....	54
2. (XL-)EDA-ID.....	55
3. OL-EDA-ID .....	58
4. Immunodéficiences .....	59
<i>B. Maladie associée à IKK1</i> .....	59
<i>C. Maladie associée à IKK2</i> .....	62
<i>D. Maladie associée à I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></i> .....	63
<i>E. Maladies associées à NF-<math>\kappa</math>B1</i> .....	64
<i>F. Maladie associée à RelA</i> .....	65
<b>III. La voie NF-<math>\kappa</math>B dans le cerveau</b> .....	<b>67</b>
<i>A. Les différentes cellules du cerveau</i> .....	67
<i>B. L'activité de NF-<math>\kappa</math>B dans le cerveau</i> .....	69
1. La localisation cérébrale de NF- $\kappa$ B actif durant le développement .....	69
2. Un rôle mal défini dans le développement cérébral embryonnaire.....	71
3. La signalisation NF- $\kappa$ B dans le neurone.....	72
<i>C. Les fonctions de NF-<math>\kappa</math>B dans le cerveau</i> .....	75
1. Rôle dans les neurones .....	75
(a) Rôle dans la plasticité synaptique et dendritique.....	75
(b) Le rôle de NF- $\kappa$ B dans la neurogénèse et la neuroprotection chez l'adulte.....	79
2. Rôle dans les cellules non-neuronales du cerveau .....	81
3. Rôle dans la myélinisation.....	83
<i>D. Conséquences de l'activation perturbée de NF-<math>\kappa</math>B dans le cerveau</i> .....	83
1. Dans les processus pathologiques corticaux .....	84
2. Dans la myélinisation .....	86
3. Dans le vieillissement.....	88
<b>RESULTATS &amp; DISCUSSION</b> .....	<b>90</b>
I. Système analysé .....	90
II. Analyse des cerveaux par IRM .....	91
<i>A. Etude sur souris NemoIP</i> .....	91
<i>B. Etude sur souris Nestin-Cre/Nemo</i> .....	96
III. Analyse des cerveaux IP par iDISCO.....	98
<b>MATERIELS &amp; METHODES</b> .....	<b>104</b>
I. Lignées murines .....	104
<i>A. La lignée Cre-deleter</i> .....	104
<i>B. La lignée Nemofl</i> .....	104
<i>C. La lignée NemoIP</i> .....	104
<i>D. La lignée Nestin-Cre/Nemo</i> .....	105
II. Analyse par Imagerie à Résonance Magnétique .....	105

<i>A. Préparation des échantillons à P7</i> .....	105
.....	106
<i>B. Préparation des échantillons à E18</i> .....	106
<i>C. Protocoles d'IRM</i> .....	107
III. La technique de mise en transparence des échantillons.....	110
<i>A. La technique iDISCO</i> .....	110
1. Principe .....	110
2. Anticorps utilisés & spécificité.....	111
<i>Bibliographie</i> .....	114
<b>ANNEXES .....</b>	<b>136</b>
Annexe 1 :.....	137
Annexe 2 :.....	139
Annexe 3 :.....	140
Annexe 4 :.....	141
 Annexes bibliographiques	
Annexe 5 : .....	142
Annexe 6 : .....	158
Annexe 7 : .....	192



## Liste des figures

Figure 1. Les différents membres de la famille NF-κB.....	18
Figure 2. Les différents membres de la famille IκB.....	20
Figure 3. Activation de NF-κB par la voie canonique.....	21
Figure 4. Les sous-unités du complexe IKK.....	22
Figure 5. Localisation du gène codant pour NEMO.....	23
Figure 6. Activation de NF-κB par la voie non canonique.....	25
Figure 7. Structure tertiaire de l'ubiquitine.....	26
Figure 8. Le processus d'ubiquitination.....	27
Figure 9. Les différents types d'ubiquitination.....	28
Figure 10. Les différents types d'ubiquitination et exemples de leurs fonctions cellulaires.....	29
Figure 11. Activation de la voie canonique de NF-κB par TNF-α.....	33
Figure 12. Activation de la voie non canonique de NF-κB par CD40-L.....	35
Figure 13. Les quatre stades cutanés d'Incontinentia Pigmenti.....	42
Figure 14. Signes dentaires et ophtalmologique d'IP.....	42
Figure 15. IRM d'atteintes cérébrales dues à Incontinentia pigmenti.....	44
Figure 16. Réarrangements des loci de NEMO et de son pseudogène.....	46
Figure 17. Délétions chromosomiques affectant le gène NEMO dans IP.....	47
Figure 18. Les mutations tronquantes de NEMO associées à IP.....	49
Figure 19. Les mutations ponctuelles de NEMO associées à des maladies humaines.....	49
Figure 20. Le phénomène de lyonisation.....	50
Figure 21. La voie de signalisation ectodysplasine/EDAR.....	57
Figure 22. Les mutations tronquantes de NEMO associées à EDA-ID.....	58
Figure 23. Les mutations des composés de la voie canonique d'activation de NF-κB, hors NEMO, associées à des maladies humaines.....	61
Figure 24. Principaux signes cliniques retrouvés dans les maladies humaines associées à la voie canonique d'activation de NF-κB.....	66
Figure 25. Les principales cellules du cerveau exprimant NEMO.....	68
Figure 26. Activation de NF-κB au stade E13 chez la souris.....	69
Figure 27. Schéma d'un neurone.....	73
Figure 28. Localisation et signalisation de NF-κB dans les neurones.....	74
Figure 29. L'expression dépendante de NF-κB des protéines impliquées dans la plasticité synaptique.....	76
Figure 30. Rôle de la phosphorylation de RelA dans la croissance axonale.....	78
Figure 31. Le rôle de NF-κB dans les neurones.....	81
Figure 32. Rôle de NF-κB dans différentes cellules du cerveau.....	85
Figure 33. Les signaux de régulation de la dé- et remyélinisation dans le SNC.....	87
Figure 34. Portée issue d'un croisement $X^{cre}/Y \times X^{Nemofl}/X^{Nemofl}$ .....	90
Tableau 1. Hétérogénéité du phénotype cutané chez les souris IP à P7.....	91

Figure 35. Volume réduit des cerveaux IP corrélé avec le retard de développement des souris .....	92
Figure 36. Calcul des ratios de développement des souris .....	92
Figure 37. Anomalies cérébrales limitées affectant les souris IP .....	93
Figure 38. Analyse comparée d'IP223 avec les protocoles IRM T1 et T2.....	93
Figure 39. Fortes anomalies cérébrales affectant les souris IP .....	94
Figure 40. Etendue des anomalies cérébrales affectant les souris IP .....	95
Figure 41. Anomalies cérébrales affectant les souris IP à E18 .....	95
Figure 42. Stratégies d'inactivation de <i>Nemo</i> .....	96
Figure 43. Absence de lésions cérébrales chez les souris mâles Nestin-Nemo. ....	97
Figure 44. Absence de lésions cérébrales chez les souris femelles Nestin-Nemo.....	98
Figure 45. Analyse iDISCO 3D des microvaisseaux d'un cerveau de souris P7 avec les anticorps anti-collagen IV et anti-CD31. ....	99
Figure 46. Etude comparative d'un cerveau NemoIP par l'utilisation de différents protocoles.....	99
Figure 47. Zone montrant une large proportion de "string vessels" dans un cerveau murin <i>NemoIP</i> à P7. ....	100
Figure 48. Génotypage NemoIP .....	106
Figure 49. Génotypage SRY. ....	106
Tableau 2. Paramètres de la séquence IRM de localisation (FLASH) .....	107
Tableau 3. Paramètres de la séquence IRM de pondération T1 (3D FLASH) .....	108
Tableau 4. Paramètres de la séquence IRM de diffusion T2 (3D TURBORARE) .....	109
Figure 50. Les différentes étapes de la technique iDISCO .....	110
Figure 51. Test de spécificité du marquage collagenIV en technique iDISCO.....	111
Figure 52. Test de spécificité du marquage CD31 en technique iDISCO .....	112

## *Abréviations et acronymes*

AD-EDA-ID: Autosomal-Dominant EDA-ID  
ADAM: A Disintegrin And Metalloprotease  
ADNF: Activity-Dependent Neurotrophic Factor  
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
ANK : Ankyrin Domain  
APC: Antigen-Presenting Cells  
APP: Amyloid Precursor Protein  
BCR: B-Cell Receptor  
BDNF: Brain-Derived Nerve Factor  
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique  
BHT : HydroxyToluène Butylé  
BPS: Bartsocas-Papas syndrome  
cIAP: cellular Inhibitor of Apoptosis  
Ca<sup>2+</sup>: ion Calcium  
CamKII: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein Kinase II  
CDK6: Cyclin-Dependant Kinase 6  
CMV: Cytomegalovirus  
CNV: Copy Number Variation  
CREB: Cyclic AMP Response Element Binding protein  
CVID: Commun Variable ImmunoDeficiency  
DNTP: Desoxynucleotid Triphosphate  
DD: Death Domain  
DG: Gyrus Dentelé  
DNMT1: DNA MethylTransferase  
DUB: DeUBiquitinating enzymes  
Eda: Ectodysplasine  
EDA-ID: Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with ImmunoDeficiency  
EDAR: EctoDysplasin A Receptor  
EDARADD: EDAR-Associated Death Domain  
FADD: Fas-Associated Death Domain  
FDT: Facteur Déterminant des Testicules

FGF: Fibroblast Growth Factor  
FLASH: Fast Low Angle SHot  
G6PD : Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase  
GAD65: Glutamate Decarboxylase 65  
GpI-mGluRs : Récepteur Métabotrope de type I du Glutamate  
GRR: Glycin-Rich Region  
HBM: High Bone Mass  
HECT: Homologous to E6-associated protein C-Terminus  
HSV: Herpes Simplex Virus  
IF: Immunofluorescence  
IFN: Interferon  
IGB: Institut de Génétique et de Biophysique  
IGF: Insulin-like Growth Factor  
IGFBP3: Insulin-like Growth Factor-2 Binding Protein-3  
iGluR: Récepteur Ionotrope au Glutamate  
IKK: I $\kappa$ B Kinase  
IP: Incontinentia Pigmenti  
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique  
JAMM: JAB1/PAD1/MPN-domain-containing Metalloenzymes  
JNK: c-Jun kinase  
KO: Knock-Out  
LCR: Liquide Céphalo-Rachidien  
LPPS: Lethal-Type Popliteal Pterygium Syndrome  
LPS: Lipopolysaccharide  
LTD: Long-Term Depression  
LTP: Long-Term Potentiation  
L-VGCC: Voltage- Gated Calcium Channels  
LUBAC: Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex  
LZ: Leucine Zipper  
MAG: Myelin-Associated Glycoprotein  
MAP: Microtubule-Associated Proteins  
MAPK: MAP Kinases

MCAO: Middle Cerebral Artery Occlusion  
MCT1: MonoCarboxylate Transporter 1  
MER67B: Medium Reiterated 67B  
mGluR: Récepteur Métabotropique au Glutamate  
MJD: Machado Joseph Disease  
MKK: Mitogen-activated protein (MAP) Kinase Kinases  
NAHR: NonAllelic Homologous Recombination  
NBD: NEMO Binding Domain  
NEMO: NF- $\kappa$ B Essential MOdulator  
NFKBIA: Nuclear Factor-Kappa-B-Inhibitor Alpha  
NGF: Nerve Growth Factor  
NHEJ: Non Homologous End-Joining  
NIK: NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase  
NK: Natural Killer (cellule)  
NLS: Nuclear Localization Signal  
NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique  
NMDAR: N-Methyl-D-Aspartate Receptor  
NUB: NEMO ubiquitin binding Domain  
OET: Transition Oocyte-Embryon  
OMgp: Oligodendrocyte-Myelin glycoprotein  
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man  
OPC: Oligodendrocytes Precursor Cells  
OTU: Ovarian Tumor proteases  
p75<sup>NTR</sup>: Récepteur commun aux Neurotrophines  
PAMPS: Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PKA: Protéine Kinase A  
PKC: Protein Kinase C  
PSD: PostSynaptic Density protein  
RAM: Radial Arm Maze  
RARE: Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement  
RCPG: Récepteur Couplé aux Protéines G



RHD: Rel Homology Domain  
RING: Really Interesting New Gene  
RIPK: Receptor-Interacting Protein Kinase  
RSC: Receptor Signaling Complex  
SAP97: Synapse-Associated Protein 97  
SCID: Déficit Immunitaire Combiné Sévère  
SDD:  $\alpha$ -helical Scaffold/Dimerization Domain  
SNC: Système Nerveux Central  
SPAR: SPine-Associated Rap-specific GTPase-activating protein  
SPS-BM: Spatial-Pattern-Separation-Barnes Maze  
SRY: Sex-determining Region of Y chromosome  
SVZ: SubVentricular Zone  
TAB: TAK1 Binding Protein 1  
TAD: Transcription Activation Domain  
TAK: TGF $\beta$  Activated Kinase  
TCR: T-Cell Receptor  
THF: Tetrahydroflurane  
TLR: Toll-like Receptor  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TRAF: TNF Receptor-Associated Factor  
Trk: Tyrosine Receptor Kinase  
UCH: Ubiquitin C-terminal Hydrolase  
USP: Ubiquitin Specific Peptidase  
WT: Wild-Type  
XCI: X Chromosome Inactivation  
XCIF: *Trans*-acting X Chromosome Inactivation Factors  
Xist: X Inactive Specific Transcript  
XL-EDA-ID: X chromosome-Linked EDA-ID  
ZF : Zinc Finger

## *Préambule*

La première observation d'Incontinentia pigmenti (IP), une génodermatose liée au chromosome X, a été réalisée par le médecin britannique Garrod en 1906. Ce n'est qu'en 2000 qu'elle a été liée à la mutation du gène codant pour la protéine NEMO. Cette protéine est essentielle à l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, qui joue de nombreux rôles dans le corps humain, tels que dans l'immunité et la régulation de l'inflammation et de l'apoptose. IP ne touche que les femmes et engendre, en plus de l'atteinte cutanée, des problèmes dentaires, oculaires et cérébraux. Les fœtus mâles portant NEMO muté ne peuvent survivre et subissent un avortement spontané.

En dehors de certaines manifestations cliniques d'Incontinentia pigmenti qui peuvent aujourd'hui faire l'objet d'améliorations esthétiques ou de chirurgie, les problèmes liés aux défauts cérébraux d'IP sont difficilement soignables et peuvent être très handicapants. De plus, alors que les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette pathologie commencent à être bien compris au niveau cutané, peu d'informations sont connues concernant les manifestations cérébrales. En effet, en dehors des études cliniques sur les cerveaux des patientes atteintes d'Incontinentia pigmenti, aucun travail n'a jamais été réalisé pour comprendre d'où proviennent les lésions cérébrales observées chez ces dernières.

Il est donc aujourd'hui important d'élucider l'origine de ces anomalies cérébrales pour envisager un blocage de leur apparition/développement.

Nous étudions la physiopathologie de la maladie au niveau du système nerveux central pour en apprendre davantage sur les fonctions de NF- $\kappa$ B dans ce compartiment. Nous essayons notamment d'identifier le(s) type(s) de cellules cérébrales responsable(s) du déclenchement du processus pathogène, comme le font les kératinocytes de la peau. Nous voulons aussi définir si le développement des anomalies au niveau du système nerveux central (SNC) est prénatal ou si ce mécanisme se déclenche à la naissance, comme le phénotype cutané. Pour cela nous utilisons un modèle murin de la maladie.

Dans la première partie de mon introduction, je décrirai la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, en présentant ses composants et ses modes d'activation. Je présenterai notamment le processus d'ubiquitination, nécessaire à l'activation de NF- $\kappa$ B. Je résumerai ensuite brièvement les rôles majeurs de la voie NF- $\kappa$ B dans le corps humain.

La deuxième partie de mon introduction portera sur les différentes maladies génétiques associées à la voie NF- $\kappa$ B, en me focalisant plus particulièrement sur Incontinentia pigmenti, maladie dont je décrirai en détail les bases génétiques et les caractéristiques pathologiques.

Enfin, je réaliserai un état des lieux sur les rôles fermement établis de la voie NF- $\kappa$ B dans le cerveau, ainsi que ceux plus controversés.

Dans la section Résultats, je présenterai mon étude concernant l'utilisation d'un modèle murin pour étudier les défauts cérébraux associés à IP. Mon travail sera finalement discuté dans le contexte de données publiées récemment, concernant l'origine possible des anomalies cérébrales d'IP.

## Introduction

### I. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B

#### A. Définition

##### 1. La protéine NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est une protéine ubiquitaire appartenant à la famille des facteurs de transcription. Elle participe aux réponses liées à l'inflammation, à l'immunité et à la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire (Karin M 2000) (Hayden MS 2008). Dans la cellule au repos, elle est maintenue inactive dans le cytoplasme, associée à l'inhibiteur I $\kappa$ B. A la suite d'une stimulation, elle migre dans le noyau pour réguler ses gènes-cibles.

##### 2. Les membres de la famille NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un terme générique désignant une famille de protéines homo- ou hétérodimériques formées à partir de cinq sous-unités : NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB et c-Rel (Figure 1). Les sous-unités p50 et p52 sont synthétisées à partir des précurseurs p105 et p100, respectivement. Elles sont produites par protéolyse ménagée médiée par le protéasome, de manière constitutive (p105) ou stimulus-dépendante (p100).

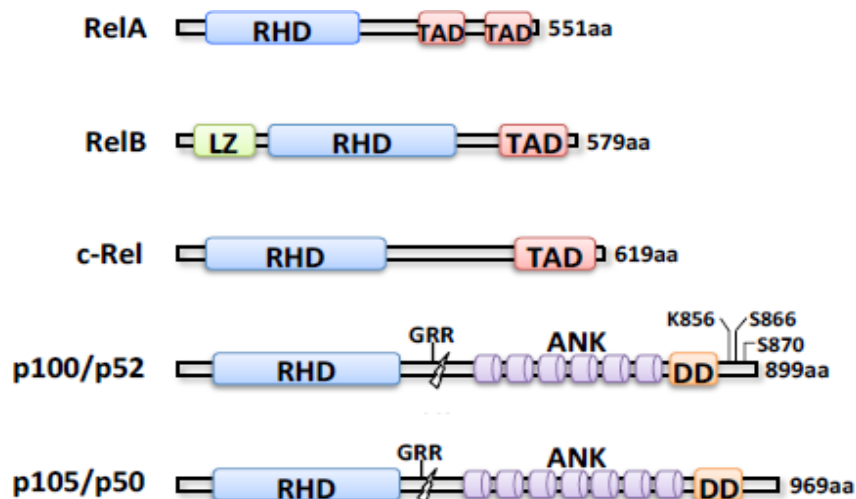


Figure 1. Les différents membres de la famille NF- $\kappa$ B. Les protéines sont présentées avec leurs différents domaines fonctionnels. RHD: Rel Homology Domain, TAD: transcription activation Domain, LZ: leucine zipper, GRR : glycin-rich region, ANK: ankyrin repeat, DD: death Domain. Les deux résidus sérine (site de phosphorylation) et le résidu lysine (site d'ubiquitination) participant aux modifications post-traductionnelles de p100 pour générer p52 sont aussi indiqués.

Toutes les sous-unités NF- $\kappa$ B ont un domaine N-terminal conservé d'environ 300 acides aminés, appelé Rel Homology Domain (RHD). Il contient le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de dimérisation, le signal de localisation nucléaire (NLS) et le domaine d'interaction avec les protéines inhibitrices I $\kappa$ B. Le nom de ce domaine provient de sa similarité de séquence avec l'oncogène v-rel produit par la souche T du virus aviaire de la réticuloendothéliose qui induit des tumeurs lymphoïdes fatales (Walker WH 1992). Les sous-unités RelA, RelB et c-Rel contiennent aussi un domaine de transactivation (TAD), responsable des activités de régulation transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. Les protéines p50 et p52 n'ont pas de capacité transcriptionnelle mais agissent en hétérodimère avec RelA et c-Rel ou RelB, respectivement. En homodimère, p50 peut se comporter comme un inhibiteur ou un activateur quand il interagit avec un activateur transcriptionnel comme Bcl3. La forme la plus commune de NF- $\kappa$ B est l'hétérodimère p50/RelA.

### 3. Les membres de la famille I $\kappa$ B

La famille des protéines I $\kappa$ B contient trois membres: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$  (Figure 2). Leur fonction est d'inhiber les protéines NF- $\kappa$ B en s'associant avec elles grâce à leurs répétitions ankyrine et en masquant leur NLS, ce qui maintient NF- $\kappa$ B à l'état inactif dans le cytoplasme (Karin M 2000). En dehors de ces répétitions d'ankyrine, les I $\kappa$ Bs contiennent aussi une séquence conservée de six acides aminés contenant deux résidus sérines phosphorylables (DSGLDS). Cette séquence joue un rôle important durant le processus d'activation de NF- $\kappa$ B [cf. I.B.1 La voie canonique].

En dépit de ces similarités les I $\kappa$ Bs sont censés interagir avec des dimères spécifiques de NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  est le régulateur négatif majeur du dimère RelA/p50 alors qu'I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$  pourraient aussi contrôler des dimères de type p50-c-Rel (Whiteside ST 1997).

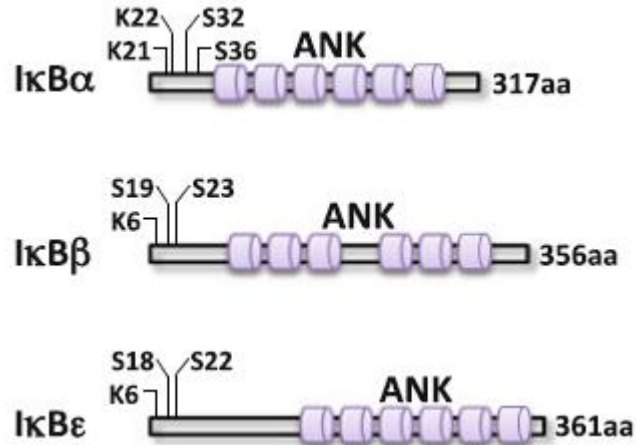


Figure 2. Les différents membres de la famille IκB. Les protéines sont décrites avec leurs domaines fonctionnels. ANK: ankyrin repeat. Les résidus sérine (site de phosphorylation) et lysine (site d'ubiquitination) représentés ici, participent à la dégradation d'IκB.

Comme expliqué ci-dessus, NF-κB est un facteur de transcription inductible. Deux modes d'activation de NF-κB existent et sont présentés ci-dessous.

### B. L'activation de NF-κB par la voie canonique

#### 1. La voie canonique

La voie canonique est induite par un grand nombre de stimuli tels que les cytokines proinflammatoires (IL-1β, TNF-α [Tumor Necrosis Factor]), des protéines virales (LMP-1, Tax), des produits bactériens (LPS, peptidoglycane) ou diverses formes de stress (rayons Ultra-Violets, stress oxydatif). C'est la voie principale d'activation de NF-κB. Son activation est rapide et indépendante de la synthèse protéique. Elle est étroitement contrôlée par le complexe de kinases IKK, qui contient les deux sous-unités catalytiques, IKK1 (IκB Kinase 1)/IKKα et IKK2 (IκB Kinase 2)/IKKβ, et la sous-unité régulatrice, NEMO (NF-κB Essential Modulator)/IKKγ.

Dans les cellules au repos, les dimères NF-κB sont retenus à l'état inactif dans le cytoplasme par leur interaction avec les IκBα, qui masquent leurs signaux de localisation nucléaire (Figure 3). En réponse à une stimulation, IKK est activée et phosphoryle IκB sur deux résidus Sérine, S32 et S36, localisés dans le motif conservé DSGLDS. Cette phosphorylation entraîne leur ubiquitination par le complexe SCF<sup>βTrCP</sup> sur des résidus lysine voisins (Karin M 2000). Cela induit leur dégradation protéolytique par le protéasome 26S. NF-κB étant libre dans

le cytoplasme, la protéine va transloquer dans le noyau afin d'y réguler positivement ou négativement l'expression de gènes cibles. Pour cela, le dimère NF- $\kappa$ B se lie à des motifs conservés de l'ADN (5'GGGRNYYYCC-3', dans lequel *R* est une purine, *Y* est une pyrimidine et *N* un nucléotide quelconque). Des centaines de gènes régulés par NF- $\kappa$ B ont été identifiés ces dernières années.

L'activation du complexe IKK est elle-même régulée par une étape d'auto-phosphorylation ou par le complexe TAK (TGF $\beta$  Activated Kinase). Ce complexe contient une sous-unité catalytique TAK1 et des sous-unités régulatrices TAB1 (TAK1 Binding Protein 1), TAB2 et TAB3.

La voie canonique est strictement dépendante de NEMO, ce qui garantit la transmission du signal à partir du récepteur principalement vers la sous-unité catalytique IKK2. IKK1 ne contribue que modérément à l'activité catalytique globale d'IKK mais en l'absence de IKK2, cette sous-unité semble aider à la préservation de faibles niveaux d'activation de NF- $\kappa$ B.

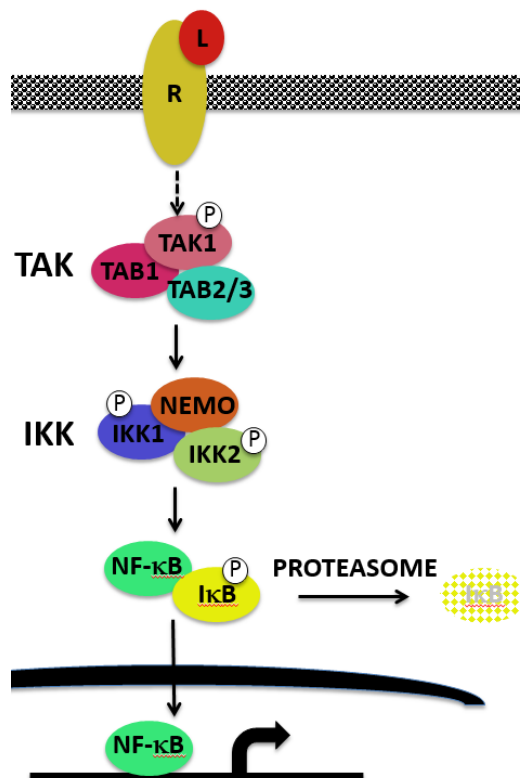


Figure 3. Activation de NF- $\kappa$ B par la voie canonique.

## 2. Les principaux constituants de la voie NF- $\kappa$ B canonique

### (a) Le complexe IKK

#### La kinase IKK1

IKK1, aussi appelée IKK $\alpha$  ou CHUK, appartient à la famille des sérine/thréonine kinase. Elle permet avec IKK2, la phosphorylation de deux sérines dans la séquence conservée des I $\kappa$ Bs, pour qu'ils soient par la suite, dégradés par le protéasome 26S.

IKK1 contient un domaine kinase en N-ter, incluant des sites d'activation par phosphorylation, un SDD ( $\alpha$ -helical Scaffold/Dimerization Domain) permettant la dimérisation IKK1/IKK2 en son centre et un NBD (NEMO Binding Domain) au niveau du C-ter (Figure 4).

Indépendamment de la voie NF- $\kappa$ B, IKK1 est impliqué dans la différenciation épidermique et le développement squelettique [cf. II.BII.B Maladie associée à IKK1 p. 59]. Le gène codant pour cette protéine est sur le chromosome 10 humain et le chromosome 19 murin.

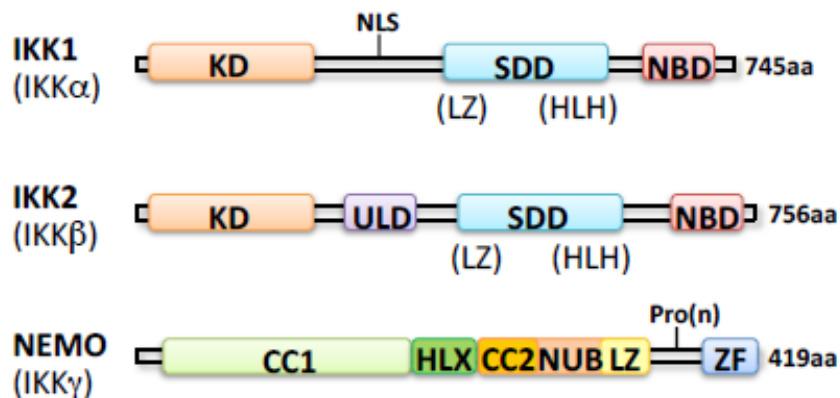


Figure 4. Les sous-unités du complexe IKK. Les protéines sont présentées avec leurs différents domaines fonctionnels. KD: kinase Domain, SDD: scaffold/dimerization Domain, NBD: NEMO-binding Domain, ULD: ubiquitin-like Domain, CC1: coiled-coil 1, HLX: helix Domain, CC2: coiled-coil 2, NUB: NEMO ubiquitin binding Domain, LZ: leucine-zipper, Pro(n): proline-rich region, ZF: zinc-finger.

#### La kinase IKK2

IKK2 (ou IKK $\beta$ ) est essentielle dans l'activation canonique de la voie NF- $\kappa$ B. En tant que kinase affichant l'activité catalytique la plus forte à l'intérieur du complexe IKK, IKK2 est considéré comme un élément enzymatique essentiel de ce complexe protéique. Tout comme IKK1, IKK2 a un domaine kinase incluant des sites d'activation par phosphorylation sur son N-ter, un SDD permettant la dimérisation IKK1/IKK2 en son centre et un NBD au niveau du C-ter (Figure 4).



Cette kinase, au sein de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, a une fonction-clé dans l'immunité et elle a été testée en tant que cible potentielle pour bloquer le développement de maladies inflammatoires. Elle a également des fonctions indépendantes de la voie NF- $\kappa$ B en phosphorylant d'autres substrats que les I $\kappa$ Bs (Chariot A 2009).

Le gène codant cette protéine se situe au niveau du chromosome 8 humain et murin.

### La protéine NEMO

NEMO, la sous-unité du complexe multimérique IKK régulatrice, est une protéine dimérique principalement composée de domaines en hélice de type coil-coiled. Elle contient une séquence d'interaction avec IKK à son extrémité N-terminale, un premier domaine en son centre montrant une affinité pour l'ubiquitine (NUB, NEMO Ubiquitin Binding) un domaine riche en prolines et un « zinc finger » (ZF) à son extrémité C-terminale présentant également une affinité pour l'ubiquitine (Figure 4).

La protéine NEMO joue un rôle très spécifique *in vivo*, en agissant principalement dans le processus d'activation de NF- $\kappa$ B. En dehors de son implication dans cette voie, elle participerait à une autre voie de signalisation immunitaire qui régule l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7. Cela se réalise à travers son association au sein d'un même complexe avec l'adaptateur TANK et les kinases « IKK-like » IKK- $\epsilon$  et TBK1 (Zhao T 2007).

Le gène humain codant pour la protéine NEMO se situe au niveau de la zone Xq28 du chromosome sexuel X (Figure 5). Chez la souris, *Nemo* est aussi localisé sur le chromosome X.

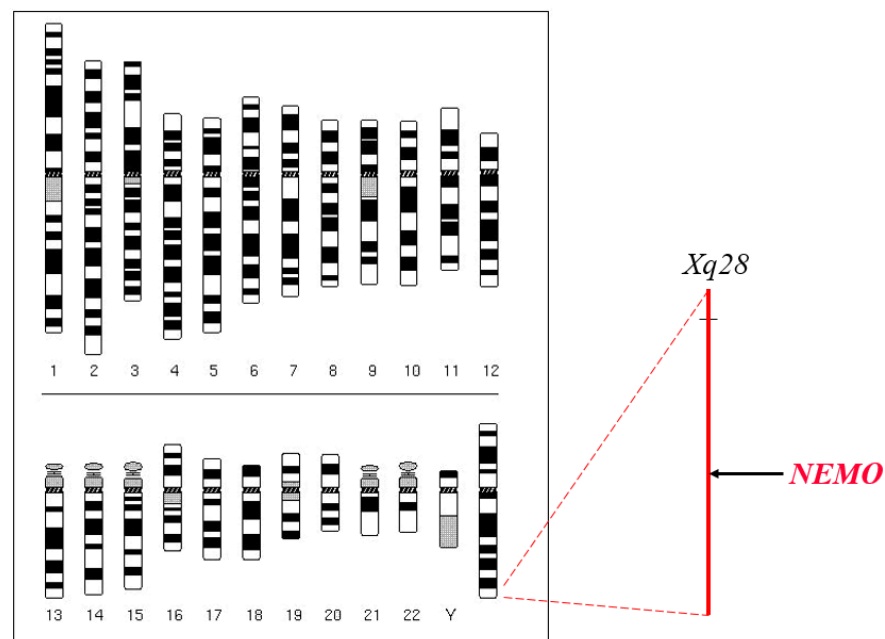


Figure 5. Localisation du gène codant pour NEMO

## (b) Le complexe TAK

Le complexe TAK est composé d'une sous-unité catalytique TAK1 et de deux sous-unités régulatrices, TAB1 (TAK1-binding protein 1) et TAB2/TAB3. TAB1 participe à l'activité enzymatique de TAK1 alors que TAB2 et TAB3 sont des sous-unités régulatrices qui présentent de l'affinité pour l'ubiquitine. Outre l'activation d'IKK, le complexe TAK peut activer les MKKs (Mitogen-activated protein (MAP) Kinase Kinases) et donc les MAPKs (MAP Kinases) telles que p38 and JNK (c-JuN kinase) (Wang C 2001).

### *C. L'activation de NF- $\kappa$ B par la voie non canonique*

Au contraire de l'activation par la voie canonique, la voie non-canonique de NF- $\kappa$ B répond à un groupe restreint de stimuli tels que la lymphotoxine- $\beta$ , CD40-L ou BAFF (Sun SC 2011). C'est la voie alternative d'activation de NF- $\kappa$ B. Elle est indépendante de NEMO et IKK2 mais exige spécifiquement IKK1 et la kinase NIK (NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase). Cette kinase est constitutivement dégradée dans la cellule au repos et les complexes de signalisation associés à la voie canonique la stabilisent, permettant à NIK de phosphoryler IKK1 pour l'activer. A son tour, IKK1 phosphoryle et marque p100 au niveau C-terminal pour qu'elle subisse une hydrolyse ménagée par le protéasome et génère les dimères p52-RelB qui vont transloquer dans le noyau et amorcer l'expression de gènes cibles spécifiques (Figure 6). Cette voie non-canonique a un rôle crucial dans le développement des organes lymphoïdes et des glandes mammaires.

Il existe des imbrications fonctionnelles entre les deux modes d'activation canonique et non-canonique de la voie NF- $\kappa$ B, qui restent intégrés dans un module unique, puisque l'expression ou l'activité de plusieurs composants d'une voie peut être régulée par l'autre. En effet, il a été montré que plusieurs récepteurs activant la voie non-canonique pouvaient également activer la voie canonique (Sun SC 2011). De plus, des éléments de la voie non-canonique, tels que RelB, sont contrôlés par la voie canonique (Bren GD 2001).

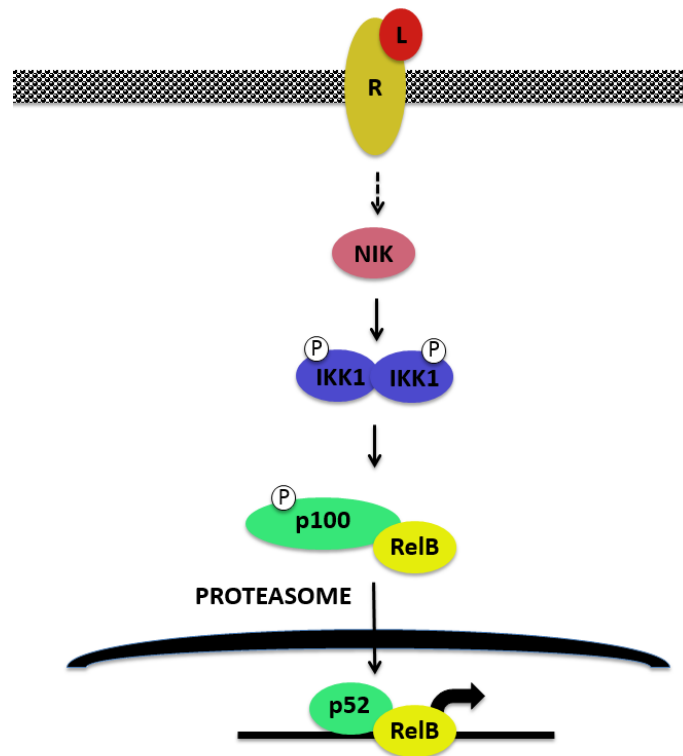


Figure 6. Activation de NF-κB par la voie non canonique.

De nombreuses voies de signalisation induisent l'activation de NF-κB, mais il existe une séquence d'événements moléculaires communs qui conduisent à l'activation d'IKK ou NIK. Cette séquence implique la modification de composants par ubiquitination.

#### D. Le mécanisme de l'ubiquitination

##### 1. L'ubiquitine

L'ubiquitine est une protéine compacte, globulaire et très stable de 76 acides aminés (8 kDa), produite à partir d'un polypeptide précurseur, présent dans toutes les cellules eucaryotes (Pickart CM 2004). Elle a une conformation de type « *β-grasp superfold* » formée de cinq feuilletts beta ( $\beta$ ) connectés et stabilisés par deux hélices alpha ( $\alpha$ ), selon la séquence  $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ . Elle contient sept Lysines, une région hydrophobique incluant les résidus L8, V70 and I44, et un C-ter flexible avec une glycine en position 76 (G76) (Figure 7). L'ubiquitine est souvent exprimée comme une succession de plusieurs molécules liées de manière covalente les unes aux autres, qu'on appelle « chaîne d'ubiquitine ». Elle modifie de façon post-traductionnelle une protéine-cible par le processus d'ubiquitination. Ce processus, qui a été

découvert dans les années 1980 par Ciechanover et Hershko (Ciechanover A 1980) (Hershko A 1983), est utilisé aussi bien par les bactéries que par les levures, les plantes et les animaux.

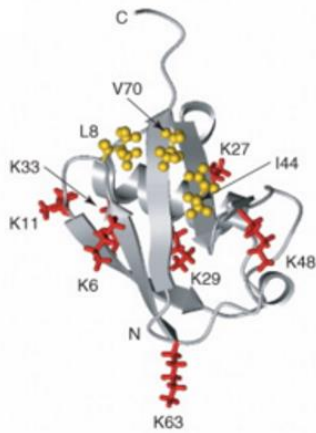


Figure 7. Structure tertiaire de l'ubiquitine. Les sept Lysines sont indiquées en rouge et la section hydrophobe contenant L8–I44–V70 est en jaune. (F. D. Pickart CM 2004)

## 2. Le processus d'ubiquitination

La conjugaison de l'ubiquitine aux substrats se fait par une cascade enzymatique impliquant au moins trois types de facteurs (Figure 8):

- L'enzyme E1 effectue l'activation de l'ubiquitine, dépendante de l'ATP, en formant une liaison thiol-ester entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine G76 (via le COOH porté par son carbone  $\alpha$ ) et le groupement thiol (SH) d'une cystéine de l'E1;
- L'enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine transfère l'ubiquitine activée au niveau du groupement thiol de sa cystéine active, réalisant une liaison instable;
- L'enzyme E3, une ubiquitine-ligase, favorise le transfert de l'ubiquitine de l'E2 vers le substrat par formation d'une liaison isopeptidique amide entre le groupement COOH de G76 et le groupement  $\epsilon$ -amine d'une lysine du substrat. L'E3 se comporte donc comme un récepteur, sélectionnant et présentant à l'E2, la protéine cible.

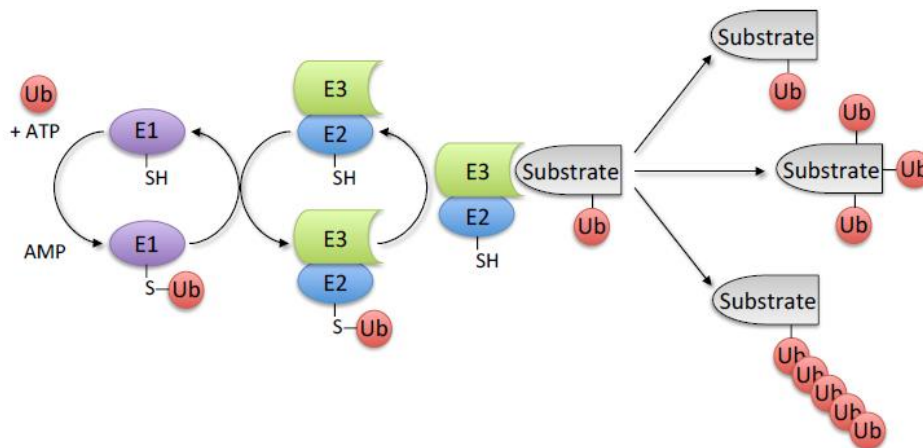


Figure 8. Le processus d'ubiquitination. Les différentes étapes requises pour modifier un substrat par mono- ou polyubiquitination sont indiquées. Ub: ubiquitin, E1: ubiquitin activating enzyme, E2: ubiquitin conjugating enzyme, E3: ubiquitin ligase.

### 3. Les différentes familles d'E3

L'E3 est très important puisqu'il est en grande partie responsable de la spécificité de la réaction, de par son implication dans la reconnaissance spécifique du substrat. C'est pour cela qu'il existe environ 700 E3s différentes chez les mammifères, alors que l'on ne compte qu'une trentaine d'E2s et que deux E1s.

Il existe deux grandes familles d'E3 qui fonctionnent distinctivement durant le processus d'ubiquitination (Ardley HC 2005).

La famille des E3s à domaine HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus) joue un rôle direct dans la conjugaison de l'ubiquitine au substrat. L'ubiquitine activée est en effet transférée de l'E2 sur un résidu cystéine de l'E3 avant d'être conjuguée au substrat. A ce jour, une vingtaine de membres de cette famille a été découverte chez l'Homme.

La famille des E3s à domaine RING (Really Interesting New Gene) contient des protéines se comportant comme des molécules d'échafaudage plutôt que de véritables enzymes. En effet, elles servent de molécules adaptatrices entre l'E2 et le substrat en les rapprochant pour faciliter l'ubiquitination du substrat. Le motif "RING finger" les caractérisant forme des boucles stabilisées par coordination d'ions Zinc et permet le recrutement des E2s. Cette famille comporte des centaines de membres.

#### 4. Les différents types d'ubiquitination

##### (a) La monoubiquitination

Les protéines peuvent être modifiées par la liaison covalente d'une seule ubiquitine, sur un ou plusieurs résidus du substrat (multi-monoubiquitination) (Figure 9). Cette modification tient un rôle important dans des fonctions très variées telles que la signalisation cellulaire, la réparation de l'ADN, la régulation de la localisation de certaines protéines, l'internalisation des récepteurs membranaires et le remodelage de la chromatine via la modification des histones pour le marquage épigénétique.

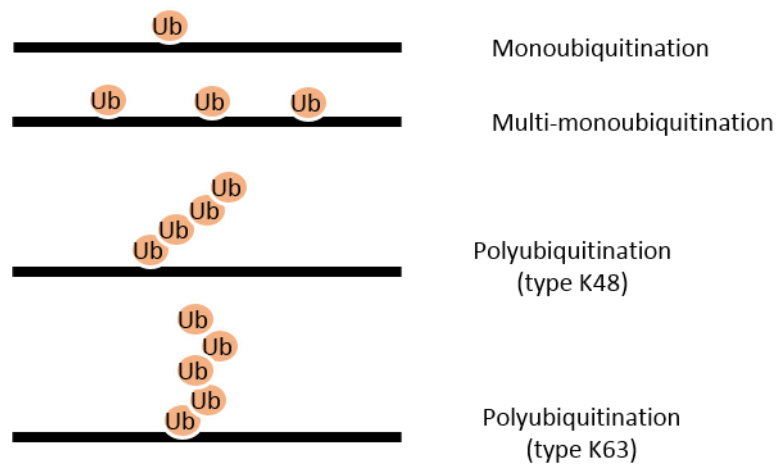


Figure 9. Les différents types d'ubiquitination

## (b) La polyubiquitination

L'ubiquitine possède sept lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) permettant le processus de polyubiquitination (Pickart CM 2004). La première molécule d'ubiquitine est conjuguée à une lysine du substrat. L'élongation de la chaîne de polyubiquitine se fait ensuite par la formation d'une liaison isopeptidique entre la glycine C-terminale d'une nouvelle ubiquitine et une lysine de la molécule d'ubiquitine précédemment conjuguée. Le nom donné au type de chaînes synthétisées décrit le résidu Lysine utilisé sur l'ubiquitine. Ces chaînes peuvent présenter des topologies variées et remplissent de fonctions spécifiques.

Les lysines de l'ubiquitine sont exposées à sa surface et libres de se lier. Il peut donc se former différentes chaînes, de type et de topologie variés (Figure 9). Ces chaînes sont impliquées dans la protéolyse cellulaire, l'endocytose et la réponse inflammatoire (Figure 10).

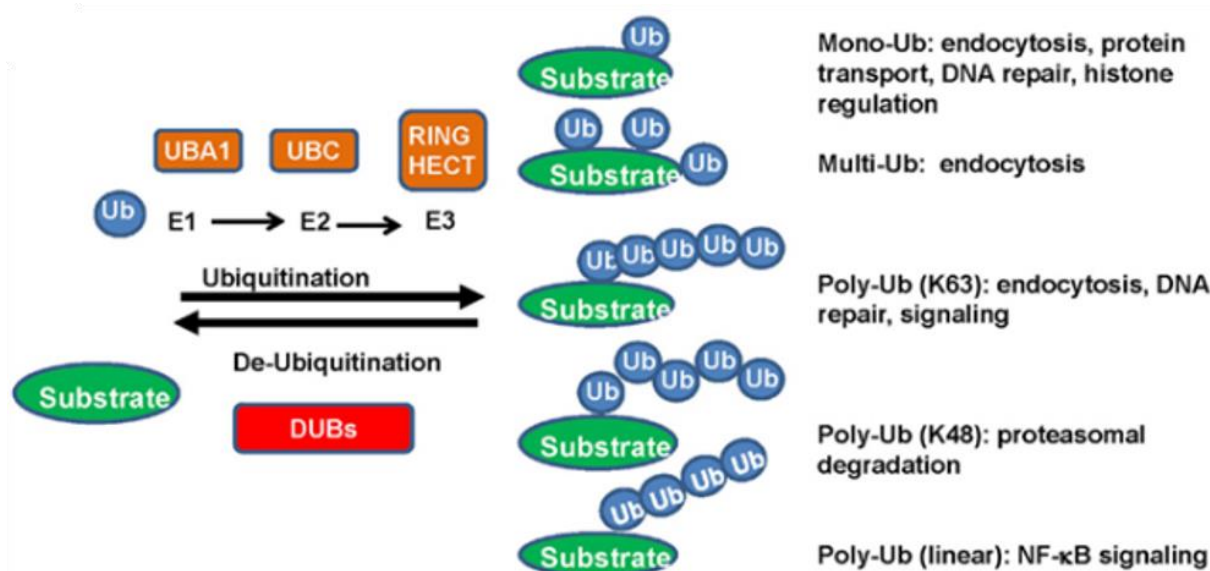


Figure 10. Les différents types d'ubiquitination et exemples de leurs fonctions cellulaires. (Wang G 2012)

Les chaînes K48, par exemple, entraîne l'adressage de la protéine modifiée au protéasome 26S pour dégradation. Une chaîne d'au moins quatre molécules représente le signal de dégradation. C'est le processus le plus classique et connu de l'ubiquitination.

Les chaînes K63, quant à elles, n'entraînent pas la dégradation par le protéasome de la protéine auxquelles elles sont liées. Au contraire, elles sont reconnues par des domaines d'interaction spécifiques que contiennent certaines protéines. Cela permet d'obtenir un niveau

de contrôle des interactions protéine-protéine et de réguler la signalisation intracellulaire notamment (Figure 10).

Plus récemment il a été identifié un autre type de chaînes de polyubiquitine dit « linéaire » (Figure 10). Dans ce cas, la liaison di-ubiquitine a lieu entre Gly76 d'une ubiquitine et Met1 de l'ubiquitine suivante. Ces chaînes ont également une fonction dans la signalisation intracellulaire, telle que présentée ci-dessous.

## 5. La déubiquitination

De la même façon que le niveau de phosphorylation des protéines peut être régulé par leur déphosphorylation, l'ubiquitination des protéines peut être contrecarrée par leur déubiquitination. Les liaisons inter-ubiquitine sont clivées par des enzymes de déubiquitination (protéases) appelées DUB (DeUBiquitinating enzymes), regroupées dans cinq familles selon leur structure (Komander D 2009) (Clague MJ 2012). Cette étape permet aussi le désassemblage des chaînes de polyubiquitine, la maturation de l'ubiquitine à partir de ses précurseurs et un "contrôle qualité" afin d'éviter la production d'ubiquitine monomérique mal traduite ou mal conformée. Ce processus est donc impliqué dans la protéolyse, la régulation post-traductionnelle, la localisation ou la fonction de certaines protéines.

La plus grande famille de DUBs est celle des USPs (Ubiquitin Specific Peptidase), avec 55 membres chez l'Homme, ce qui correspond à plus de 50% du nombre total de DUBs (Komander D 2009) (Clague MJ 2012) (Kovalenko A 2003). Certaines sont sous forme inactive et vont subir un changement conformationnel grâce à leur liaison à l'ubiquitine, ce qui permettra leur activation, de manière ciblée (Komander D 2009). Un exemple d'USP ayant un rôle dans l'inactivation de la voie NF- $\kappa$ B est CYLD, qui peut hydrolyser les chaînes K63 ou linéaires, et agit ainsi sur RIPK1, NEMO, et TRAF2 (voir la section Discussion) (Kovalenko A 2003). De même, USP2 peut agir au niveau de RIPK1 (Mahul-Mellier AL 2012).

La famille des Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs) est quant à elle, composée de quatre protéines ayant un domaine catalytique assez similaire. Ce sont les premières DUBs qui ont été décrites, et elles joueraient un rôle dans le recyclage de l'ubiquitine mal conjuguée et dans l'hydrolyse de précurseurs d'ubiquitine (Baek KH 2003).



La famille des protéases Machado Joseph Disease (MJD) est composée d'environ trente protéines (Li X 2015), telle que l'ataxin 3 dont la mutation est associée à la maladie héréditaire et neurodégénérative Machado-Joseph (Li X 2015). Son domaine catalytique a peu d'homologie de séquence avec celui des autres DUBs connues, mais l'arrangement général de la triade catalytique (résidus cystéine, histidine et aspartate) est conservé (Mao Y 2005). Cette famille, tout comme celles des Ubiquitin Specific Peptidase (USPs) et celle des Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs) sont des protéases à cystéine. L'activité enzymatique de ces protéases est permise par le groupement thiol d'une cystéine du site actif, ce qui va entraîner la libération du substrat et la formation d'un intermédiaire covalent entre la DUB et la molécule d'ubiquitine.

Les Ovarian Tumor proteases (OTUs) ont une histidine et une cystéine conservées au niveau du site actif. Le troisième résidu nécessaire à la triade catalytique semble être un aspartate, comme pour les protéases à cystéine. Néanmoins, les homologues chez *Drosophila melanogaster* d'OTUD4 humain, présentent une sérine au lieu d'une cystéine (Louis M 2015). Ce genre de protéases à sérine a été peu analysé, ce qui entraîne que cette famille de DUBs reste mal définie même s'il a été prouvé que des OTUs présentent bien une activité déubiquitinase *in vitro* (Reyes-Turcu FE 2009). Comme les USPs, les OTUs prennent une conformation active à partir du moment où elles se lient à l'ubiquitine (Edelmann MJ 2009). A20 est une protéine appartenant aux OTUs et a une double activité enzymatique (DUB/E3 ligase) codée par un gène induit par NF- $\kappa$ B (Wertz I 2014). Elle est supposée arrêter le processus d'activation de NF- $\kappa$ B en déubiquitinant RIPK1, puis en la dégradant. OTULIN a aussi été démontrée comme appartenant aux OTUs, avec une affinité spécifique pour les chaînes linéaires d'ubiquitine, ce qui contre l'activité de LUBAC (Keusekotten K 2013).

La cinquième famille est celle des métalloprotéases nommées JAB1/PAD1/MPN-domain-containing Metalloenzymes (JAMM) qui ont besoin de la présence d'ions  $Zn^{2+}$  pour leur activité protéolytique (Komander D 2009). Contrairement aux protéases à cystéine, ces DUBs génèrent un intermédiaire non-covalent avec l'ubiquitine (Nijman SM 2005).

## *E. Mécanismes moléculaires d'activation*

Dans le but d'illustrer l'importance des modifications post-traductionnelles, notamment impliquant l'ubiquitine, dans les processus d'activation de NF- $\kappa$ B nous décrivons les évènements induits par le TNF- $\alpha$  (voie canonique) et par le CD40-L (voie non-canonique).

### 1. Activation de NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$

La signalisation initiée par le TNF- $\alpha$  nécessite tout d'abord la liaison du TNF- $\alpha$  à son récepteur trimérique TNF-R1 (Walczak H 2011) (Figure 11). Cela induit le recrutement des molécules adaptatrices TRADD [TNF receptor-associated death domain (DD)] et RIPK-1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1), à travers la liaison de leur DD au DD de TNF-R1. La liaison des E3 ligases TRAF2/TRAF5 (TNF Receptor-Associated Factors 2 et 5) à TRADD induit le recrutement de deux autres E3s, cIAP-1 et cIAP-2 (cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2) qui modifient RIPK-1 avec des chaînes de polyubiquitine de type K63. RIP1 polyubiquitiné attire alors le complexe protéique LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex), par l'intermédiaire de ses sous-unités Hoip et Hoil-1, le complexe TAK (TGF $\beta$ -Activated Kinase) par ses sous-unités régulatrices TAB2/3, et IKK par NEMO. La polyubiquitination linéaire de RIPK-1 et de NEMO par LUBAC stabilise le TNF-RSC (Receptor Signaling Complex), ou complexe I, en raison de l'affinité de NEMO pour les chaînes linéaires (Rahighi S 2009). L'agrégation induite de ces différents composants se traduit par la phosphorylation d'IKK par TAK1, la sous-unité catalytique du complexe TAK. L'activation d'IKK permet la libération de NF- $\kappa$ B de l'inhibition d'I $\kappa$ B afin d'induire la transcription des gènes cibles.

Parmi ceux-ci se trouve c-FLIP qui est capable d'interagir avec la caspase 8 et de bloquer son activité catalytique. En effet, après la formation du RSC, certains de ses composants, tels que RIPK1 et TRAF2, forment un nouveau complexe macromoléculaire migrant avec FADD (Fas-Associated Death Domain) et la caspase 8 (Micheau O 2003). Appelé le complexe II, ce groupe va migrer dans le cytoplasme.

Si des inhibiteurs de la caspase 8 tels que c-FLIP ne sont pas produits, la caspase 8 déclenche le processus de mort cellulaire programmée : l'apoptose.

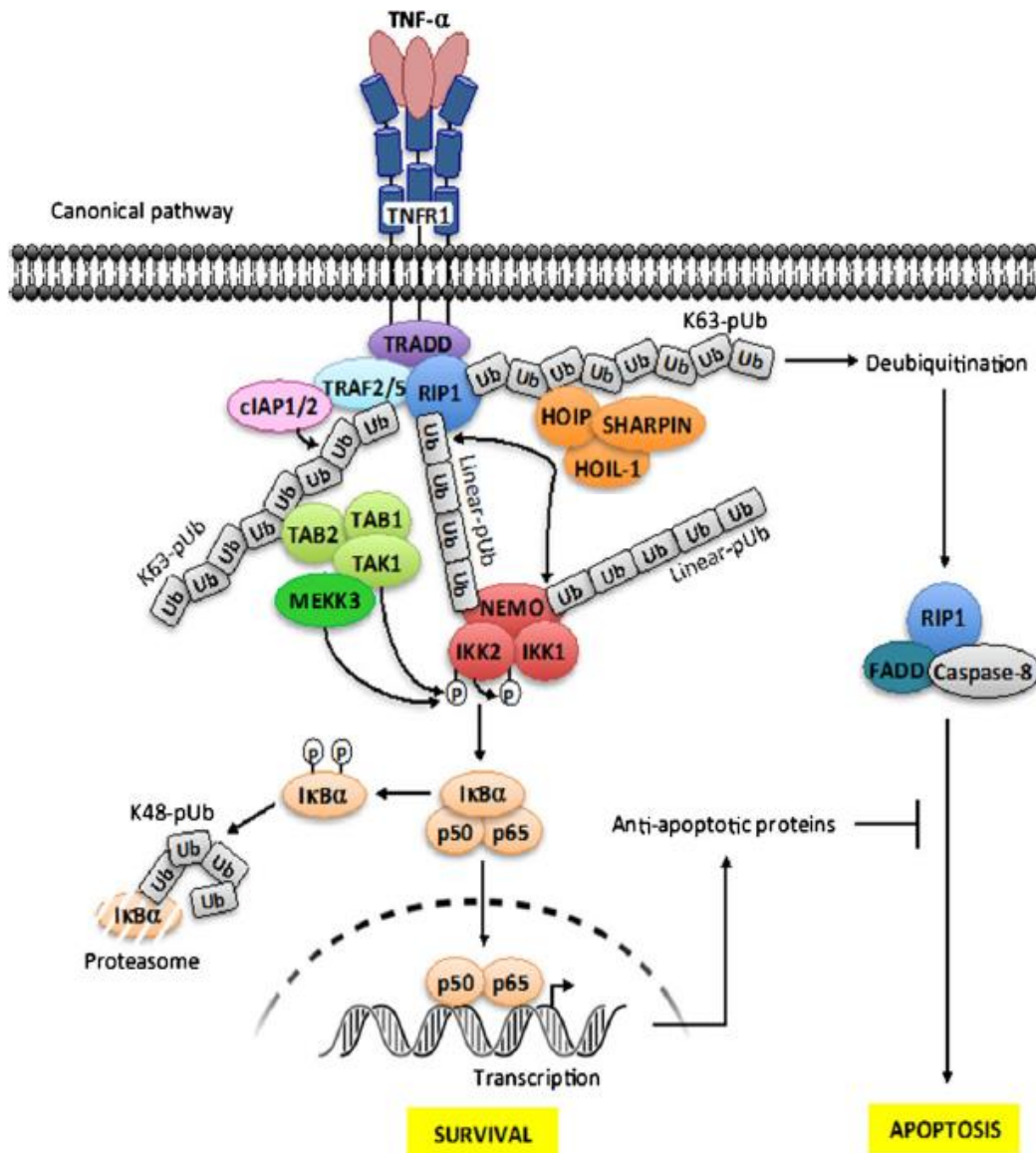


Figure 11. Activation de la voie canonique de NF-κB par TNF-α. Les régulateurs négatifs de cette voie ne sont pas indiqués sur la figure mais sont discutés dans le texte.

## 2. Activation de NF- $\kappa$ B par le CD40-L

L'activation de la voie NF- $\kappa$ B non canonique exige la stabilisation de NIK, qui est continuellement dégradée dans les cellules au repos. Les composants responsables pour cette déstabilisation basale sont cIAP1/2, TRAF2 et TRAF3 qui forment un complexe NIK ubiquitine ligase (NIK/E3). cIAP1/2 sont les E3 ligases induisant la polyubiquitination type K48 de NIK et sa dégradation par le protéasome, tandis que TRAF2 et TRAF3 sont des éléments d'échafaudage qui interagissent avec NIK et cIAPs (Zarnegar BJ 2008).

Plusieurs récepteurs ont été rapportés comme participant à l'activation de la voie non-canonique NF- $\kappa$ B, mais aussi de sa voie canonique. Parmi eux, il y a CD40, le récepteur de CD40-L (Figure 12). Lors de l'interaction de ce récepteur avec son ligand, le complexe NIK/E3 est recruté. Cela entraîne une polyubiquitination type K63 de cIAP1/2 par TRAF2, déclenchant la reconnaissance et la modification de TRAF3 avec des chaînes K48 de polyubiquitine par cIAP1/2. La protéolyse de TRAF3 permet la stabilisation de NIK et la phosphorylation et l'activation de dimères d'IKK1 par phosphorylation (Vallabhapurapu S 2008).

Avec l'aide de NIK, IKK recrute p100 et le phosphoryle au niveau de résidus Ser situés à l'extrémité C-ter de p100 (Sun SC 2011). Cela induit l'interaction de p100 avec SCF <sup>$\beta$ TRCP</sup> et sa polyubiquitination par des chaînes de type K48. Dans ce cas précis, la polyubiquitination de p100 ne provoque pas sa protéolyse complète mais génère plutôt un fragment N-ter, p52. Puisque p100 dans les cellules a une affinité pour la sous-unité RelB, contrôlant sa localisation cytoplasmique, le principal dimère de NF- $\kappa$ B produit par l'activation de la voie non canonique NF- $\kappa$ B est donc p52 / RelB.

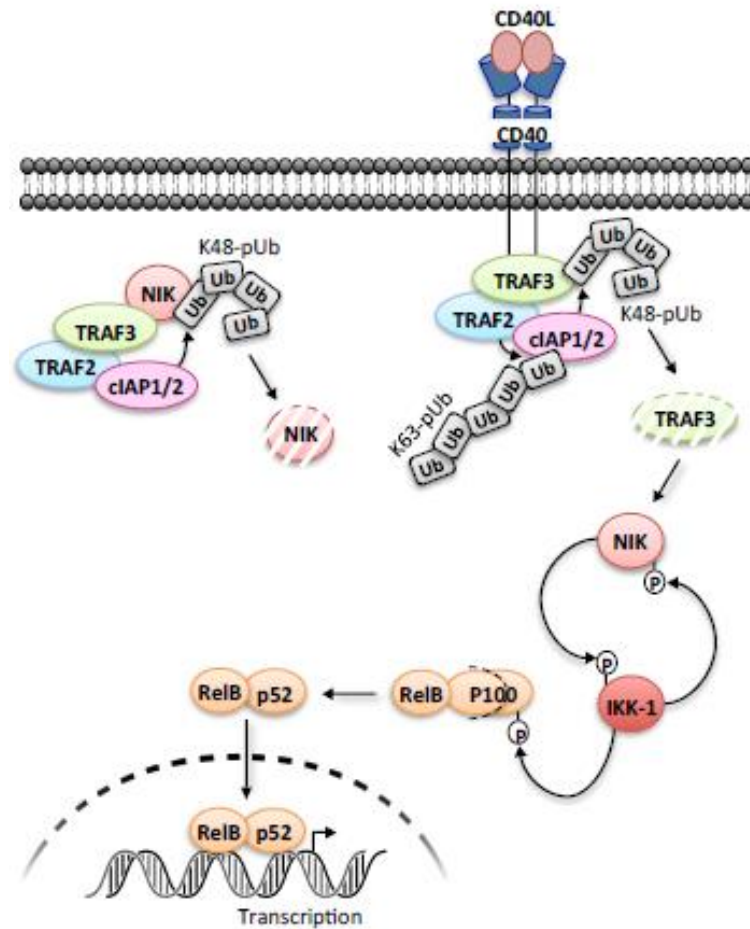


Figure 12. Activation de la voie non canonique de NF- $\kappa$ B par CD40-L.

### F. Les différents rôles de la voie NF- $\kappa$ B dans l'organisme

Depuis sa découverte en 1986 (Sen R 1986), NF- $\kappa$ B a été l'un des facteurs de transcription les plus étudiés, en raison de son rôle central dans l'inflammation, l'immunité, le contrôle de la mort ou de la prolifération cellulaire. Nous aborderont succinctement ces différents domaines dans les sections suivantes.

## 1. NF- $\kappa$ B dans le processus inflammatoire

Les protéines NF- $\kappa$ B peuvent être considérées comme des régulateurs majeurs de l'homéostasie cellulaire. Elles contrôlent notamment le processus d'inflammation qui est un mécanisme complexe de défense du corps, activé par des conditions nocives (Nathan C 2002). Ceci est accompli par une régulation positive ou négative de l'expression de plusieurs acteurs essentiels de ce mécanisme, parmi eux les chimiokines et les cytokines proinflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Sebban H 2006). Comme ces cytokines sont elles-mêmes des inductrices puissantes de NF- $\kappa$ B, ce facteur de transcription est au centre du processus. De plus, NF- $\kappa$ B participe aussi à la résolution de l'inflammation (Lawrence T 2010). La dérégulation de la fonction de NF- $\kappa$ B a ainsi des conséquences délétères complexes sur l'ensemble du processus inflammatoire.

A titre d'exemple, des défauts de la peau sont souvent causés par des mutations touchant la voie NF- $\kappa$ B, soulignant le rôle crucial joué par cette voie dans l'homéostasie de ce tissu. En effet, l'inactivation d'I $\kappa$ B $\alpha$  ou l'expression constitutivement active d'IKK2, générant dans les deux cas un excès d'activité NF- $\kappa$ B, sont associées à une inflammation cutanée (Klement JF 1996) (Page A 2010). Ce phénotype inflammatoire est aussi retrouvé dans Incontinentia Pigmenti, une maladie causée par des mutations de *NEMO* [cf. II.A.1 Incontinentia pigmenti p. 40], qui dans ce cas empêchent totalement l'activation de NF- $\kappa$ B. Cela prouve la sensibilité importante de la peau à toute perturbation de cette voie de signalisation.

## 2. NF- $\kappa$ B dans le processus immunitaire

Une autre fonction-clé de NF- $\kappa$ B est le contrôle de la réponse immune à différentes étapes. L'immunité, qui est fortement associée à l'inflammation, requiert un fonctionnement correct de deux types de réponses immunitaires : innée et acquise/adaptative.

La première implique des types cellulaires spécifiques tels que les macrophages et les cellules dendritiques, exprimant des récepteurs qui reconnaissent les bactéries ou les produits dérivés de virus appelés PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Janeway CA Jr 2002). La plupart des récepteurs impliqués, comme les TLRs (Toll-like Receptor), sont des inducteurs de NF- $\kappa$ B qui participent à l'activation cellulaire (Mak TW 2006).

La seconde, la réponse immunitaire acquise, est médiée de manière cellulaire et humorale pour permettre, d'une part, la reconnaissance d'antigènes du « non-soi » et d'autre part, la synthèse d'anticorps. Les lymphocytes T sont capables de reconnaître à l'aide de leurs TCR (T-Cell Receptor), les antigènes présentés par des APCs (Antigen-Presenting Cells). Ces APCs sont celles décrites ci-dessus comme impliquées dans la réponse immunitaire innée et nécessitant NF- $\kappa$ B pour leur activation. L'activation des cellules T à travers leurs TCR, nécessite également NF- $\kappa$ B et induit leur prolifération et leur différenciation pour acquérir des fonctions effectrices. La synthèse d'anticorps implique les lymphocytes B, qui reconnaissent directement les antigènes à travers leurs BCRs (B-Cell Receptor) (Iwasaki A 2010). Encore une fois, NF- $\kappa$ B a un rôle en tant que régulateur de la lymphopoïèse des cellules de type B, permettant leur différenciation et maturation, mais aussi leur survie lorsqu'elles sont activées par le BCR. NF- $\kappa$ B exerce aussi un contrôle sur l'organogénèse des organes lymphoïdes secondaires, dont le développement incorrect a des conséquences majeures sur l'activation des lymphocytes.

Etant donné l'étendue des rôles joués par NF- $\kappa$ B dans l'immunité cellulaire et humorale, le fonctionnement incorrect de ce facteur de transcription peut être problématique et générer des déficiences immunitaires ou de l'auto-immunité.

### 3. NF- $\kappa$ B dans le développement des cancers

Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B participent aussi à la prolifération et la mort cellulaire. Concernant la prolifération cellulaire, il a été reporté qu'ils régulent l'expression de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire, tels que la cycline A, la cycline D1, ou la CDK6 (Cyclin-Dependant Kinase 6) (Ledoux AC 2014). Concernant la mort cellulaire, l'activation de NF- $\kappa$ B est une étape nécessaire dans la protection cellulaire contre l'apoptose induite par TNF- $\alpha$  [cf. I.F.1 NF- $\kappa$ B dans le processus inflammatoire p. 36]. Ces deux fonctions sont pertinentes concernant le cancer. Très souvent, les cellules dérivées du cancer, montrent une activation constitutive de NF- $\kappa$ B, générant une prolifération dérégulée et/ou une insensibilité à la mort cellulaire (Karin M 2006). Cette activation peut être causée par la mutation d'éléments régulant positivement la voie NF- $\kappa$ B et présentant une activité anormalement élevée (Karin M 2002) ou par des mutations affectant des régulateurs négatifs de la voie tels qu'I $\kappa$ B $\alpha$  qui peut avoir un rôle de suppresseur de tumeur comme montré dans la maladie d'Hodgkin (Cabannes E 1999).

#### *G. Les modèles murins d'étude de la voie NF- $\kappa$ B.*

De nombreuses souris génétiquement modifiées ont été produites pour étudier la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et ont largement contribué à la caractérisation des fonctions de NF- $\kappa$ B *in vivo* (Pasparakis M 2006) (Gerondakis S 2006).

Il a été montré qu'une des fonctions importantes de NF- $\kappa$ B est de protéger les cellules du foie de la mort par apoptose au cours de l'embryogenèse. Cela a été prouvé par l'invalidation sélective de *Rela*, *Ikk2* et *Nemo*. Dans chaque cas, le TNF- $\alpha$  qui s'accumule dans le foie durant l'embryogenèse induit la mort des animaux à différents stades embryonniques tels qu'E11-12 pour NEMO, E12-13 pour IKK2, et E13-15 pour RelA (Schmidt-Supprian M 2000) (Li Q 1999) (Beg AA 1995). Ces périodes différentes sont en corrélation avec le degré d'inhibition de NF- $\kappa$ B. Le croisement de souris KO *Rela* (ou *Ikk2*) avec des souris KO *Tnfa* ou KO *Tnfr1* permet la survie des souris (Doi TS 1999) (Rosenfeld ME 2000). L'étude des souris KO *Rela* est en fait la première à avoir dévoilé un rôle protecteur essentiel de NF- $\kappa$ B contre l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Beg AA 1996). Il faut souligner que seuls les mâles KO *Nemo* meurent d'apoptose du foie au cours du développement. Les femelles survivent et développent un phénotype qui



sera décrit dans le chapitre II.A.1(e) Physiopathologie p. 52). Cette différence est causée par la localisation de *Nemo* sur le chromosome X.

Une seconde fonction de NF- $\kappa$ B confirmée par l'étude de souris modifiées est le contrôle du processus immunitaire.

Après le sauvetage par invalidation de la signalisation TNF- $\alpha$  ou en utilisant des KO conditionnels permettant la survie, les souris *RelA*<sup>-/-</sup> et *IKK2*<sup>-/-</sup> présentent des signes d'immunodéficiência (Rosenfeld ME 2000) (Doi TS 1997). En utilisant des souris ayant un phénotype associé au Déficit Immunitaire Combiné Sévère (SCID), grâce à la greffe de cellules de foie fœtal *RelA*<sup>-/-</sup> dans ces souris au stade embryonique E13, il a été montré que RelA est facultatif pour le développement hématopoïétique, mais nécessaire pour la commutation isotypique et la prolifération lymphocytaire induite par un mitogène (Doi TS 1997). Des souris KO *Ikk2* présentent de nombreux déficits immunitaires causés par les cellules B, les lymphocytes T, et un dysfonctionnement des macrophages (Gerondakis S 2006).

La mutation d'autres composants de la voie tels que c-Rel, p105/p50, p100/p52 ou RelB, qui n'affectent pas le développement des animaux, s'accompagne également de défauts immunitaires spécifiques et variés (Gerondakis S 2006). Ces défauts impliquent la voie canonique (c-Rel et p105/p50) ou non-canonique (RelB et p100/p52).

Finalement, l'analyse de l'invalidation d'*Ikk1*, qui participe aux voies canonique et non-canonique d'activation de NF- $\kappa$ B a révélé une fonction non anticipée de cette kinase. Les souris *Ikk1*<sup>-/-</sup> présentent à la naissance un problème cutané majeur avec leurs membres engoncés dans un épiderme dont l'état de différenciation est aberrant (Delhase M 1999) (Hu Y 1999). Le défaut moléculaire sous-jacent sera expliqué dans la partie « II.B Maladie associée à IKK1 », p. 59.

L'identification des maladies génétiques humaines liées à NF- $\kappa$ B fournit une autre façon d'appréhender cette voie essentielle de transduction du signal. En complétant les études réalisées chez la souris et en validant les concepts élaborés dans des systèmes cellulaires, cela permet d'établir l'état des fonctions intégrées de NF- $\kappa$ B chez l'Homme. Non seulement cela devrait aider dans le développement de traitements adaptés pour les maladies rares liées à NF- $\kappa$ B, mais cela peut aussi être considéré comme une source d'informations très utile pour réduire les conséquences, ou parfois même la cause principale, des pathologies plus largement rencontrées, telles que le cancer ou les maladies inflammatoires/immunitaires.

## II. Les maladies génétiques associées à la voie NF-κB canonique

### A. Maladies associées à NEMO

#### 1. Incontinentia pigmenti

##### (a) Historique

La première observation d'Incontinentia pigmenti (IP) [OMIM # 308300] rapportée dans la littérature date de 1906, par Garrod (Garrod AE 1906). Il y décrit une patiente atteinte de troubles pigmentaires, associés à une tétraplégie et une déficience mentale. L'appellation « syndrome de Bloch-Sulzberger » pour IP, vient de son observation par le dermatologue suisse Bloch, en 1926 chez une petite fille de 2 ans présentant des lésions pigmentées disposées en stries et en éclaboussures au niveau du tronc et des membres inférieurs, associées à de l'alopécie et un décollement de rétine (Bloch B 1926).

Néanmoins, c'est le terme « Incontinentia pigmenti » qui a été officiellement adopté pour décrire cette pathologie en 1928, après la publication de Sulzberger (Sulzberger MB 1928). Cette dénomination provient de la « fuite de mélanine épidermique vers le derme », observée en microscopie optique pour cette pathologie.

C'est en 1964, que les anomalies dentaires associées à IP sont décrites par Kuester et Olbing (Kuester F 1964). La première étude à grande échelle de la maladie est réalisée en 1976, par Carney *et al*, sur 653 patients IP, dont 16 garçons (Carney RG 1976). Ce n'est qu'en 1987 que le problème d'avortement spontané des fœtus mâles chez les familles atteintes d'IP, est rapporté par Spallone (Spallone A 1987). Il décrit également des problèmes oculaires associés à la maladie et y propose une origine génétique.

En 1991, Sefiani *et al*. (Sefiani A 1989) impliquent la région génétique Xq28 dans l'apparition d'IP, suggérant l'existence d'un seul locus responsable et différenciant IP de l'Hypomélanose de Ito, trouble pigmentaire lié à des anomalies du locus Xp11 (Happle R 1998).

Pour éviter des erreurs de diagnostic, Landy et Donnai proposent en 1993, d'établir des critères sur la base de l'examen clinique et décrivent l'évolution cutanée d'IP en 4 stades (Landy SJ 1993). En 2000, le gène codant pour NEMO est identifié comme responsable de la maladie [cf. II.A.1(c) Bases génétiques et moléculaires p. 45] (Smahi A 2000). En 2001, un test est développé dans le but de détecter l'anomalie du gène *NEMO* engendrant une grande fraction des cas d'IP.

Depuis 2003, l'analyse histologique fait partie intégrante des critères diagnostiques définis par Landy et Donnai, en définissant les spécificités histologiques des différents stades de la maladie (Hadj-Rabia S 2003). Le diagnostic prénatal a été mis en place en 2004 et le diagnostic préimplantatoire, permettant in vitro de détecter la maladie chez l'embryon avant implantation dans l'utérus, existe depuis 2006.

(b)        Signes cliniques

IP est une pathologie rare (1/10 000 à 1/100 000), qui est mortelle pour les fœtus de sexe mâle au cours du premier trimestre de la grossesse. Elle est caractérisée chez les nouveau-nés de sexe féminin par une génodermatose grave et complexe avec une inflammation sévère de la peau, survenant après la naissance. Malgré une pénétrance de 100%, le phénotype est variable et mosaïque même au sein d'une famille. Cela s'explique par le phénomène de lyonisation, qui est l'inactivation aléatoire d'un chromosome sexuel X au cours de l'embryogénèse chez les fœtus femelles. Dans IP, cette inactivation est biaisée [cf. II.A.1(d) Le phénomène de lyonisation].

**Manifestations cutanées**

La génodermatose complexe d'IP est accompagnée d'une grave inflammation de la peau (Sebban H 2006) suivant les lignes de Blaschko et se déroule en quatre phases (Figure 13). Durant les deux semaines qui suivent la naissance, la première phase se met en place avec une inflammation plus ou moins sévère et une hyperéosinophilie générée par l'accumulation d'éotaxine pendant l'inflammation (Jean-Baptiste S 2002). En effet, cette chimiokine est sélective des éosinophiles. Cette étape vésiculaire est suivie par l'hyperprolifération des kératinocytes de l'épiderme (stade verruqueux) avec de l'acanthose et de la papillomatose. Le troisième stade est dit « pigmenté », car il est caractérisé par une accumulation de mélanocytes qui produisent des quantités élevées de mélanine. Le dernier stade est qualifié d'atrophique avec une régression des lésions cutanées, et donc apparition de zones dépigmentées où les

glandes eccrines manquent (Hadj-Rabia S 2003). L'ensemble du processus couvre plusieurs semaines/mois.

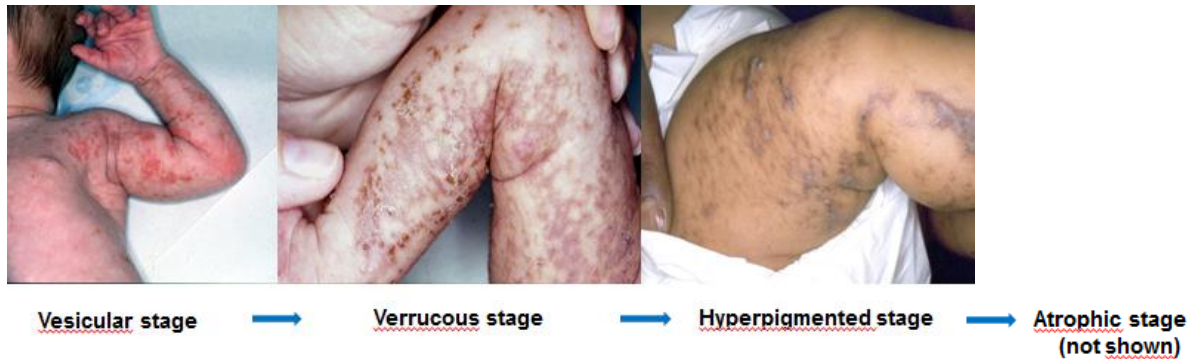


Figure 13. Les quatre stades cutanés d'Incontinentia Pigmenti.

### Manifestations dentaires

Incontinentia pigmenti est un facteur congénital de malocclusion et d'oligodontie chez 80% des patientes. Elles peuvent aussi présenter une hypoplasie hémifaciale et une éruption dentaire retardée, avec des dents coniques (Minić S 2013) (Figure 14). Ces caractéristiques dentaires sont similaires à celles retrouvées dans la pathologie EDA-ID aussi causée par des mutations de NEMO [cf. II.A.2 (XL-)EDA-ID p. 55].

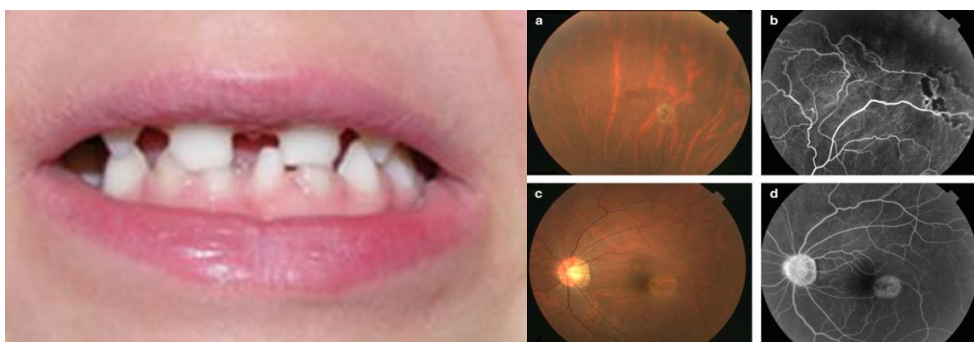


Figure 14. Signes dentaires et ophtalmologique d'IP. L'image de droite présente une arborisation vasculaire incorrecte au niveau de la rétine en (b) et (d). (Tada H 2007) (García-Martín P 2013)

## **Manifestations ophtalmologiques**

Dans plus d'un cas sur deux, la génodermatose est accompagnée de problèmes ophtalmologiques unilatéraux handicapants tels que des détachements vasculaires au niveau de la rétine, de l'hypoplasie fovéale et du strabisme (O'Doherty M 2011) (Figure 14). Ces problèmes persistent tout au long de la vie de la patiente, contrairement à la pathologie cutanée qui s'atténue avec le temps.

L'hypothèse d'une corrélation entre la sévérité des caractéristiques ophtalmologiques d'IP et le phénotype neurologique qui sera décrit ci-dessous, a été émise, en rapport avec leur origine ectodermique commune et à l'insuffisance vasculaire pouvant être causée par de la nécrose et de l'ischémie à ces deux endroits.

## **Manifestations cérébrales**

Environ un tiers des patientes affichent également diverses anomalies du système nerveux central comme de l'épilepsie, des retards mentaux, des problèmes de développement et moteurs (Minić S 2013) (Hennel SJ 2003) (Loh NR 2008). La plupart des atteintes neurologiques arrivent dans les premiers jours de la vie (Shuper A 1990) et leur base exacte reste inconnue.

Les données sont très hétérogènes chez l'humain. Néanmoins, près de 70% des personnes atteintes de troubles cérébraux dans le cas d'IP, présentent de l'épilepsie, ce qui montre une activation neuronale anormale chez les patientes, sous forme de crises épileptiques (Hadj-Rabia S 2003). En effet, l'épilepsie correspond à l'altération fonctionnelle transitoire d'une population de neurones où les décharges d'influx nerveux deviennent pathologiques de par leur intensité. Ces crises peuvent provoquer des dommages cérébraux vasculaires, tels que des hémorragies, de l'ischémie et de la nécrose (Shuper A 1990).

Un développement psychomoteur retardé est aussi observé chez 40% des patientes IP atteintes d'anomalies du SNC, ainsi que des retards mentaux dans 25% des cas. Ces troubles pourraient être une conséquence des crises épileptiques fréquentes et précoces se réalisant durant la première année de vie de la patiente. Parfois, cela peut même entraîner la mort si les crises créent trop de dommages cérébraux (Hadj-Rabia S 2003).

L'imagerie du cerveau par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) montre des lésions dans la myéline, une dilatation des ventricules, de l'atrophie cérébrale, une hypoplasie du corps calleux, ainsi que divers défauts vasculaires (Figure 15) (Hennel SJ 2003). Une combinaison d'anomalies est souvent observée. Par exemple, une encéphalopathie néonatale et des lésions de la myéline, accompagnées d'une angiopathie, ont par exemple été observées dans un cas clinique (Loh NR 2008). Ce dernier signe augmenterait la sensibilité des neurones et des oligodendrocytes à l'inflammation, potentialisant les blessures hypoxiques du cerveau (Hennel SJ 2003).

Une hypothèse concernant l'origine de ces lésions cérébrales implique l'activation des cellules endothéliales déficientes en NEMO, ce qui aurait pour conséquence la production d'éotaxine, une chimiokine sélective des éosinophiles. Cela induirait de la vaso-occlusion à cause de la dégranulation des éosinophiles, et de l'inflammation périvasculaire (Bodemer C 2013). Nous discuterons plus tard l'hypothèse « vasculaire », au regard de publications récentes [cf. II.A.1(e) Physiopathologie p. 52].

Une autre hypothèse concerne les lésions cérébrales IP engendrées par des cellules mutées pour NEMO. Le mécanisme serait similaire à celui retrouvé dans la peau : l'apoptose des cellules mutées permettrait leur remplacement par des cellules normales. Or, cette mort cellulaire déclenche aussi des processus pathologiques tels que de l'inflammation. Lorsque des neurones meurent à cause de cet environnement agressif, leur remplacement par neurogénèse dans le cerveau postnatal n'est pas aussi actif que la prolifération cellulaire dans la peau (Minić S 2013).

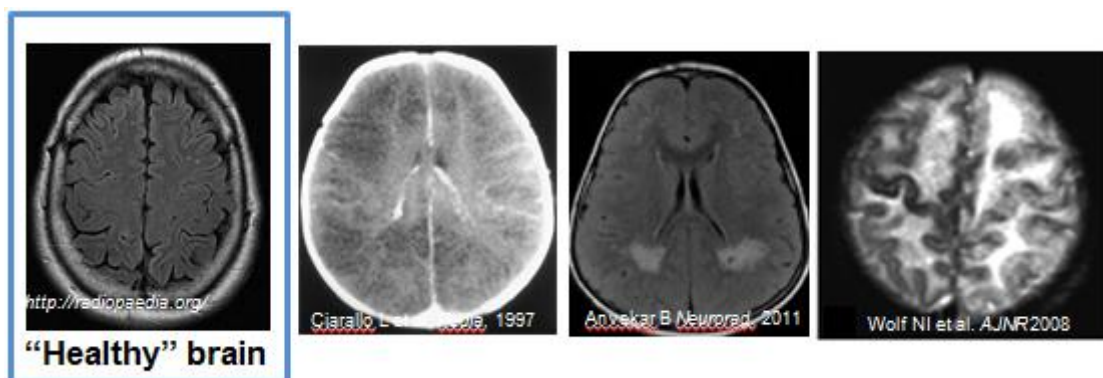


Figure 15. IRM d'atteintes cérébrales dues à Incontinentia pigmenti. Le 2ème et le 4ème IRM montrent une myélinisation perturbée, alors que le 3ème IRM montre une dilatation des ventricules.

### **Autres manifestations**

Avec une prévalence de 33 %, des problèmes au niveau des cheveux ont été reporté chez les patientes IP, avec des cheveux clairsemés durant l'enfance ou même de l'alopecie sur le sommet du crâne (Hadj-Rabia S 2003). A l'âge adulte, les cheveux sont ternes et fragiles. De l'hyperplasie ou une absence de sourcils et cils peuvent aussi être observées.

Dans 40% des cas, des anomalies au niveau des ongles sont présentes, telle que de la dystrophie allant jusqu'à de l'hyperkératose, de la koïlonychie et une pigmentation jaune. De manière assez fréquente, les adolescentes et les adultes peuvent avoir des tumeurs péri-unguéales et sous-unguéales kératosiques associées à des déformations osseuses, des lésions lytiques et donc de la douleur (Montes CM 2004).

#### (c) Bases génétiques et moléculaires

Environ 70% des patientes IP portent la même délétion génétique au niveau de la région chromosomique Xq28, qui supprime les exons 4 à 10 du gène codant pour NEMO (Smahi A 2000). En effet, une analyse PCR du locus NEMO dans des cellules dérivées de fœtus mâles touchés par IP, a originellement révélé une absence de fragment amplifié correspondant aux exons 4-10. Ce réarrangement génomique récurrent (*NEMOdel*) est généré par une recombinaison homologue non allélique (NAHR) se réalisant entre deux séquences répétées « Medium Reiterated 67B » (MER67B) localisées en amont de l'exon 4 et en aval de l'exon 10 de NEMO (Figure 16).

*NEMO* se situe dans une région présentant une organisation génomique unique que nous appellerons « locus IP ». Dans la direction centromérique, il chevauche partiellement le gène *G6PD* (Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase). Les deux gènes se chevauchant, partagent une région conservée promotrice (Promoteur B) qui a une activité bidirectionnelle (Fusco F 2006), distincte du promoteur spécifique de *NEMO* (Promoteur A).

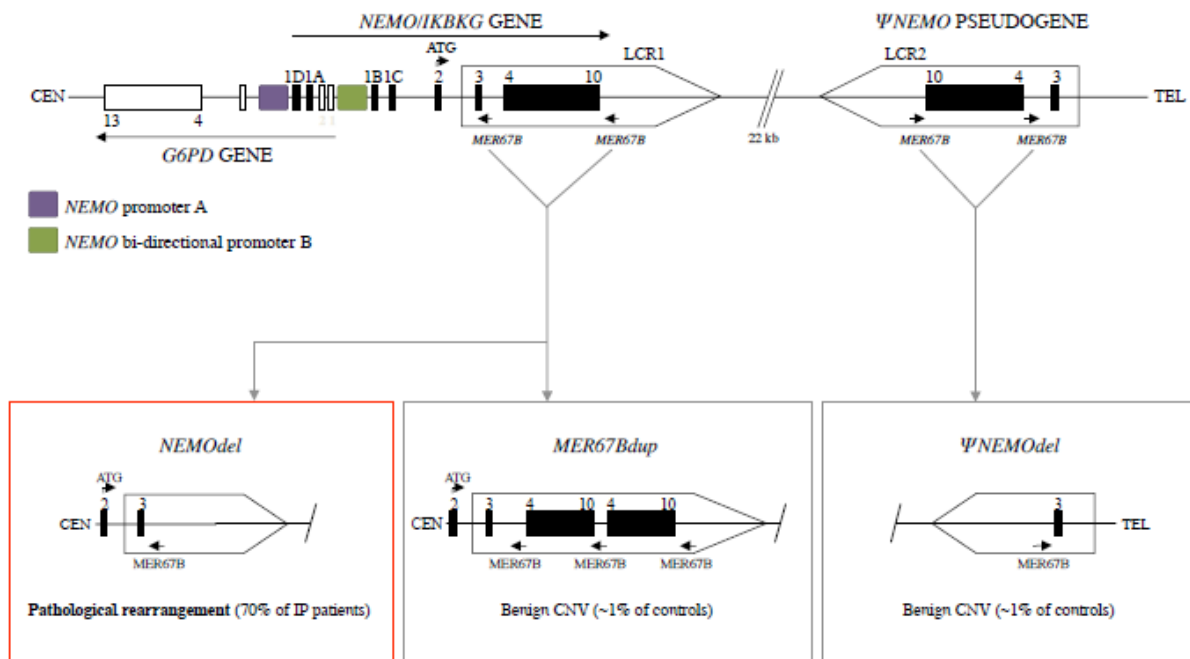


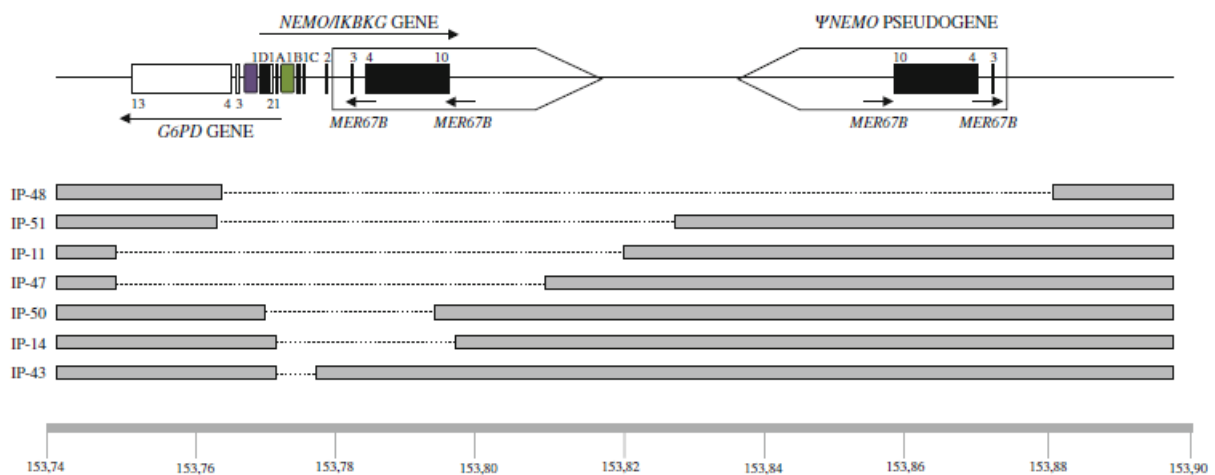
Figure 16. Réarrangements des loci de NEMO et de son pseudogène. Est présenté dans la partie supérieure de la figure l'organisation génomique du gène NEMO et de son pseudogène  $\psi$ NEMO (locus IP) ainsi que celle du gène voisin G6PD qui a les mêmes éléments promoteurs. La partie inférieure de la figure illustre leurs réarrangements dont celui provoquant l'IP, observé chez 70% des patientes *NEMOdel*.

Il convient de noter que *G6PD* est un gène entraînant la plus commune des enzymopathies chez l'humain, la déficience en G6PD liée au chromosome X [OMIM #305900] (Martini G 1996). Dans la direction télomérique, *NEMO* fait partie d'une duplication segmentaire de 35.7kb (Low Copy Repeats, LCRs) contenant aussi sa copie tronquée non fonctionnelle, *pseudo-NEMO* ( $\psi$ -*NEMO*). Les deux LCRs, couvrant le gène fonctionnel (LCR1) et sa copie pseudogène (LCR2) et étant dans une orientation opposée, sont fortement homologues et sont sujettes à la recombinaison (Fusco F 2012).

De récentes recherches ont montré que le locus IP subit des NAHR soit par réarrangement pathologique (*NEMOdel*), soit par des variations bénignes (*MER67Bdup* et  $\psi$ -*NEMOdel*) (Figure 16). Ces variants non pathologiques n'interfèrent pas avec la fonction de NEMO mais sont considérés comme des variations structurales du génome humain ou des petites variations du nombre de copies (CNVs), avec une faible fréquence dans la population contrôle (1%). Il a été démontré que les variants  $\psi$ -*NEMOdel* et *MER67Bdup* peuvent être considérés comme des allèles à risque pour les cas sporadiques d'IP (Fusco F 2009).



Aradhya *et al.* (Aradhya S 2001) ont montré l'échange de séquences entre LCR1 ou LCR2, mettant en évidence que les événements d'inversion promus par leurs orientations opposées, pourraient être responsables de la maintenance de leur similarité. De plus, il a été observé que les événements de recombinaison produits par NAHR entre les deux LCRs, repositionnaient des altérations polymorphiques *de novo* survenant dans le pseudogène. Nous pouvons citer comme exemple, la délétion des exons 4-10 ( $\psi$ -*NEMO*del) ou la délétion allant du pseudogène au gène *NEMO*, causant des mutations pathologiques IP *de novo* (Conte MI 2014).



**Figure 17.** Délétions chromosomiques affectant le gène *NEMO* dans l'IP. Les différentes délétions identifiées ont été compilées. Dans certains cas, *G6PD* est aussi affecté, tel que dans IP48 qui subit la plus grande délétion, éliminant aussi  $\psi$ -*NEMO*.

En plus des événements récurrents induits par les séquences *MER67B*dup causant l'IP chez la plupart des patientes, une grande densité de séquences répétitives, localisées dans chaque LCR, donne un effet déstabilisant de la structure génomique. Cela prédispose le locus IP à générer de nouveaux réarrangements qui éliminent *NEMO*, et parfois aussi *G6PD* et  $\psi$ *NEMO* (Figure 17). Dans certains cas de NHEJ (Non Homologous End-Joining), de NAHR entraînant la formation d'allèles pathologiques mais aussi bénins (Fusco F 2009), et d'événements de recombinaison médiés Alu-Alu, la production de délétions récurrentes ou de non récurrentes, a été rapportée (Fusco F 2012). En effet, l'architecture locale du locus, avec une fréquence élevée de micro-/macro-homologies, de répétitions en tandem, et de séquences répétées/répétitives, augmente sa vulnérabilité à la production de réarrangements génomiques *de novo* à travers différents mécanismes (Fusco F 2009). Ces événements, se produisant durant la méiose et la mitose, révèlent que la région est propice à générer des réarrangements

génomiques complexes chez l'Homme. Ensembles, ces données indiquent que l'IP appartient à la famille des « désordres génomiques » et que le locus *NEMO/IP* doit être considéré comme une région d'instabilité génomique liée à une maladie héréditaire (Fusco F 2012). Le réarrangement récurrent *NEMO* dans IP résulte en la synthèse de la version tronquée de NEMO (aa 1-133 (Smahi A 2000)) qui, si elle était stable, devrait être seulement capable d'interagir avec les sous-unités catalytiques IKK mais pas avec ses autres partenaires [cf. I.B.2(a) Le complexe IKK p. 22]. La conséquence est que le processus d'activation de NF- $\kappa$ B est totalement aboli en réponse aux inducteurs classiques de la voie canonique. Un de ces inducteurs, la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , a une double fonction dans le déclenchement soit de la mort par apoptose, soit de la survie cellulaire. La survie nécessite la synthèse de protéines spécifiques contrôlée par NF- $\kappa$ B. En accord avec cela, les cellules IP sont très sensibles au TNF- $\alpha$  et meurent par apoptose, une caractéristique qui a d'importantes conséquences dans le développement de la maladie [cf. II.A.1(e) Physiopathologie p. 52].

Dans d'autres cas, le gène codant pour NEMO peut subir des modifications dans les exons 2 à 10, telles que des mutations non-sens, décalant le cadre de lecture ou des microdélétions (Figure 18) (Conte MI 2014). Cela entraîne la plupart du temps, la synthèse de versions sévèrement tronquées de la protéine NEMO, dépourvues d'activité. Une exception notable est une microdélétion éliminant trois nucléotides codant l'acide aminé K90 ( $\Delta$ K90) (Figure 19). La mutation  $\Delta$ K90 a été trouvée dans une forme sévère d'IP, ce qui n'est pas surprenant puisqu'elle perturbe l'interaction de NEMO avec les sous-unités catalytiques d'IKK (Fusco F 2004). La structure publiée du domaine d'interaction entre NEMO et les IKKs a confirmé que l'acide aminé K90 établit lui-même un contact avec le 732 carbonyle d'IKK1/IKK2 (Rushe M 2008). La simple délétion d'un acide aminé à cet endroit devrait de toute façon être suffisante pour perturber les points de contact entre respectivement, les acides aminés voisins E89, F92 et L93 de NEMO, et les résidus D738, T735 et F734 d'IKK2.

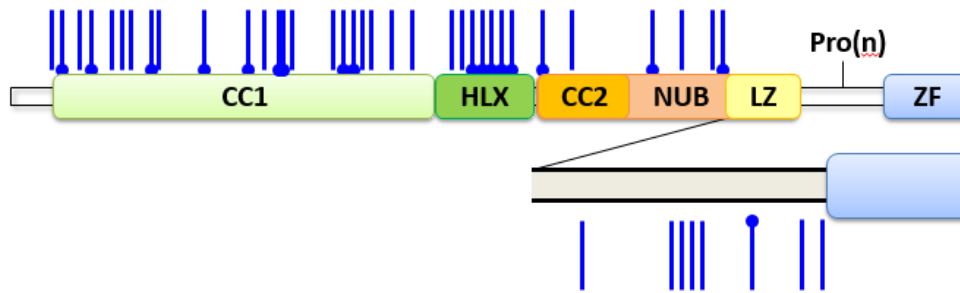


Figure 18. Les mutations tronquantes de NEMO associées à IP. Les mutations non-sens et frameshift générant IP sont indiquées respectivement par des lignes bleues pleines, terminées par un point pour les non-sens.

En outre, des mutations faux-sens de *NEMO* ont été identifiées chez des patientes IP, suggérant que des anomalies moléculaires « discrètes » peuvent être suffisantes pour générer la maladie (Figure 19). Par exemple, la mutation A323P cause une forme sévère d'IP, avec des anomalies au niveau du système nerveux central (Sebban-Benin H 2007). Cette mutation affecte plusieurs voies de signalisation NF- $\kappa$ B, dont celles régulées par IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS (lipopolysaccharide) et PMA/ionomycine. L'introduction d'une proline à cette position ne déstabilise pas la protéine. Elle détériore plutôt son ubiquitination comme montré dans les voies dépendantes de TRAF6, une E3 ligase, ou son habilité à interagir avec des partenaires ubiquitinés, en affectant le domaine NUB. Une autre mutation (E57K) entraînant une forme moyenne d'IP, a été montrée comme perturbant l'interaction entre NEMO et TRAF6, ce qui suggère l'existence d'un double mode d'interaction entre ces deux protéines (Gautheron J 2010). D'une part, le domaine NUB peut reconnaître des chaînes polyubiquitinées de TRAF6 actif, et d'autre part, le N-ter de NEMO peut directement contacter TRAF6. En revanche, l'interaction avec IKK n'est pas affectée.

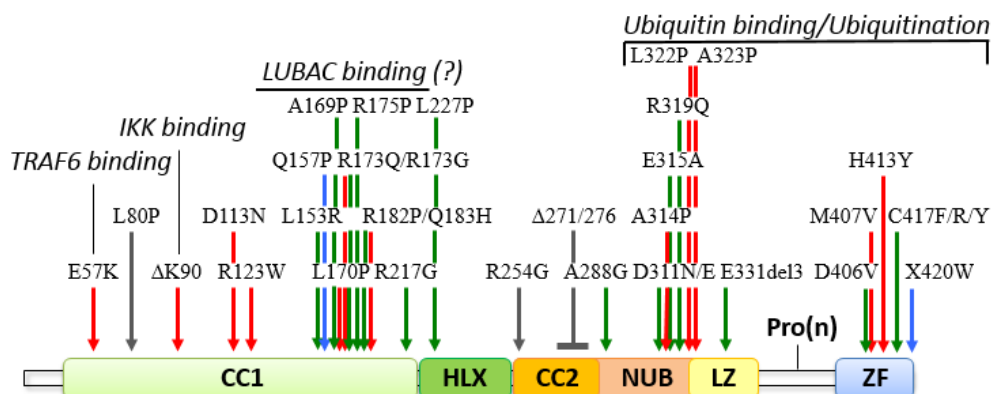


Figure 19. Les mutations ponctuelles de NEMO associées à des maladies humaines. Les mutations ponctuelles générant IP sont indiquées en rouge, celles générant EDA-ID en vert et celles générant OL-EDA-ID en bleu. Les mutations ponctuelles entraînant des immunodéficiences « simples » sont en gris. Les défauts fonctionnels sont aussi indiqués.

(d) Le phénomène de lyonisation et son impact dans IP

La lyonisation est l'inactivation aléatoire d'un chromosome sexuel X (XCI, X Chromosome Inactivation) très tôt au cours de l'embryogénèse chez les fœtus femelles (E6.5 chez les souris). L'inactivation se réalise en *cis* par des ARN non codants *Xist* (X inactive specific transcript) de 17kb (Wu H 2014). Ils sont exprimés dans les stades précoces de l'embryogénèse, car ils sont nécessaires et suffisants pour initier le XCI puis bloquer l'expression des gènes inactivés, en association avec une augmentation de la méthylation et des modifications répressives des histones des gènes inactivés. Ils continuent ensuite à être exprimés par le chromosome X inactivé pour maintenir le XCI. Leur expression et leur localisation sont promues par les XCIFs (*trans*-acting X Chromosome Inactivation Factors). Cette famille contient des régulateurs de la signalisation cellulaire et de la transcription, tels que DNMT1 (DNA méthyltransférase 1) qui active la transcription des *Xist*.

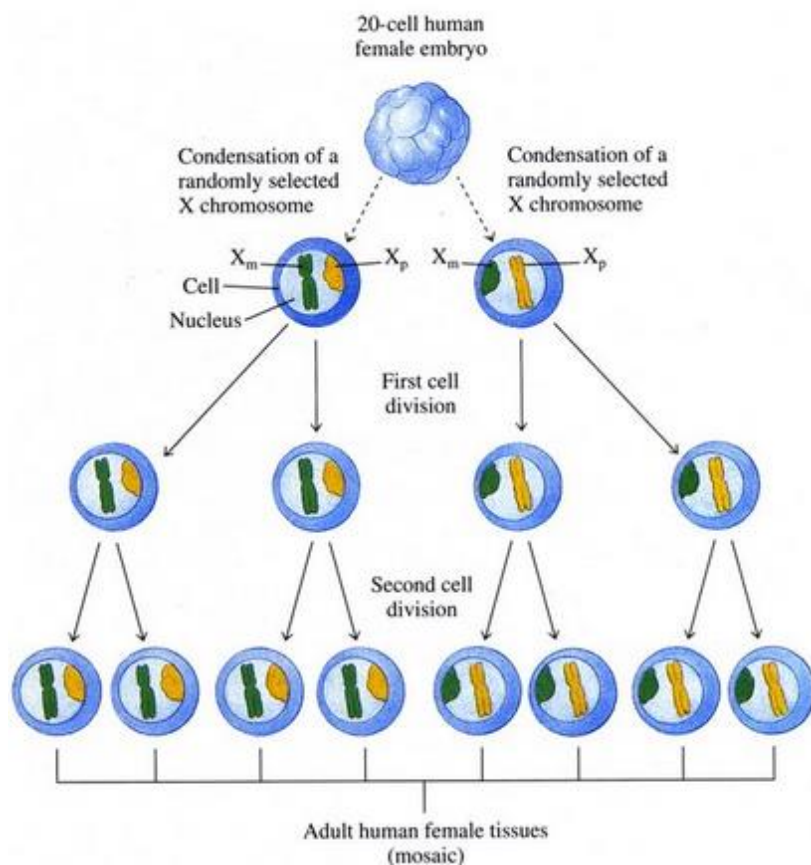


Figure 19. Le phénomène de lyonisation. X<sub>m</sub> est le chromosome maternel, X<sub>p</sub> est le chromosome paternel. (Alberts B 2014)

Le processus génétique d'XCI permet d'avoir une expression identique des gènes liés au chromosome X dans les deux sexes, mais aussi de créer une diversité cellulaire. L'expression équilibrée (50%-50%) des deux chromosomes X ne reflète qu'une vision statistique du phénomène (Figure 19). En effet, des variations d'expression peuvent être observées en conditions normales et pathologiques. En conditions normales, il existe une variabilité « régionale » d'inactivation du X dans certains organes tels que le cerveau qui subit une asymétrie gauche/droite (Wu H 2014). En conditions pathologiques, le processus est plus complexe encore, car il peut être influencé par la fonction du gène muté. Il en résulte donc dans de nombreux tissus un « biais » d'inactivation du X traduisant des processus de contre-sélection.

La liaison au chromosome X du gène *NEMO* est ainsi un paramètre supplémentaire qui impacte grandement sur le phénotype développé par les patientes IP. En effet, l'inactivation biaisée du X est souvent détectée chez ces dernières. Cela révèle des mécanismes de contre-sélection qui affectent les cellules portant la mutation *NEMO*. Ce processus est particulièrement frappant dans les cellules sanguines où souvent plus de 95% des cellules sont de type sauvage (Parrish JE 1996), au lieu de 50% dans le cas d'un processus normal d'inactivation du chromosome X. Cela démontre une disparition spécifique des cellules mutées dans ce compartiment. Ce processus d'élimination n'est pas toujours aussi efficace dans d'autres types cellulaires, ou au sein d'un même tissu. Il peut aussi être variable, ce qui impacte sur les manifestations finales de la maladie. Le meilleur exemple de cela est que des patientes IP portant le réarrangement récurrent de *NEMO*, ce qui correspond donc au même défaut génétique, peuvent montrer un phénotype IP allant d'une dermatose moyenne sans problème supplémentaire à une forme sévère avec des anomalies dentaires, oculaires et/ou cérébrales, comme expliqué précédemment.

De rares cas d'hommes développant la pathologie IP ont été décrits. Souvent, ils présentent un caryotype de 47 chromosomes de type XXY (Klinefelter syndrome) et subissent donc l'inactivation biaisée du X, présentant un mosaïcisme comme les patientes IP (Kenwick S 2001). Ils peuvent aussi avoir un mosaïcisme somatique causé par une mutation post-zygotique (souvent la délétion récurrente des exons 4-10).

## (e) Physiopathologie

La séquence d'évènements causant la dermatose liée à IP traduit une combinaison complexe de processus liés à l'inactivation du X, la signalisation NF- $\kappa$ B dans la peau, et la sensibilité des cellules NEMO (-) à l'apoptose. En utilisant différents modèles murins de la maladie, plusieurs molécules et types cellulaires participant à la dermatose IP, ont été identifiés.

L'invalidation de *Nemo* dans la souris entière génère un phénotype très similaire au phénotype des patientes IP (Schmidt-Supprian M 2000) (Makris C 2000). En effet, alors que les embryons mâles disparaissent à E12.5 à cause d'une apoptose hépatique massive, les souris femelles survivent jusqu'à la naissance et déclenchent à P4/P5, une dermatose typique d'IP. Cette dermatose a été mieux caractérisée en invalidant spécifiquement *Nemo* ou *Ikk2* dans l'épiderme (*Nemo<sup>epKO</sup>* et *Ikk2<sup>epKO</sup>*) (Pasparakis M 2002) (Nenci A 2006). Dans les deux cas la dermatose est toujours observée. Cela démontre que le dysfonctionnement de NF- $\kappa$ B dans les kératinocytes est suffisant pour déclencher la maladie.

Le circuit moléculaire/cellulaire impliqué dans le développement des défauts cutanés semble être identifié. Premièrement, il a été montré que dans, à la fois *Nemo<sup>epKO</sup>* et *Ikk2<sup>epKO</sup>*, plusieurs cytokines présentent une expression anormale dans la peau. A un stade très précoce (P2/P3) après la naissance, et avant la détection d'anomalies phénotypiques visibles, une augmentation de la synthèse d'IL-1 $\beta$  est spécifiquement observée dans l'épiderme. Etant donné que cette augmentation ne peut pas être détectée quand les kératinocytes KO sont cultivés *ex vivo*, ceci indique un évènement cellulaire non autonome. Cet évènement pourrait être lié à la colonisation de la peau après la naissance ou à la fragilité de certaines cellules (nécrose) due à l'absence de NEMO.

Plus tard, au stade P4-P7, une accumulation de TNF- $\alpha$  est détectée exclusivement dans le derme des souris causant de l'apoptose et de l'inflammation cutanée. En effet, en plus de la régulation de la mort cellulaire, TNF- $\alpha$  a également une fonction pro-inflammatoire. Il a été montré que lors de leur exposition à du TNF- $\alpha$ , les kératinocytes déficients en NF- $\kappa$ B produisent de l'IL-24, ce qui conduit à l'activation de STAT3 et à la production de cytokines/chimiokines (Kumari S 2013). Cela permet le recrutement de cellules immunes dans la peau, dont des macrophages (Stratis A 2006), des cellules dendritiques et des neutrophiles. Par contre, les lymphocytes B et T ont été montrés comme superflus à cette étape (Pasparakis M 2002). Remarquablement, toutes les anomalies cutanées IP incluant la forte inflammation et la mort

cellulaire, sont corrigées par l'inhibition de la signalisation TNF-R1 (Pasparakis M 2002), démontrant le rôle clé de cette cytokine.

Une autre caractéristique du phénotype cutané d'IP n'a pas encore été étudiée : il s'agit de l'infiltration éosinophilique de la peau résultant de l'accumulation d'éotaxine durant le stade vésiculaire de la maladie (Jean-Baptiste S 2002).

De ces observations, il a été proposé que le stade mosaïque de la peau néonatale des patientes IP, composées de cellules exprimant à la fois le type sauvage et le type mutant de *NEMO*, est le déclencheur de tout le processus de dermatose. Les cellules mutantes, plus particulièrement les kératinocytes, commenceraient à surexprimer des cytokines proinflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$  juste après la naissance, et cette interleukine induirait la synthèse de TNF- $\alpha$  par les cellules voisines de type sauvage. Cette cytokine induirait en retour un processus inflammatoire et agirait sur les cellules mutantes exprimant *NEMO*, causant leur mort et leur disparition. Ce dernier évènement pourrait expliquer le stade final atrophique de la dermatose IP liée à la disparition des lésions. Si cela est vrai, cela signifie que le défaut génétique initiant le processus dans la peau serait aussi responsable de son extinction, sachant que les cellules cutanées exprimant le chromosome X muté sont sélectivement éliminées près du moment de la naissance. L'autre paradoxe de cette explication est qu'une voie de signalisation NF- $\kappa$ B intacte dans les cellules de type sauvage environnantes est nécessaire pour le développement des anomalies de la peau.

Il est à noter que l'élimination des cellules *NEMO* (-) dans l'épiderme des patientes IP jeunes, n'est pas toujours complète et peut se réamorcer plus tard. Chez certains adultes IP, la maladie de la peau, avec ses différents stades, peut encore être détectée au niveau des lésions originelles après les épisodes d'infection (Bodak N 2003). Une récurrence similaire a été observée en utilisant un système murin permettant une invalidation inductible de *NEMO* dans la peau de souris adultes. Suite à la délétion de *Nemo* dans les kératinocytes, tous les évènements récapitulant la dermatose IP sont observés (Nenci A 2006).

A l'opposé de ce que l'on a commencé à déchiffrer concernant les anomalies de la peau chez les patientes IP, une très petite partie est déjà connue concernant les évènements oculaires ou dans le SNC. Récemment, l'analyse des yeux de souris *Nemo* (-) a révélé des anomalies artériolaires rétiniennes, incluant le rétrécissement luminal, l'hypertrophie des cellules

endothéliales et l'épaississement de la membrane basale. De manière surprenante, ni d'évidentes vaso-occlusions, ni de la néovascularisation n'ont été observées (Oster SF 2009). Quelques progrès ont également été faits en analysant l(es) évènement(s) moléculaire(s)/cellulaire(s) primaire(s) causant les anomalies du SNC chez les patientes IP. Puisque les manifestations de la maladie à ce niveau sont très diverses, il a été difficile d'imaginer un défaut primaire unique, bien qu'une ischémie microvasculaire puisse être un déclencheur (Meuwissen ME 2012) (Hennel SJ 2003). En support de cette origine vasculaire de la maladie dans le cerveau, Ridder *et al.* (Ridder DA 2015), ont récemment établi que NEMO joue un rôle-clé dans l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), en contrôlant la perméabilité vasculaire. Cette observation ainsi que ses conséquences sur la pathologie IP sera discutée plus en détail dans la partie « Résultats & Discussion » de cette thèse.

#### (f) Dépistage de la maladie et traitements

Les critères de diagnostic pour Incontinentia Pigmenti dépendent du contexte familial. Si aucun cas d'IP n'a été recensé auparavant dans la famille, ce qui est le cas pour 50% des patientes, le diagnostic IP est établi si une des quatre phases cutanées est présente, accompagnée d'un critère mineur tel que des anomalies dentaires, de l'alopecie ou des désordres régionaux. Au contraire, la présence d'un seul des critères précédemment cités, ou le fait d'observer de nombreuses fausses-couches de fœtus mâles, est suffisant pour établir un diagnostic IP, dans le cas d'une histoire familiale IP.

Compte-tenu de l'étendue de l'effet phénotypique provoqué par un dysfonctionnement de NF- $\kappa$ B chez les patientes IP, il est difficile d'imaginer traiter la cause primaire de la maladie, qui est l'activité réduite ou l'absence totale de la protéine NEMO. Néanmoins, des efforts sont réalisés pour atténuer certains aspects d'IP.

Un dépistage génétique peut être proposé en cas de transmission familiale, puisqu'un grand nombre de patientes (environ 70%) portent le même réarrangement d'ADN. Si l'IP est identifiée, le conseil génétique consiste à expliquer avec précaution aux parents la difficulté d'anticiper entièrement le spectre et l'étendue des anomalies qui seront présentes chez leur enfant.

Une fois le diagnostic IP établi, les problèmes dentaires peuvent être réduits à l'aide de soins orthodontiques très spécialisés. Concernant les yeux, des séances d'ophtalmologie sont



fréquemment réalisées pendant les premières années de l'enfant pour surveiller tout changement délétère (Chen CJ 2015).

Au niveau des problèmes du système nerveux central, beaucoup de chemin reste à parcourir. En effet, chez environ la moitié des patientes présentant des problèmes au niveau du SNC des crises épileptiques se produisent peu de temps après la naissance. Les protocoles standards de traitement de ces crises ne sont pas toujours efficaces mais une tentative de traitement d'une patiente IP avec des glucocorticoïdes a été effectuée, en supposant une cause inflammatoire (Wolf DS 2015). A un stade ultérieur, la fonction cognitive des patientes IP, et plus particulièrement leurs capacités d'apprentissage, peut être étudiée dans le but de proposer des programmes de rééducation (Pizzamiglio MR 2014).

Les problèmes cutanés, qui constituent le problème récurrent de la pathologie, ne sont habituellement pas traités, à cause d'une connaissance incomplète des mécanismes/composants impliqués. Des traitements anti-TNF- $\alpha$  sont disponibles pour l'Homme (Sanclemente G 2015), et pourraient corriger le phénotype inflammatoire. Il est néanmoins encore incertain si l'inhibition du processus pathologique initié par les cellules mutées, apporterait des améliorations. En effet, un faible réservoir de cellules *NEMO* (-) survivantes peut réamorcer la maladie. Ainsi, garder ces cellules en vie chez des individus jeunes, à l'aide d'un traitement anti-TNF- $\alpha$ , pourrait transformer IP en une maladie chronique. Ceci n'est pas anecdotique, puisqu'il a été montré que les anomalies cutanées d'IP ont des similarités avec le psoriasis.

## 2. (XL-)EDA-ID

Une autre maladie génétique peut être causée par des mutations de *NEMO*. Il s'agit de la dysplasie ectodermique anhidrotique avec immunodéficiência liée au X [XL-EDA-ID, (OMIM # 300291)]. Cette pathologie rare touchant uniquement les hommes, affecte le développement des phanères (les cheveux, les dents et les glandes sudoripares) et engendre des infections bactériennes et virales récurrentes (Puel A 2004) (Kawai T 2012). Les infections sont fréquemment liées à des bactéries Gram (+), comme *S. pneumoniae* et *S. aureus*, et Gram (-) telles que *Pseudomonas*. Leur progression est insidieuse, ce qui entraîne qu'au moment du diagnostic, elles sont souvent déjà disséminées dans l'organisme. Certains patients souffrent aussi de maladies virales et fongiques, telles que l'encéphalite à HSV (Herpes Simplex Virus). La cause de ces réponses déficientes aux infections serait en grande partie le mauvais

fonctionnement de récepteurs de l'immunité innée, inducteurs de la voie NF- $\kappa$ B, tels que TLR4 qui reconnaît le LPS des bactéries Gram (-), et d'autres TLRs.

L'immunodéficiência sévère et potentiellement mortelle liée à cette EDA se définit par de faibles réponses des cellules à l'IL-1 $\beta$ , IL-18, CD40 ou LPS. De plus, il y a un défaut d'activation des cellules NK (Natural Killer) et dans la synthèse d'interféron (IFN), ce qui réduit la réponse immunitaire en cas d'exposition à un virus. En effet, NEMO est un composant essentiel de la voie spécifiquement chargée de la production d'IFN-1. L'immunodéficiência est aussi associée à une production défectueuse d'anticorps spécifiques, avec une diminution de la synthèse des IgG et une augmentation de celle des IgA, accompagnée d'un syndrome d'hyper-IgM.

Le versant immunitaire de cette pathologie peut donc être expliquée par un dysfonctionnement des récepteurs de l'immunité innée et adaptative, qui nécessitent NF- $\kappa$ B pour transcrire des gènes-cibles permettant de combattre les pathogènes.

Le syndrome d'EDA des patients EDA-ID affecte l'ensemble des annexes cutanées. La peau des patients EDA-ID est souvent fragile et peu pigmentée. Elle peut être sujette à des éruptions cutanées ou des infections et même devenir hypo-pigmentée après une blessure. Elle est caractérisée par un défaut de développement des glandes sudoripares, ce qui empêche toute transpiration et donc la régulation de la température corporelle. En outre, les infections respiratoires sont fréquentes car les sécrétions normales de protection de la bouche et du nez ne sont pas présentes (Clarke A 1987).

Les anomalies touchant les follicules pileux se traduisent par des cheveux très fins et clairsemés, se développant lentement et/ou de façon sporadique. Cette dernière information s'applique aussi aux ongles qui peuvent être épais, de forme anormale, décolorés, striés ou cassants. Les cuticules peuvent être sujettes à des infections récurrentes.

Les dents sont également touchées. Souvent, le développement des bourgeons dentaires est altéré, ce qui entraîne l'apparition de dents pointues à l'émail potentiellement défectueux ou même de l'anodontie.

Tous ces défauts sont similaires à ceux observés chez les patients souffrant d'EDA « pure », c'est à dire non accompagnée d'immunodéficiência (Mikkola ML 2003). Cette maladie a des bases génétiques et peut être causée par la mutation de trois protéines : la protéine

ectodysplasine (eda) qui est un membre de la famille du TNF- $\alpha$ , EDAR (EctoDysplasin A Receptor), un membre de la famille des TNF-récepteurs et EDARADD (EDAR-Associated Death Domain), une molécule adaptatrice interagissant avec EDAR et TRAF6. Toutes ces protéines participent au sein d'un même module au processus développemental qui génère spécifiquement les annexes cutanées. L'identification de mutations de *NEMO* générant de l'EDA-ID a donc permis d'identifier la voie NF- $\kappa$ B comme la voie de signalisation activée par eda (Figure 20).

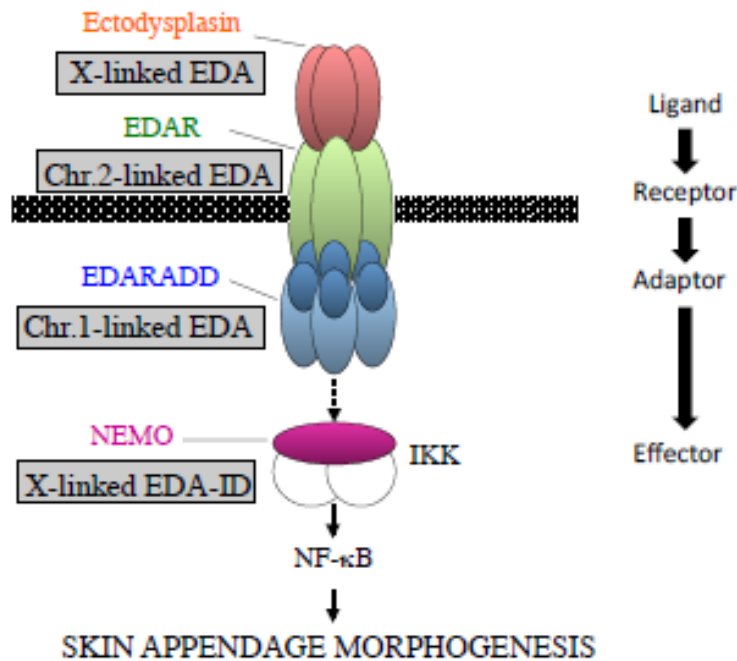


Figure 20. La voie de signalisation ectodysplasin/EDAR. Identification des loci mutés causant une absence de développement des appendices cutanés dans l'EDA et l'EDA-ID. Les ovales bleus foncés représentent les domaines death (DD) d'interaction entre EDAR et EDARADD.

EDA-ID est causée par des mutations hypomorphes de NEMO (Figure 21). A la différence des mutations causant IP, elles permettent la survie des mâles et n'entraînent que des effets négligeables (très faible signes d'IP) chez les femmes (Mortier K 2004). Souvent, de courtes troncations de la protéine se produisent en raison de mutations non-sens ou du décalage du cadre de lecture des codons, mais des mutations faux-sens sont également observées (Figure 19). Elles affectent la plupart du temps des domaines ou des séquences nécessaires à la reconnaissance de l'ubiquitine par NEMO. Néanmoins, l'activité de la protéine n'est pas complètement annihilée puisque la reconnaissance des domaines d'ubiquitination est bipartite.

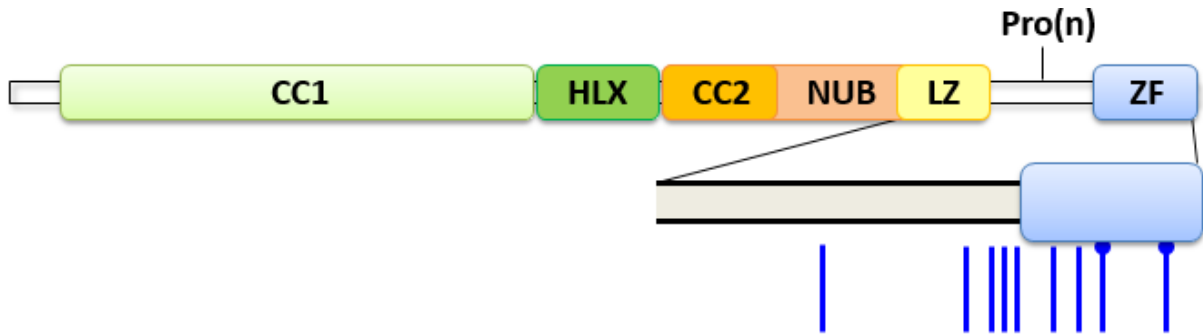


Figure 21. Les mutations tronquantes de NEMO associées à EDA-ID. Les mutations frameshift et non-sens générant EDA-ID sont indiquées respectivement par des lignes bleues, et des lignes bleues terminées par un point.

### 3. OL-EDA-ID

Une autre pathologie associée à l'EDA-ID, causée par l'ajout déstabilisant de 27aa à l'extrémité C-terminale de NEMO (mutation X420W), a été rapportée (Döffinger R 2001) (Figure 19). Elle est appelée dysplasie ectodermique anhidrotique avec immunodéficience, ostéopétrose et lymphœdème [OL-EDA-ID, (MIM # 300301)]. Les problèmes cliniques observés sont proches de ceux typiquement rencontrés dans l'EDA-ID, ajoutés à une augmentation de la masse osseuse due à un fonctionnement défectueux des ostéoclastes et un lymphœdème causé par l'altération de la fonction des vaisseaux lymphatiques (Saaristo A 2002). Ce phénotype soutient l'idée que NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans le développement du squelette et démontre un nouveau rôle du facteur de transcription dans la physiologie des vaisseaux lymphatiques.

#### 4. Immunodéficience

L'immunodéficience sans EDA est caractérisée par des infections récurrentes souvent liées à des mycobactéries. Elle touche seulement les hommes et peut être causée par des mutations faux-sens ou de courtes troncations de l'extrémité N-terminale de NEMO (Figure 21), entraînant des réponses déficientes des lymphocytes spécifiques (Puel A 2004).

Ces mutations, souvent similaires à celles causant l'EDA-ID, génèrent un phénotype sans anomalie de phanères, même si parfois des anomalies dentaires très légères sont détectées chez certains patients. Nous pouvons supposer que ces différents phénotypes (EDA vs EDA-ID) causées par des mutations faibles de NEMO affectant des domaines similaires, sont incapables d'affecter la voie de signalisation eda/EDAR au niveau de la peau. Néanmoins, elles pourraient encore perturber la voie eda/EDAR durant le développement des dents et les voies liées à l'immunité.

##### *B. Maladie associée à IKK1*

La sous-unité catalytique d'IKK, IKK1 est la protéine produite par la transcription du gène *IKKA*. Les mutations autosomiques récessives de ce gène (Figure 22) provoquent une pathologie mortelle appelée « Cocoon syndrome » caractérisée par une membrane « enrobant » le fœtus et des malformations multiples (Lahtela J 2010) (Leslie EJ 2015).

Parmi les nombreuses anomalies détectées dans les fœtus à 12-13 semaines de gestation, il y a des défauts dans la région cranio-faciale dont un kyste crânien anormal, et dans la lobulation pulmonaire, en plus d'un problème d'omphalocele (absence de fermeture de la paroi abdominale antérieure du fœtus). Les muscles squelettiques sont peu développés et il semble que les membres sont absents, car liés au tronc sous la peau très épaissie. C'est ce dernier signe clinique qui a fait qualifier cette maladie héréditaire, de « Cocoon syndrome ».

Après observation des similitudes entre le « Cocoon syndrome » chez l'homme dans une famille Finlandaise et la souris *Ikk1* KO [expliqués ci-dessous, dans ce chapitre], le gène *IKBKA* codant cette protéine a été génotypé dans deux cas. Une mutation homozygote faux-sens, c.1264C-T, a d'abord été détectée dans l'exon 12, générant une grande troncation d'IKK1 et supprimant son domaine catalytique (aa 422-745). L'expression de cette protéine tronquée est alors apparue fortement diminuée, ce qui démontre son instabilité.

Plus récemment, une mutation homozygote d'IKK1 a été identifiée chez une patiente née d'une famille consanguine (Leslie EJ 2015). Cette mutation est censée tronquer une plus grande partie de la protéine IKK1 que dans la famille finlandaise (Figure 22), mais aucune donnée concernant son effet sur la stabilité de la protéine n'a été présentée. Encore une fois, le phénotype est très grave et complexe avec des anomalies du visage telle qu'une fente labiale bilatérale et de la microphthalmie bilatérale, mais aussi diverses anomalies du squelette et des extrémités (syndactylie).

La base moléculaire du « Cocoon syndrome » reste mal définie. Le rôle d'IKK1 en tant que répresseur des membres de la famille des FGF (Fibroblast Growth Factor) dans le développement squelettique et craniofacial murin pourrait être confirmé chez l'Homme (Lahtela J 2010). Le phénotype cutané similaire à celui observé chez le KO murin d'*Ikk1* ne provient pas directement d'une dérégulation de la voie canonique NF- $\kappa$ B, mais est attribuable à un problème de différenciation des kératinocytes, non corrigéables par l'activation de NF- $\kappa$ B (Hu Y 2001).

En fait, le Cocoon syndrome présente plusieurs similitudes avec le syndrome léthal de Bartsocas-Papas (BPS) ou le LPPS (Lethal-type Popliteal Pterygium Syndrome) (OMIM # 263650). Cette affection a été démontrée comme causée par des mutations au niveau de RIPK4 (Kalay E 2012), qui appartient à la famille des RIP kinases, et qui à l'origine, avait été proposé comme étant un activateur de NF- $\kappa$ B dans les voies de signalisation PKC $\beta$ -dépendantes. Néanmoins, les données ont été obtenues en effectuant des expériences de surexpression, ce qui génère souvent des artefacts (Kalay E 2012). En dehors de RIPK4, le facteur de transcription IRF6 peut aussi générer le BPS/LPPS (Kondo S 2002). Longtemps, il a été difficile de définir comment un module moléculaire impliquant IKK1, RIPK4 et IRF6 pouvait contrôler la différenciation des kératinocytes durant le développement ; jusqu'à la démonstration que ce module contrôle en fait la formation du périoderme, une structure couvrant transitoirement les différents épidermes durant le développement et empêchant leur fusion, notamment ceux du corps et des membres.

Les principaux signes morphologiques observés chez les souris KO IKK1, et le « Cocoon syndrome » chez l'homme sont donc indépendants de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. D'autres voies de développement apparaissent par contre, sévèrement touchées. Il reste donc très difficile au final d'estimer quelle(s) partie(s) des anomalies retrouvées dans le

« Cocoon syndrome » sont effectivement liées à NF- $\kappa$ B, au vu de la rareté et de la létalité de cette pathologie. En particulier, la sévérité du syndrome empêche toute analyse du système immunitaire.

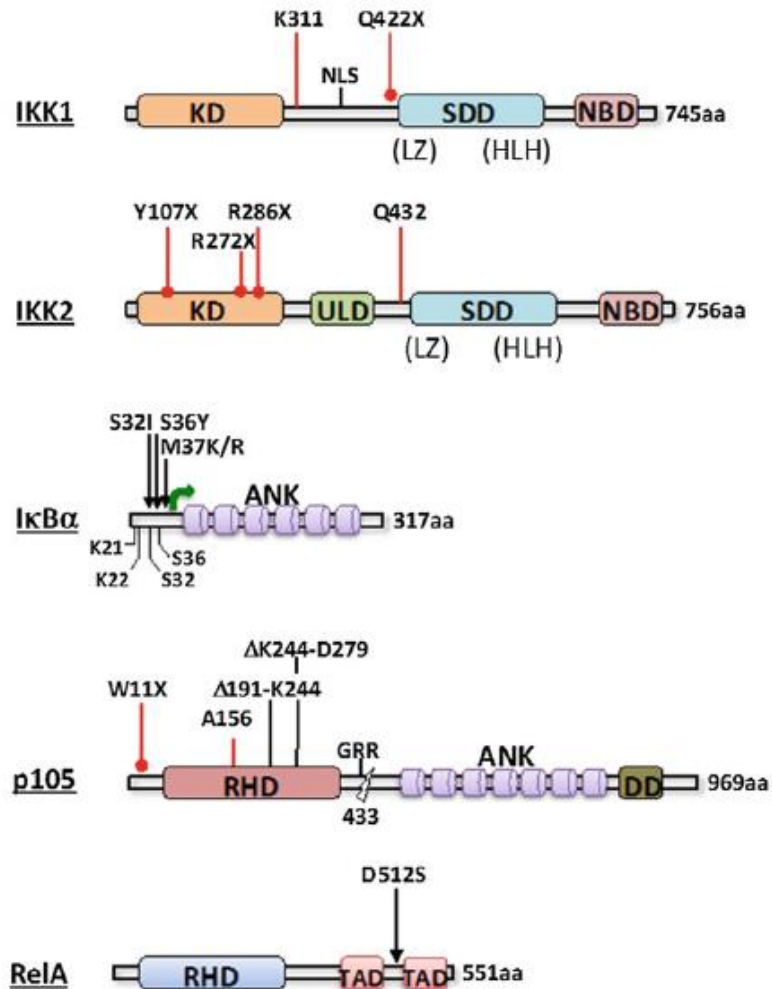


Figure 22. Les mutations des composés de la voie canonique d'activation de NF- $\kappa$ B, hors NEMO, associées à des maladies humaines. Les mutations non-sens sont indiquées par des lignes noires pleines terminées par un point, les mutations décalant le cadre de lecture par des lignes noires et les mutations faux-sens par des flèches noires. Une délétion N-ter d'I $\kappa$ B $\alpha$  résultant d'une réinitiation translationnelle à Met37 est indiquée par une flèche grasse.

### C. Maladie associée à IKK2

Le gène *IKBKB*, présent sur le chromosome 8 humain, code pour la protéine IKK2, unité catalytique d'IKK. Lorsque des patients portent une duplication homozygote (c.1292dupG) de l'exon 13 d'*IKBKB*, il y a formation d'un codon-stop prématuré, troncation d'IKK2 et perte de son expression (Pannicke U 2013). D'autres mutations non-sens dans *IKBKB* (Y107X, R272X et R286X) (Figure 22) donnent le même résultat (Mousallem T 2014) (Burns SO 2014) (Nielsen C 2014). Le complexe IKK devient instable, les expressions d'IKK1 et de NEMO sont diminuées. Cela se traduit par l'apparition d'un Déficit Immunitaire Combiné Sévère (SCID). Ce syndrome décrit un groupe hétérogène de déficiences héréditaires de l'immunité humorale et à médiation cellulaire avec souvent des défauts d'activation lymphocytaire (Pannicke U 2013). Les patients « IKK2-SCID » présentent une hypogammaglobulinémie (ou agammaglobulinémie) et l'apparition d'infections récurrentes virales, fongiques et bactériennes, malgré des taux de lymphocytes B et cellules T normaux. En effet, ces cellules ont en majorité un phénotype naïf à cause d'une activation défectueuse des cellules T, B et NK. Cela entraîne une absence de cellules B mémoire et de production d'immunoglobulines. De plus, la stimulation à travers les récepteurs de cytokines inflammatoires et Toll-like des cellules B et T ou la réponses aux mitogènes est affectée. Les patients SCID ont donc un affaiblissement de l'immunité innée et adaptative.

Étonnamment, aucune EDA n'a été observée chez ces patients SCID IKK2 alors que c'est une caractéristique des patients présentant des mutations hypomorphes de NEMO et des mutations autosomiques dominantes d'I $\kappa$ B $\alpha$  [cf. II.D Maladie associée à I $\kappa$ B $\alpha$  p. 63]. Ceci suggère qu'IKK2 n'est pas indispensable pour le développement des appendices de la peau, l'activité catalytique d'IKK1 devant être suffisante pour compenser l'absence d'IKK2.

De manière intéressante, il est observé la survie des patients présentant une abolition de l'activité catalytique d'IKK2, contrairement aux souris déficientes en IKK2 qui meurent pendant l'embryogenèse à la suite d'une apoptose hépatique massive survenant à E12.5-13.5 (Li Q 1999). Cela démontre une différence de fonction de la protéine IKK2 entre l'homme et la souris durant l'embryogénèse.



#### D. Maladie associée à $I\kappa B\alpha$

Comme indiqué précédemment, l'EDA-ID peut être causée par des mutations hypomorphes de *NEMO* lié à l'X. Or, il existe une forme autosomique dominante (AD) de cette pathologie [(AD) EDA-ID, (OMIM # 612132)] qui est liée à des mutations hétérozygotes du gène codant pour  $I\kappa B\alpha$ , l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B, phosphorylé par IKK. Elles peuvent porter atteinte à la dégradation d' $I\kappa B\alpha$  par le complexe IKK, ce qui provoque un syndrome partageant de nombreuses similitudes cliniques avec la pathologie impliquant NEMO. Ces mutations affectent les résidus Sérine (Ser32 ou Ser36), situés dans le motif DSGLDS phosphorylable par IKK lors d'une stimulation cellulaire (Courtois G 2003) (Janssen R 2004). Elles peuvent aussi toucher le résidu Met37 (Schimke LF 2013), proches de ce motif ou supprimer totalement le N-terminal d' $I\kappa B\alpha$  (Q9X, W11X, E14X), ce qui élimine ainsi les sites phospho-accepteurs (Figure 22) (Ohnishi H 2012) (Lopez-Granados E 2008) (McDonald DR 2007). Dans ces derniers cas, un site de réinitiation (Met37) est utilisé par la machinerie traductionnelle pour produire une protéine  $I\kappa B\alpha$  légèrement plus courte conservant sa capacité d'interagir avec les molécules NF- $\kappa$ B. Dans tous les cas énumérés ci-dessus, et en raison d'une absence de phosphorylation,  $I\kappa B$  ne peut pas être dégradé et agit comme une protéine dominante négative en s'accumulant dans le cytoplasme et en y séquestrant des constituants de NF- $\kappa$ B, tels que RelA, c-Rel ou p50. Cela explique en quoi un mode de transmission génétique hétérozygote est suffisant pour déclencher la maladie.

Dans le cas de mutations affectant  $I\kappa B\alpha$ , la dégradation des autres inhibiteurs  $I\kappa B$  est toujours normale. La similitude des aspects cliniques entre l'EDA-ID liée à *NEMO* et celle liée à *I\kappa B\alpha* indique qu' $I\kappa B\alpha$  est une cible majeure du complexe IKK dans de nombreux tissus, parmi eux le compartiment hématopoïétique et les phanères. Elle confirme également que sa fonction dans le contrôle de l'activité des sous-unités spécifiques de NF- $\kappa$ B ne peut être compensée par d'autres complexes  $I\kappa B$ /NF- $\kappa$ B correctement régulés.

En raison de la gravité de l'EDA-ID, le traitement de ces patients avec une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques représente une option thérapeutique qui permet souvent un rétablissement complet des fonctions immunitaires.

### E. Maladies associées à *NF-κB1*

Le gène *NFKB1* codant pour p105, le précurseur de la sous-unité p50 de NF-κB, est localisé sur le chromosome 4 humain. Un syndrome hétérogène de CVID (ImmunoDéficiency Variable Common) peut être observé lorsqu'il subit une mutation. Cette CVID est caractérisée par des infections récurrentes et un faible taux d'anticorps (Fliegau M 2015). Dans une grande famille incluant des cas sur trois générations, une gamme très variable d'anomalies de la réponse immunitaire a été observée. Les patients peuvent présenter un phénotype seulement composé d'infections, ou une condition bien plus sévère avec de la lymphoprolifération, une atteinte des poumons, une cytopénie auto-immune et une entéropathie. Une hypogammaglobulinémie modérée à sévère peut aussi être observée.

Une étude de liaison génétique a tout d'abord identifié une région de 18.7 Mbp au niveau du locus 4.24, comme portant la mutation (Finck A 2006). A travers un séquençage entier du génome, une mutation hétérozygote du site d'épissage de l'exon 8 du gène *NFKB1* a été trouvée, causant un épissage aberrant reliant l'exon 7 à l'exon 9. L'élimination des 159 nucléotides codants de l'exon 8 cause une délétion interne de 53 aa (Asp191 à Lys244) localisés dans le RHD de p105 (Figure 22). Les cellules B dérivées de patients ont montré une réduction du niveau de p105 et p50 d'environ 50%, indiquant une sévère déstabilisation causée par la mutation. Uniquement des traces de p105 tronquée, et non de p50 tronquée, ont été détectées. En conséquence, une réduction de 50% de la translocation nucléaire de p50 a été observée, après traitement par ionomycine/PMA. A partir de cela, il a été conclu que le syndrome de CVID dans cette famille, est causé par une haploinsuffisance de p50.

Un séquençage complet de l'exome a permis d'identifier deux autres familles souffrant de CVID causée par des mutations de *NFKB1* (Figure 22). De même que précédemment, le syndrome est associé à une grande variation de défauts immuns causée par une haploinsuffisance de p50. Dans la première famille, c'est l'exon 9 qui est touché de façon hétérozygote, introduisant une délétion (Lys244 à Asp279) dans le RHD des protéines p105/p50, ce qui les déstabilise. Dans le second cas, une mutation hétérozygote décalant le cadre de lecture, affecte l'acide aminé Ala156 du RHD, produisant une protéine p105 sévèrement tronquée et indétectable.

Un autre type de mutation affectant *NFKB1* a également été décrit touchant un seul individu (Oberle EJ 2014). Dans ce cas, une mutation hétérozygote non-sens (W11X,) introduit

un codon-stop au début de la séquence codante de p105 (Figure 22). A cause de la petite taille de la protéine produite et son instabilité, l'expression globale de p50 est réduite de 50%. Le syndrome associé apparaît complexe et assez distinct de la CVID décrite ci-dessus, associant une dysplasie ectodermique à des problèmes de croissance (petite taille) avec des défauts dans les articulations et les os (chondrodysplasie métaphysaire notamment). De plus, les patients présentent une hypergammaglobulinémie et subissent de l'inflammation chronique avec un nombre de leucocytes élevé. Cependant, la réponse aux TLRs a été décrite comme normale, sans aucune infection récurrente.

#### *F. Maladie associée à RelA*

Un syndrome de « masse osseuse élevée » (High Bone Mass, HBM), condition très rare chez laquelle le patient présente une formation excessive d'os, a été associé récemment à une mutation hétérozygote faux-sens (Asp512Ser) dans l'exon 11 du gène *RELA* (Frederiksen AL 2015). Elle affectait un patient qui est décédé de cause inconnue à un très jeune âge. Au cours de son autopsie, des problèmes osseux de type HBM ont été détectés. Apparemment, l'excès de masse osseuse n'était pas causé par un défaut d'activité des ostéoclastes, comme dans le cas de l'ostéopétrose observé dans l'EDA-ID dépendante de NEMO. Les liens avec la voie de signalisation NF- $\kappa$ B sont donc difficiles à comprendre. De plus, une étude immunologique n'a pas pu être réalisée. La mutation est localisée dans la séquence de liaison entre TAD1 et TAD2, les deux sous-domaines du domaine TAD de RelA (Figure 22). L'induction de l'activité transcriptionnelle de RelA requiert la phosphorylation des résidus Sérine et Thréonine voisins (Thr505, Ser529 et Ser536). Une interférence dans ce processus pourrait être causée par l'apparition à l'acide aminé 512, d'un nouveau résidu Sérine.

On peut donc supposer que ce syndrome très particulier, causé par une mutation hétérozygote, pourrait être dû à un fonctionnement anormal des homodimères RelA/RelA ou des hétérodimères p50/RelA (ou c-Rel/RelA) (Hoffmann A 2003), présentant une activité réduite de 50%.

L'ensemble des défauts causés par des mutations touchant des composants de la voie d'activation canonique de NF- $\kappa$ B est résumé dans la **Figure 24**.

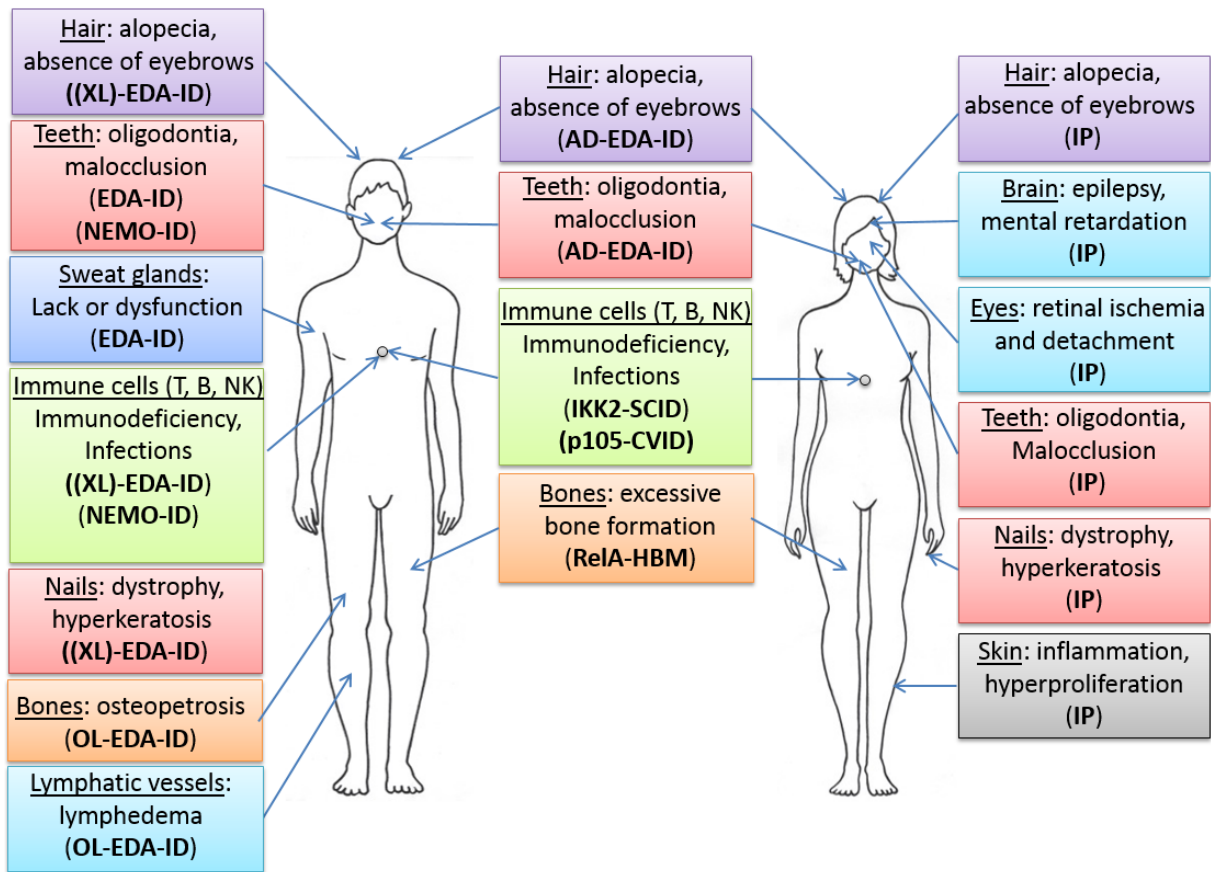


Figure 23. Principaux signes cliniques retrouvés dans les maladies humaines associées à la voie canonique d'activation de NF-κB. Les différentes anomalies retrouvées en fonction du sexe sont listées avec les maladies associées. Le « Cocoon syndrome » n'est pas présenté ici puisqu'il cause une mort précoce du fœtus.

### **III. La voie NF- $\kappa$ B dans le cerveau**

#### *A. Les différentes cellules du cerveau*

Les neurones sont les cellules les plus caractéristiques du cerveau. Ce sont elles qui transmettent les messages nerveux sous forme de potentiel d'action, à partir de leur synapse. La synapse correspond à la terminaison de l'axone qui est une longue extension de la cellule entourée de myéline, qui protège les fibres nerveuses et accélère la conduction du signal (Kaltschmidt B 2009). Le neurone peut aussi recevoir des stimulations sur l'ensemble de son arbre dendritique. Les dendrites correspondent à des prolongements du corps cellulaire des neurones, qui vont former de courtes excroissances appelées « épines dendritiques ».

Les oligodendrocytes sont des cellules qui envoient de multiples projections s'enroulant autour des axones pour constituer la myéline dans le SNC (Salzer JL 2003). C'est une membrane grasse constituée principalement de lipides, permettant une transmission plus rapide des potentiels d'action sur l'axone. Les oligodendrocytes supportent aussi la fonction et la survie des axones (Fünfschilling U 2012).

Les astrocytes constituent avec la microglie, les cellules gliales (Allen NJ 2009). La microglie correspond aux cellules immunitaires du cerveau puisqu'elles dérivent du même précurseur que les macrophages, cellules phagocytant les débris cellulaires dans le système immunitaire général. Elles surveillent également leurs cellules voisines pour vérifier qu'elles ne subissent aucun dommage. Si c'est le cas, la microglie prend un phénotype activé et va assurer plusieurs fonctions pour éviter que l'inflammation et les lésions engendrées ne se propagent dans le cerveau. Elle a ainsi un rôle dans la plasticité synaptique.

Les astrocytes surveillent le niveau d'activité neuronale et peuvent produire et sécréter des substances pour envoyer des messages chimiques. Par exemple, si des neurones manquent d'apport en oxygène pour fonctionner, les astrocytes vont envoyer des signaux aux vaisseaux sanguins locaux pour qu'ils se dilatent et réduisent ce besoin (Figure 24). Ils ont aussi une influence sur la formation et l'élimination des synapses, selon les besoins.

Les cellules endothéliales forment l'endothélium, qui est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins. Elles sont un composant essentiel de la barrière hémato-encéphalique, de par leurs différentes propriétés morphologiques et biologiques (Zhang Y 2016). Ces cellules sont en effet plates et polarisées, avec un contact direct avec le sang au niveau de leur face apicale, tandis que leur face basale est fixée sur une lame basale constituée de collagène. Elles

assurent l'intégrité des vaisseaux sanguins et permettent des échanges gazeux, métaboliques ou liquidiens rapides entre le sang et le liquide interstitiel où baignent les cellules. Ce phénomène se réalise grâce à leur grande perméabilité.

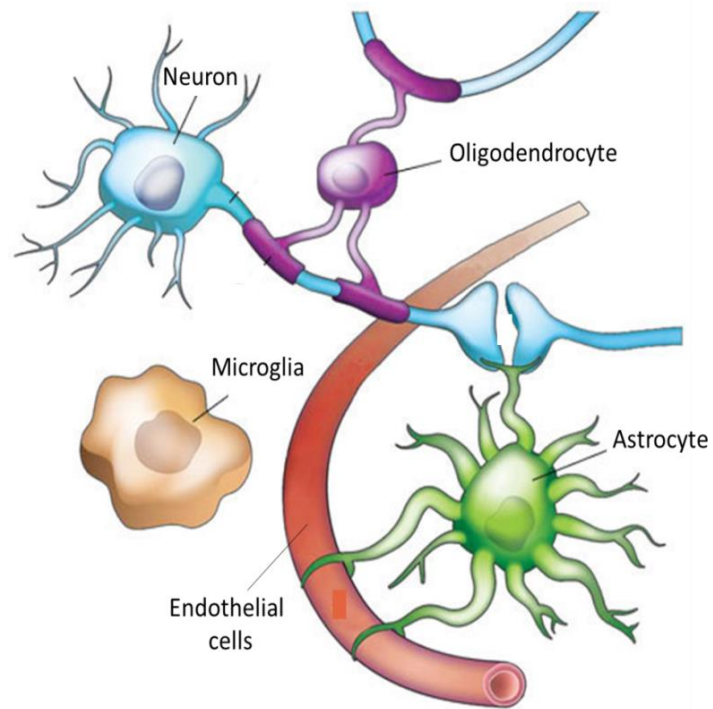


Figure 24. Les principales cellules du cerveau (Allen NJ 2009)

## B. L'activité de NF- $\kappa$ B dans le cerveau

### 1. La localisation cérébrale de NF- $\kappa$ B actif durant le développement

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B a une activité constitutive dans certaines populations cellulaires neuronales durant l'embryogénèse. Cela a été montré par Schmidt-Ullrich *et al.* (Schmidt-Ullrich R 1996) et Bhakar *et al.* (Bhakar AL 2002) dans des cerveaux de souris transgéniques ayant un gène  $\beta$ -galactosidase (LacZ) placé sous contrôle de promoteurs dépendant de l'activation de NF- $\kappa$ B.

Schmidt-Ullrich *et al.* (Schmidt-Ullrich R 1996) ont utilisé un gène  $\beta$ -galactosidase (LacZ) placé sous contrôle du promoteur de la sous-unité p105, qui lui-même répond à NF- $\kappa$ B.

L'expression cérébrale la plus précoce de la voie NF- $\kappa$ B a été détectée au stade embryonnaire E12.5, et plus particulièrement au niveau des neurones du rhombencéphale, qui est la première région cérébrale à devenir mature au cours du développement (Schmidt-Ullrich R 1996). L'activité de NF- $\kappa$ B est ensuite retrouvée à E14.5 dans les noyaux pontiques et olivaires, en plus du cervelet. Au stade embryonnaire E18.5, cette voie est fortement active au niveau de l'épithalamus qui formera une partie du système limbique, et toujours au niveau des noyaux pontiques (Figure 25A).

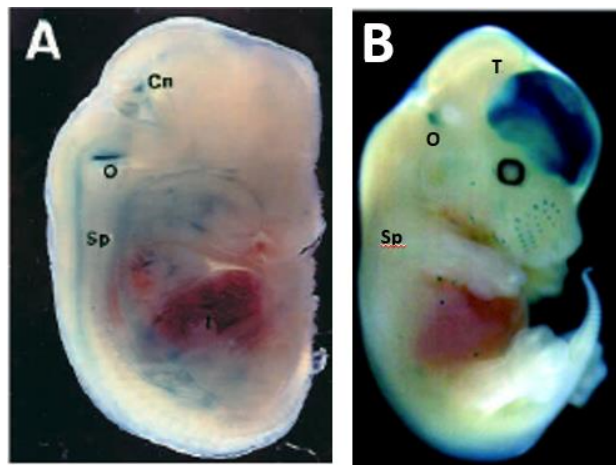


Figure 25. Activation de NF- $\kappa$ B au stade E13 chez la souris. A. Cn : noyaux cérébelleux, O : noyau olivaire, Sp : moelle épinière (Schmidt-Ullrich R 1996). B. T : télencéphalon, figure adaptée de (Bhakar AL 2002).

Schmidt-Ullrich *et al.* ont également mis en évidence que les zones détectées comme positives pour l'expression de *lacZ*, telles que les noyaux pontiques et l'hippocampe, contiennent des hétérodimères p50/RelA et des homodimères p50/p50. Au contraire, dans les

zones cérébrales ne montrant aucune expression de lacZ telles que l'hypothalamus, seulement des homodimères p50/p50 sont retrouvés. Ces résultats démontrent que l'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans ces souris transgéniques, est directement corrélée avec l'activité nucléaire p50/RelA. Par contre, il semble que la présence unique d'homodimères p50/p50 ne soit pas suffisante pour conduire l'expression dépendante de NF- $\kappa$ B *in vivo*.

Bhakar *et al.* (Bhakar AL 2002) ont utilisé un système différent pour détecter l'activation de NF- $\kappa$ B. Dans leur reporter, trois répétitions en tandem du site NF- $\kappa$ B ont été placées en amont d'une TATA box (promoteur minimal de SV40) pour contrôler l'expression de *LacZ*. Dans ce cas, une forte activité NF- $\kappa$ B a été observée dès E13 au niveau du télencéphale, des plexus choroïdes et le long de la plaque neurale au niveau du mésencéphale (Figure 25B).

Ils ont aussi étudié le niveau d'activité de NF- $\kappa$ B dans un contexte d'inactivation de TRAF6 et observé une perte d'expression *lacZ* au niveau des plexus choroïdes (Dickson KM 2004). Cela démontre la participation de cette E3 ligase dans l'activation constitutive de NF- $\kappa$ B au niveau de ces zones spécifiques. Au contraire, l'expression de *lacZ* est retrouvée au niveau du télencéphale, du corps strié (striatum + globus pallidus) et du thalamus, prouvant que l'activation neuronale de NF- $\kappa$ B se réalise également à travers des mécanismes indépendants de TRAF6.

Les domaines d'activation de NF- $\kappa$ B durant l'embryogénèse apparaissent donc significativement différents au niveau du cerveau dans les deux études réalisées (Figure 25). Dans le premier cas (Schmidt-Ullrich R 1996), les auteurs ont utilisé un promoteur répondant naturellement à NF- $\kappa$ B. Néanmoins, Il faut rester prudent, car l'utilisation d'une région promotrice de grande taille pourrait causer la détection d'une activité transcriptionnelle autre que celle de NF- $\kappa$ B. Au contraire, Bhakar *et al.* (Bhakar AL 2002), ont fabriqué un système artificiel dans le but d'obtenir un contrôle plus direct et uniquement dépendant de l'activation de NF- $\kappa$ B. Ce système est aussi potentiellement plus sensible à l'activité de NF- $\kappa$ B et pourrait détecter des zones d'activation plus faibles que le système de Schmidt-Ullrich *et al.*

Après la naissance et jusqu'à trois semaines ensuite, des changements drastiques apparaissent dans l'activité de cette voie. Des zones d'activité NF- $\kappa$ B plus étendues sont observées dans l'organisme, telles qu'au niveau de la moelle osseuse, de la rate et de la capsule



des nœuds lymphatiques, qui sont des lieux importants dans le processus de l'immunité. Cela va aussi coïncider avec la maturation fonctionnelle et morphologique du cortex et du cervelet, où l'activité NF- $\kappa$ B sera maintenue (Schmidt-Ullrich R 1996).

A l'âge adulte, la voie NF- $\kappa$ B est plus particulièrement présente dans l'hippocampe, au niveau de la synapse des axones et des dendrites neuronales. Son activation y serait, par ailleurs, régulée par la transmission basale physiologique des synapses [cf. III.B.3 La signalisation NF- $\kappa$ B dans le p. 72].

## 2. Un rôle mal défini dans le développement cérébral embryonnaire

Comme expliqué précédemment, la voie NF- $\kappa$ B apparaît activée durant le développement cérébral, mais son rôle reste peu clair. L'activité détectée joue-t-elle un rôle dans le développement cérébral, en permettant de générer des populations cérébrales, ou dans la fonction de certaines zones du cerveau ? En support de la première option, un rôle dans la régulation de la neurogénèse a été proposé (Methot L 2013) (Yamanishi E 2015) (Zhang Y 2012). Néanmoins, les différents KO individuels des sous-unités de NF- $\kappa$ B ne présentent pas de défaut développemental cérébral apparent, mais une redondance ou une compensation pourrait exister. Il en est de même concernant les KO individuels des deux sous-unités catalytiques d'IKK, IKK1 (Takeda K 1999) et IKK2 (Li Q 1999). La seule étude publiée concerne l'analyse du développement cérébral sous l'effet d'un double KO d'IKK1/IKK2 qui génère une abolition de l'activation NF- $\kappa$ B (Li Q 2000). Comme attendu, les souris meurent durant leur développement à E12, à cause d'une apoptose massive du foie. Elles présentent en plus, un défaut de neurulation et des anomalies affectant la moelle épinière et le neuroépithélium au niveau du cerveau postérieur. En effet, 70% des embryons portant la double délétion révèlent un défaut de fermeture du tube neural au niveau du cerveau postérieur et une vésicule télencéphalique plus petite. Par contre, aucun défaut de la différenciation neurale n'est observé. Néanmoins, une apoptose est constatée, indiquant que NF- $\kappa$ B aurait un rôle de neuroprotection contre une apoptose cérébrale excessive durant le développement, ce qui est un résultat non observé dans l'étude distincte de chacune de ces deux sous-unités d'IKK.

Une limitation de cette étude est le ciblage des deux sous-unités distinctes d'IKK pour obtenir le phénotype. Car, il semblerait qu'elles aient aussi des fonctions indépendantes de NF- $\kappa$ B [cf. I.B.2(a) Le complexe IKK p. 22].

Au contraire, l'invalidation spécifique de *Nemo*, qui est absolument nécessaire à l'activation de NF- $\kappa$ B par la voie classique, à l'aide d'un système Nestin-Cre, ne génère aucun phénotype. Les animaux se développent et se reproduisent de façon normale (Van Loo G 2006). Néanmoins, l'utilisation du promoteur de la Nestin pour exprimer Cre n'est pas sans limitation. En effet, il a été montré qu'il est actif durant des phases relativement tardives du développement cérébral (Sun MY 2014). Pour étudier le phénotype cérébral résultant de l'abolition de l'activation de NF- $\kappa$ B de manière génétiquement plus propre, il serait intéressant de regarder durant le développement de souris mâles, l'effet d'un KO *Nemo*. En effet et comme expliqué précédemment, elles meurent à E12 d'une apoptose massive des hépatocytes et, à ce jour, n'ont pas été étudiée au niveau du cerveau. La question reste donc ouverte concernant la réelle participation de NF- $\kappa$ B à des processus développementaux cérébraux.

### 3. La signalisation NF- $\kappa$ B dans le neurone

Les cellules du cerveau communiquent beaucoup entre elles, grâce à la stimulation de récepteurs synaptiques et dendritiques variés. Cette stimulation implique des neurotransmetteurs qui sont libérés par des neurones excitateurs, tels que le glutamate qui agit au niveau de récepteurs tels que les mGluRs (récepteurs métabotropiques au glutamate) et iGluRs (récepteurs ionotropiques au glutamate), famille à laquelle appartiennent les NMDARs (N-Méthyl-D-aspartique Acid Receptor) (Meldrum BS 2000). Il a été montré que cela augmente l'activité de liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN.

La signalisation de NF- $\kappa$ B dans le cerveau est permise, entre autres, grâce à sa localisation au niveau des synapses et des épines dendritiques dans les neurones. Ces dernières sont des excroissances de la membrane des dendrites d'un neurone qui peuvent être en contact avec les axones des neurones présynaptiques (Figure 26). La localisation de NF- $\kappa$ B dans des synaptosomes isolés a été montrée par des analyses biochimiques et d'immunochimie (Meberg PJ 1996).

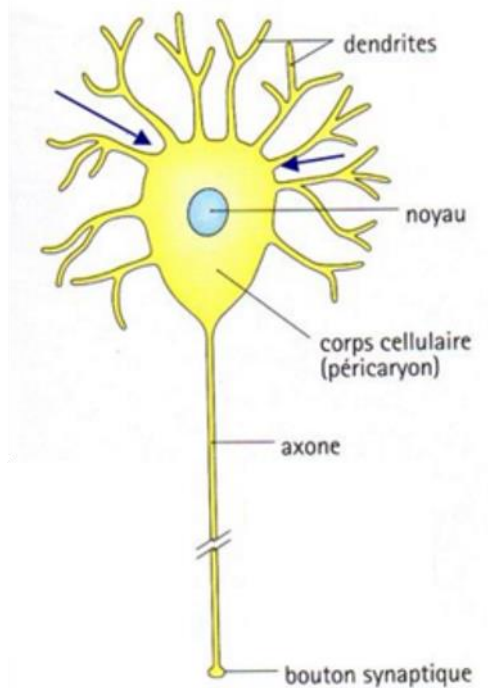


Figure 26. Schéma d'un neurone. (Nataf 2009)

De plus, il a été prouvé que le système ubiquitine-protéasome, nécessaire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par la dégradation des protéines I $\kappa$ B, est aussi présent dans les dendrites et synapses du SNC (Ehlers MD 2003). NF- $\kappa$ B se situe dans un réservoir synaptoplasmique libre et dans un réservoir ancré à la membrane, avec des échanges dynamiques entre les deux réservoirs régulés par l'activité synaptique. Des événements synaptiques permettent un transport de NF- $\kappa$ B actif et de manière rétrograde de la synapse jusqu'au noyau. Ainsi, ils sont rapidement traduits en changement dans l'expression des gènes cibles. Ce transport le long des microtubules jusqu'au noyau est permis par l'exposition du NLS de RelA et son interaction avec le complexe moteur dynéines/dynactine, après destruction d'I $\kappa$ B $\alpha$  qui le masquait (Salles A 2014) (Figure 27). Il existe aussi un faible transport antérograde correspondant au recyclage permanent de NF- $\kappa$ B à la synapse.

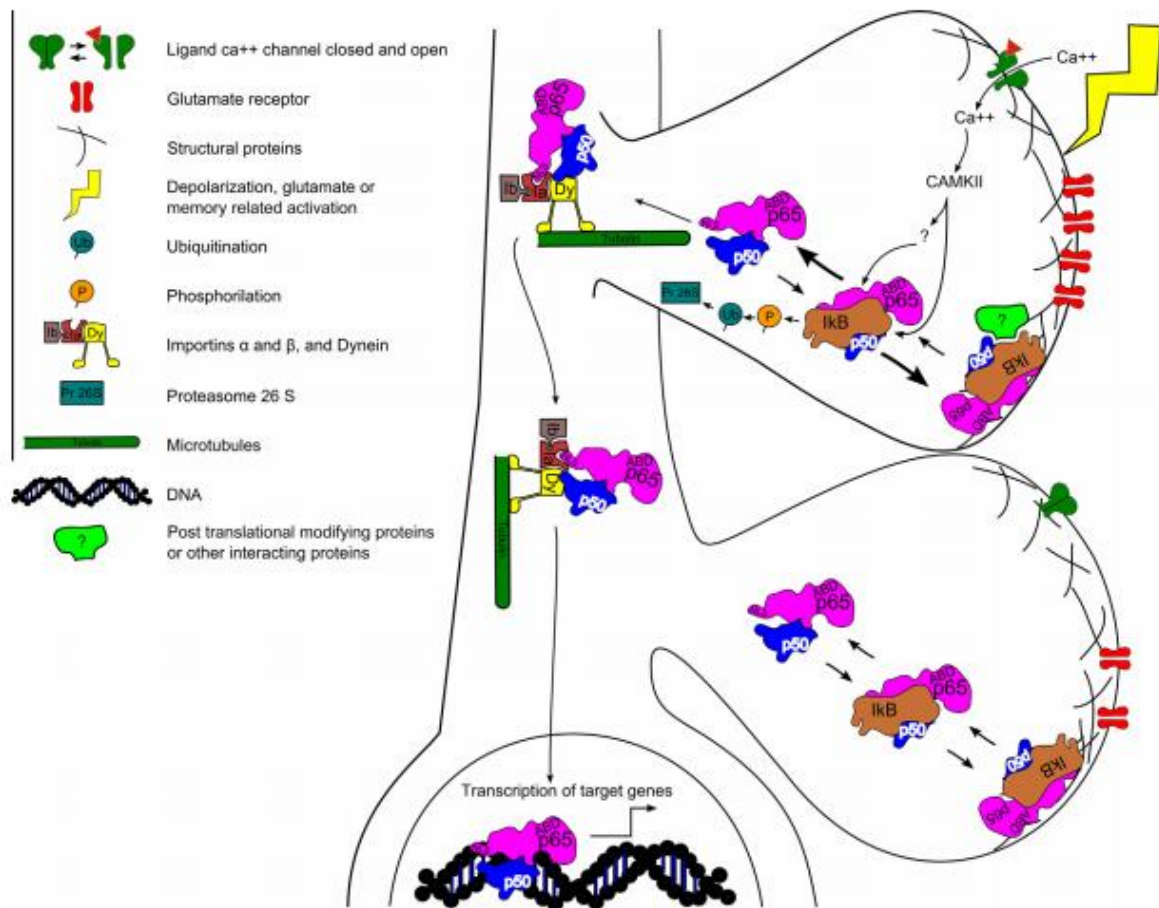


Figure 27. Localisation et signalisation de NF-κB dans les neurones. (R. A. Salles A 2014)

La transmission neuroexcitatrice qui active NF-κB se réalise par l'intermédiaire d'une augmentation du niveau basal d'activité synaptique, et donc l'ouverture des canaux ioniques synaptiques (Meffert MK 2005). L'entrée d'ions tels que le calcium ( $Ca^{2+}$ ) dans la cellule entraîne une cascade calcique incluant la protéine kinase Calmoduline-dépendante II (CamKII) abondante au niveau des synapses, ce qui est suffisant pour activer la voie de signalisation NF-κB dans la cellule. Néanmoins, le mécanisme d'activation d'IKK par CamKII reste encore mal défini. Il existe trois senseurs cellulaires majeurs liant le niveau cytosolique du  $Ca^{2+}$  à l'activité NF-κB : les cascades de la PKC (Protein Kinase C), Ras/PI<sub>3</sub>K/Akt et de la calmoduline (Lilienbaum A 2003). La calmoduline déclenche l'activité de la calcineurine, une phosphatase ayant un rôle dans l'activité basale de NF-κB. La stimulation des voies de signalisation de la CamKII incluant la PKC, et de la kinase Akt (aussi appelée PKC, Protéine Kinase B) entraîne une régulation positive du potentiel transcriptionnel de la sous-unité RelA de NF-κB. Ces trois composants convergent vers NF-κB, au niveau de la translocation nucléaire et de son activité transcriptionnelle.

De manière intéressante, le blocage du récepteur au NMDA activable par le glutamate et couplé aux canaux calciques de type L, réduit le niveau basal d'activité NF- $\kappa$ B, (Liu X 2008). Cela indique un contrôle complexe de ce facteur de transcription au niveau synaptique (Salles A 2015).

### C. Les fonctions de NF- $\kappa$ B dans le cerveau

#### 1. Rôle dans les neurones

##### (a) Rôle dans la plasticité synaptique et dendritique

La plasticité synaptique correspond à la modification des connexions entre les neurones issus d'un réseau. Cela engendre des processus tels que la mémoire et l'apprentissage, qui passent par la croissance de nouvelles synapses, l'activation d'une synapse silencieuse ou inversement, l'inactivation d'une synapse active, et le changement de forme et/ou de taille de synapses (Bliim N, *sous presse*). La création/élimination d'épines dendritiques pouvant subir les modifications morphologiques précédemment citées est aussi importante dans ces processus. En effet, elles permettent le stockage d'informations à long terme, puisqu'elles sont assez longtemps conservées, avec un renouvellement assez faible tout au long de la vie. Néanmoins, les épines dendritiques peuvent aussi subir des changements rapides dépendants de l'activité neuronale, au niveau de la taille et de leur forme (Saneyoshi T 2010). Par exemple, les épines dendritiques des neurones pyramidaux de l'hippocampe augmentent en volume durant la LTP (Long Term Potentiation) qui permet l'apprentissage, et réduisent durant la LTD (Long-Term Depression) qui engendre l'amnésie (Alvarez VA 2007).

Plusieurs sous-unités NF- $\kappa$ B, telles que p50 et RelA qui sont détectées dans les synaptosomes et en pré- et postsynaptique *in vivo* (Meffert MK 2003), sont requises dans l'établissement de l'apprentissage et de la mémoire. Cela a été montré en utilisant différentes approches d'inactivation de NF- $\kappa$ B (pharmacologique ou sous forme de KO) dans l'organisme entier de différentes espèces (souris (Albensi BC 2000) et rat (Lubin FD 2007)). Par exemple, les souris *p50*<sup>-/-</sup> ont un déficit de mémoire spatiale à court terme observé par le test comportemental de reconnaissance de place (Denis-Donini S 2008), les *c-rel*<sup>-/-</sup> ont un problème de formation de la mémoire (Ahn HJ 2008) dans le « Cue Test » et les souris *RelA*<sup>-/-</sup>/*Tnfr1*<sup>-/-</sup> ont des défauts d'apprentissage spatial dans le test du Radial Arm Maze (Meffert MK 2003). Les différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B ne semblent donc pas avoir un rôle redondant dans la formation de la mémoire et de l'apprentissage. Le rôle de la sous-unité RelB dans la plasticité

synaptique reste par contre encore peu étudié, malgré sa forte présence à la synapse (Schmeisser MJ 2012).

NF- $\kappa$ B joue un rôle dans la plasticité synaptique en régulant l'expression de plusieurs protéines essentielles à ce processus (Figure 28). Tout d'abord, NF- $\kappa$ B régule l'expression de la PKA $\alpha$ , la sous-unité catalytique de la kinase PKA (Protein kinase A) qui est impliquée dans la voie de signalisation PKA-CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein). Il a été montré que des neuromodulateurs tels que la dopamine peuvent activer des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui en retour, vont activer l'adénylcyclase localisée à la membrane. Cela augmente la concentration en AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) intracellulaire et permet la translocation nucléaire de PKA $\alpha$ . Dans le noyau, PKA $\alpha$  phosphoryle CREB (Kaltschmidt B 2015) au niveau de la Ser133, entraînant son activation et la transcription de gènes-cibles impliqués dans la plasticité synaptique (West AE 2002).

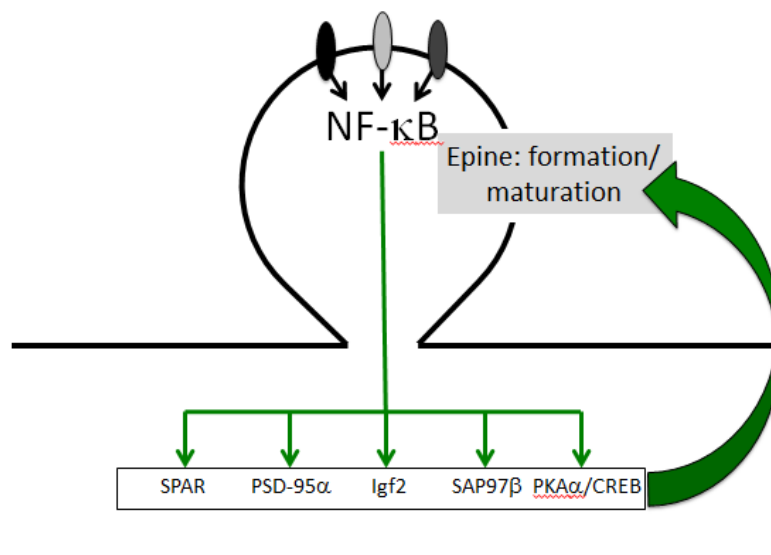


Figure 28. L'expression dépendante de NF- $\kappa$ B des protéines impliquées dans la plasticité synaptique

De plus, le gène codant pour l'Insulin-like Growth Factor 2 (*Igf2*) a également été identifié comme une cible de NF- $\kappa$ B. En effet, un ajout d'Igf2 exogène est capable en 24h de restaurer la densité synaptique et de promouvoir la maturation des épines dendritiques dans des neurones déficients en signalisation NF- $\kappa$ B (Schmeisser MJ 2012). Igf2 agit en se fixant sur Igf2R et en activant la voie de signalisation MEK/ERK (voies des MAP kinases). La signalisation NF- $\kappa$ B joue donc un rôle important dans la formation et la maturation de synapses

chez les souris adultes, ce qui met en évidence un lien intéressant entre les actions moléculaires de NF- $\kappa$ B dans les neurones et le facteur d'amélioration de la mémoire Igf2.

Finalement NF- $\kappa$ B régule l'expression de plusieurs constituants de l'épine dendritique, tels que SPAR, PSD95 $\alpha$  (PostSynaptic Density protein) et SAP97 $\beta$  (Synapse-Associated Protein 97).

SPAR est une protéine postsynaptique qui forme un complexe avec PSD-95 et les NMDARs, et qui régule morphologiquement les épines dendritiques (Pak DT 2001). Des défauts dans l'apprentissage ont été observés chez des souris traitées avec des oligonucléotides anti-sense SPAR (SPine-Associated Rap-specific GTPase-activating protein) (Lu XJ 2009). Cela prouve donc que SPAR est fonctionnellement requise pour la plasticité synaptique et qu'elle contribue aux processus d'apprentissage et de mémoire (Figure 28).

De même, le blocage neuronal de NF- $\kappa$ B dans le prosencéphale de souris par une inactivation génétique conditionnelle de l'activité d'IKK2, sous contrôle du gène de la CamKII, est associé à une densité réduite d'épines dendritiques matures, et ainsi, un niveau réduit de protéines postsynaptiques PSD-95 $\alpha$  et SAP97 (Schmeisser MJ 2012). Ces défauts synaptiques peuvent être restaurés en une semaine dans les animaux adultes, par une réactivation IKK/NF- $\kappa$ B, ce qui indique un processus très dynamique de régulation IKK/NF- $\kappa$ B dépendant au niveau des neurones.

L'activité NF- $\kappa$ B dans le contexte de la plasticité synaptique et dendritique se fait souvent en concert avec d'autres voies de signalisation, telles que la voie Notch (Mathieu P 2013). En effet, Notch et deux de ses ligands (Delta-1 et Jagged-1) sont exprimés ensemble dans les neurones pyramidaux C3 de l'hippocampe, avec le récepteur commun aux neurotrophines (p75<sup>NTR</sup>) et les facteurs de transcription helix-loop-helix, Hes1 et Hes5 (Salama-Cohen P 2006). Cela suggère une convergence des signalisations Notch et neurotrophine, qui régule NF- $\kappa$ B, dans le contrôle de la morphologie dendritique, au moins dans cette région.

En dehors de son action sur la dynamique de formation des épines dendritiques, NF- $\kappa$ B peut aussi contrôler le processus d'apprentissage et de mémoire en régulant la croissance des axones ou des dendrites.

Il a été prouvé que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par la liaison du TNF- $\alpha$  à son récepteur TNF-R1 au niveau des neurones sympathiques, induit la phosphorylation de RelA sur Ser36,

ce qui entraîne l'inhibition de la croissance de leurs axones (Gutierrez H 2008) (Figure 29). Par contre, l'activation de la voie canonique selon un processus mal identifié promeut la croissance axonale des neurones du ganglion inférieur du nerf vague, sous contrôle de la neurotrophine BDNF (Brain-Derived Nerve Factor), et cela n'implique apparemment pas la phosphorylation de RelA.

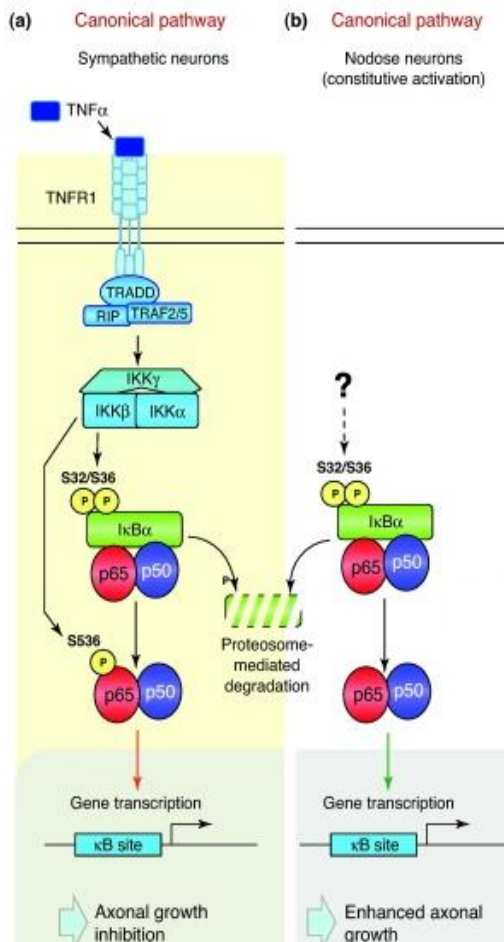


Figure 29. Rôle de la phosphorylation de RelA dans la croissance axonale (Gutierrez H 2011)

Dans le cas de la croissance dendritique au niveau des cellules de Purkinje (neurones GABAergiques du cortex cérébelleux), deux cibles transcriptionnelles de NF- $\kappa$ B ont été identifiées : MAP2 et MAP1B (Microtubule-Associated Proteins). Ces protéines sont localisées dans le compartiment somatodendritique des neurones et promeuvent l'assemblage et la stabilisation des microtubules, ce qui permet une élongation des dendrites (Teng J 2001).

Comme indiqué ci-dessus, NF- $\kappa$ B est un important régulateur positif de la morphologie neuronale et de la formation des structures cérébrales, responsables du développement normal de la mémoire et de l'apprentissage, dans les neurones glutamatergiques. Au contraire, une



activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par des interneurons inhibiteurs GABAergiques freine des processus tels que la mémoire et l'apprentissage (Kaltschmidt B 2009). Un rétrocontrôle se réalise ici, puisque NF- $\kappa$ B régule dans les interneurons inhibiteurs, l'expression de l'enzyme GAD65 (Glutamate Décarboxylase 65) qui est requis pour la synthèse de GABA (O'Mahony A 2006). L'activité de NF- $\kappa$ B est donc capable d'affecter la magnitude de la transmission inhibitoire, comme le prouve l'augmentation de la transduction du signal excitatoire et de la LTP chez des souris transgéniques ayant une surexpression du super répresseur I $\kappa$ B $\alpha$ -SR dans les neurones GABAergiques, et une faible expression dans les neurones glutamatergiques. Cela amélioré leurs capacités mnésiques et d'apprentissage spatial dans le test de comportement du labyrinthe radial (O'Mahony A 2006). Ce résultat est à mettre en opposition avec celui observé lorsque seul le compartiment glutamatergique est ciblé (Meffert MK 2003).

La conclusion est donc que la stimulation glutamatergique de la synapse où se trouve NF- $\kappa$ B, entraîne la promotion de la plasticité synaptique. Au contraire, une stimulation GABAergique entrainera l'expression de gènes-cibles réprimant la plasticité synaptique. Ce dernier processus peut être modulé par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B elle-même, qui appartient donc à une boucle de rétrocontrôle négatif de la plasticité synaptique (O'Mahony A 2006).

#### (b) Le rôle de NF- $\kappa$ B dans la neurogénèse et la neuroprotection chez l'adulte

L'acquisition et la consolidation de nouvelles informations dans les réseaux neuronaux pour les processus de mémoire et d'apprentissage dépendent, entre autres, de la formation de nouveaux neurones (neuroneogénèse), de la croissance des axones et dendrites (neuritogénèse) et de la formation/remodelage des épines dendritiques (synaptogénèse, LTP et LTD) (Engelmann C 2016).

La neurogénèse se réalise tout au long de la vie grâce aux cellules souches pouvant remodeler deux régions du cerveau en réponse à des changements physiologiques (Nakada D 2011) : la zone subventriculaire des ventricules latéraux (SVZ) et la zone subgranulaire du gyrus dentelé (DG) de l'hippocampe (Ming GL 2005). Or, une ablation génétique de NF- $\kappa$ B dans la région neurogénique du DG entraîne de sérieux défauts chez des souris âgées tels que des problèmes d'apprentissage dans le test comportemental de séparation de motif dans l'espace

(Spatial-Pattern-Separation-Barnes Maze). Les phénomènes de synaptogénèse et axogénèse dans les neurones immatures, et de neuroprotection dans les neurones matures, sont réduits avec une atrophie du DG. Il y a aussi une forte augmentation du nombre d'astrocytes activés, ce qui est une marque de neuroinflammation (Imielski Y 2012). Le phénotype normal peut être rétabli par la réactivation de NF- $\kappa$ B, ce qui permet l'intégration de nouveaux neurones et donc la régénération du DG, avec une totale récupération des défauts structuraux et comportementaux. NF- $\kappa$ B est donc un régulateur crucial de l'homéostasie du DG, qui correspond à une balance entre mort cellulaire et neurogénèse (Henson PM 2006).

L'activation répétée et régulière des réseaux, telle que lors d'une LTP, permet de renforcer les branchements synaptiques de ces connexions, ce qui consolide le souvenir. Au contraire, si le réseau n'est peu ou pas activé ou subit une LTD, cela va réduire les connexions et entraîner l'oubli de l'information. Cette partie de la plasticité synaptique est importante car elle permet le bon fonctionnement de la mémoire en dehors de cas pathologiques.

Dans les souris *p50*<sup>-/-</sup> adultes, il y a une déficience dans la neurogénèse au niveau de l'hippocampe, ce qui entraîne des défauts dans la maturation tardive des neurones nouvellement formés (Denis-Donini S 2008). Ces neurones ne sont ainsi pas utilisables pour former de nouveaux réseaux associés à l'apprentissage et la mémoire : la plasticité synaptique est réduite par ce défaut de neurogénèse dû à une activation de la voie NF- $\kappa$ B affaiblie voire inexistante.

De par sa présence dans le corps cellulaire neuronal, la voie NF- $\kappa$ B a, comme présenté précédemment, un rôle dans la neurogénèse et la neuritogénèse (Crampton SJ 2013). Elle est ainsi impliquée dans le processus de neuroprotection (Figure 30) (Kaltschmidt B 2009). En effet, au niveau du cortex, de l'hippocampe et des neurones glutamatergiques, la voie NF- $\kappa$ B module la survie des nouveaux neurones et l'homéostasie (Kaltschmidt B 2015).

Plus précisément, NF- $\kappa$ B a un double rôle pro- et antiapoptotique en fonction de l'activateur impliqué, et cela peut permettre directement ou indirectement, une régulation de la neurogénèse. Par exemple, la voie NF- $\kappa$ B promeut la survie neuronale et la prolifération cellulaire en induisant la production de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou IAPs, grâce à son activité constitutive plus forte que celle retrouvée dans les cellules non excitables. Elle est aussi induite par le NGF (Nerve Growth Factor, voie des Neurotrophines) qui joue un rôle dans la survie et la différenciation neuronale (Wooten MW 1999). Au contraire, la voie NF- $\kappa$ B est aussi impliquée dans la survie des cellules gliales qui sont capables de produire des neurotoxines entraînant la mort neuronale (Mattson MP 2006). De manière notable, une dose

subtoxique de neurotoxines entraîne une activation à long terme de NF- $\kappa$ B qui a habituellement un rôle anti-apoptotique. On remarque donc que suivant le type de cellules où cette voie est activée, son impact est différent.

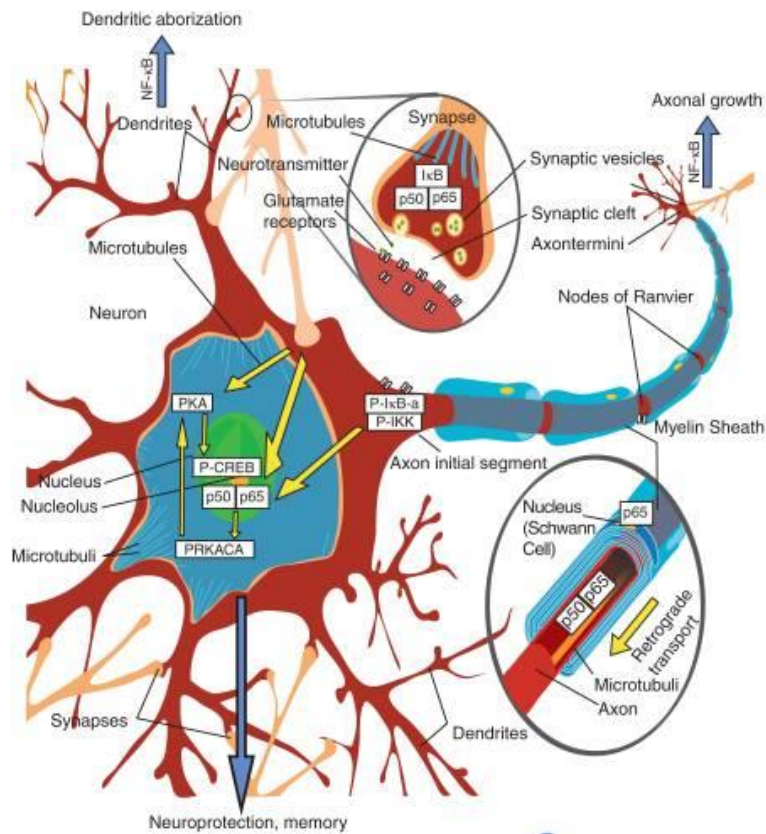


Figure 30. Le rôle de NF- $\kappa$ B dans les neurones. Ici, NF- $\kappa$ B est sous forme de l'hétérodimère p50/p65.

## 2. Rôle dans les cellules non-neuronales du cerveau

Il a été prouvé la nécessité de l'expression de gènes dépendant de NF- $\kappa$ B dans des cellules non-neuronales, qui supportent localement la plasticité synaptique. Par exemple, l'activation par différents régulateurs extracellulaires de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans les astrocytes, permet un contrôle de l'initiation de l'axogénèse, l'élongation, la guidance et le « branchement » des axones dans le système nerveux, permis par BDNF dans une période de temps réduite et proche de la naissance (Marini AM 2004). En effet, cette neurotrophine est induite par NF- $\kappa$ B en réponse à une activation du récepteur au glutamate. Elle active ensuite le récepteur tyrosine kinase (trkB) couplé aux voies de signalisation de la PI<sub>3</sub> kinase-Akt et de la MAP kinase, ce qui promeut la survie cellulaire et joue un rôle critique dans l'apprentissage et

la mémoire (Mattson MP 2004). Ce dernier point est confirmé par le rôle de BDNF dans la régulation de la taille et de la complexité de l'arbre dendritique durant le développement, ainsi que de la densité des épines dendritiques chez l'adulte (Imielski Y 2012).

De plus, l'inhibition de NF- $\kappa$ B spécifiquement dans les astrocytes, par la surexpression d'une forme dominante-négative d'I $\kappa$ B $\alpha$  (GFAP-I $\kappa$ B $\alpha$ -dn), diminue l'apprentissage chez les souris femelles (Bracchi-Ricard V 2008). Ce problème est accompagné par une réduction neurone-spécifique de l'expression de PSD95, protéine impliquée dans la plasticité synaptique [cf. III.C.1(a) Rôle dans la plasticité synaptique et dendritique p. 75], et mGluR5, récepteur métabotropique du Glutamate. Cela démontre donc une modulation positive des astrocytes sur l'expression de protéines synaptiques par les neurones. Il est aussi prouvé plus spécifiquement, que l'inhibition de la voie de signalisation canonique de NF- $\kappa$ B dans ce type cellulaire réduit significativement la taille et la complexité de l'arborisation axonique et dendritique (Gutierrez H 2005).

Au niveau de la microglie, NF- $\kappa$ B a un rôle de régulation homéostatique dans les processus d'apprentissage et de la mémoire (Kyrargyri V 2015). En effet, un KO total d'IKK2 dans les cellules myéloïdes (mIKK $\beta$ KO) de souris a montré une déplétion en IL-1 $\beta$  qui est uniquement associé à la microglie, et qui est un régulateur des processus d'apprentissage et de mémoire dépendants de l'hippocampe (Williamson LL 2011).

L'ensemble de ces résultats prouvent que la plasticité synaptique a besoin d'une régulation adaptative des gènes-cibles de NF- $\kappa$ B, non seulement par les neurones pré- et postsynaptiques, mais aussi par les cellules gliales (microglie et astrocytes).

### 3. Rôle dans la myélinisation

Dans le cadre de la myélinisation, NF- $\kappa$ B semble peu/pas intervenir. En effet, la délétion de la sous-unité RelA dans des cerveaux murins n'a aucun impact sur les oligodendrocytes et la formation de la gaine de myéline (Kretz A 2014). Il en est de même lorsque NF- $\kappa$ B est inactivé dans le compartiment neuroglial de cerveaux murins, par la surexpression d'un super répresseur I $\kappa$ B $\alpha$  (Zhang W 2005) ou la délétion de l'activateur IKK2 (Herrmann O 2005) : les souris se développent normalement et ne présentent aucune altération neuro-anatomique ou comportementale. Néanmoins, il a été observé chez les jeunes souris adultes  $p50^{-/-}$ , une démyélinisation spontanée (Lu ZY 2006). Par comparaison aux souris contrôle, cette altération semble accélérer la réduction axonale et la dégénération normalement observée avec l'âge. Ces effets ne sont pas liés à une activité NF- $\kappa$ B réduite. Au contraire, une déficience en p50 chez les souris améliore l'activité de cette voie (Tang T 2010), confirmant la fonction transcriptionnelle complexe de p50 [cf. III.B.1 La localisation cérébrale de NF- $\kappa$ B actif durant le développement p.69] et l'effet délétère d'une sur-activation de NF- $\kappa$ B dans le processus de myélinisation [cf. III.D.2 Dans la myélinisation p.86].

#### *D. Conséquences de l'activation perturbée de NF- $\kappa$ B dans le cerveau*

Dans cette section, nous examinerons succinctement comment la voie NF- $\kappa$ B peut influencer, souvent défavorablement, divers états pathologiques affectant le cerveau. Comme expliqué ci-dessus, le large éventail de voies de signalisation régulant l'activité de NF- $\kappa$ B en fait un « pivot » dans la production de cytokines, de facteurs de croissance et de médiateurs de l'inflammation (Mattson MP 2006). Cela s'applique également à l'environnement cérébral où un dérèglement n'est pas sans conséquence. Dans les processus pathologiques, cette voie peut augmenter l'apoptose neuronale associée à des lésions ischémiques du cerveau, des maladies neurodégénératives et des conditions inflammatoires.

## 1. Dans les processus pathologiques corticaux

Tout d'abord, il a été montré que la voie NF- $\kappa$ B peut être activée dans des pathologies telles que l'épilepsie et les blessures traumatiques cérébrales. Durant les crises épileptiques, il y a une augmentation rapide du taux de NF- $\kappa$ B activé dans l'hippocampe (Prasad AV 1994). En parallèle, cette voie est activée dans les cellules voisines et permet un effet neuroprotecteur qui va durer tout au long de l'inflammation engendrée par l'injure cérébrale subie (Mattson MP 2001). Néanmoins, cette activité peut rester élevée durant de longues périodes (des semaines ou même des mois) suivant la lésion et contribuer aux processus inflammatoires délétères associés.

Il a également été montré que l'inactivation d'*Ikk2* ou de *Nemo* dans le neurone et l'oligodendrocyte améliore l'état pathologique d'un modèle murin de sclérose en plaque (Van Loo G 2006). Cela est dû à une expression réduite de médiateurs de l'inflammation.

La voie NF- $\kappa$ B activée dans les cellules gliales (microglie et astrocytes) entraîne un processus d'inflammation, qui peut s'opposer aux rôles précédemment décrits de NF- $\kappa$ B dans le cerveau (Figure 31). En effet, NF- $\kappa$ B est sous forme latente au niveau de la glie et se retrouve activé en cas de lésions, telles qu'un dommage au niveau du tissu nerveux. Son activation microgliale module le processus d'inflammation, par l'infiltration des cellules immunes dans le cerveau, sous l'induction de chimiokines (Kaltschmidt B 2015). En parallèle, la signalisation NF- $\kappa$ B dans les astrocytes peut réguler cette infiltration au niveau des lésions cérébrales. De plus, l'activation microgliale de NF- $\kappa$ B pourrait être un contributeur crucial dans l'ischémie. Chez la souris, un processus neuroprotecteur se met en place (Duckworth EA 2006), contrairement à chez l'Homme où la neuroprotection semble être moins efficace (Röther J 2008). Après l'induction d'une ischémie pendant 1h (paradigme de MCAO, Middle Cerebral Artery Occlusion) chez des souris p50<sup>-/-</sup>, il est prouvé le rôle neuroprotecteur de NF- $\kappa$ B dans l'hippocampe et le striatum, par comparaison à des souris contrôle (Duckworth EA 2006).

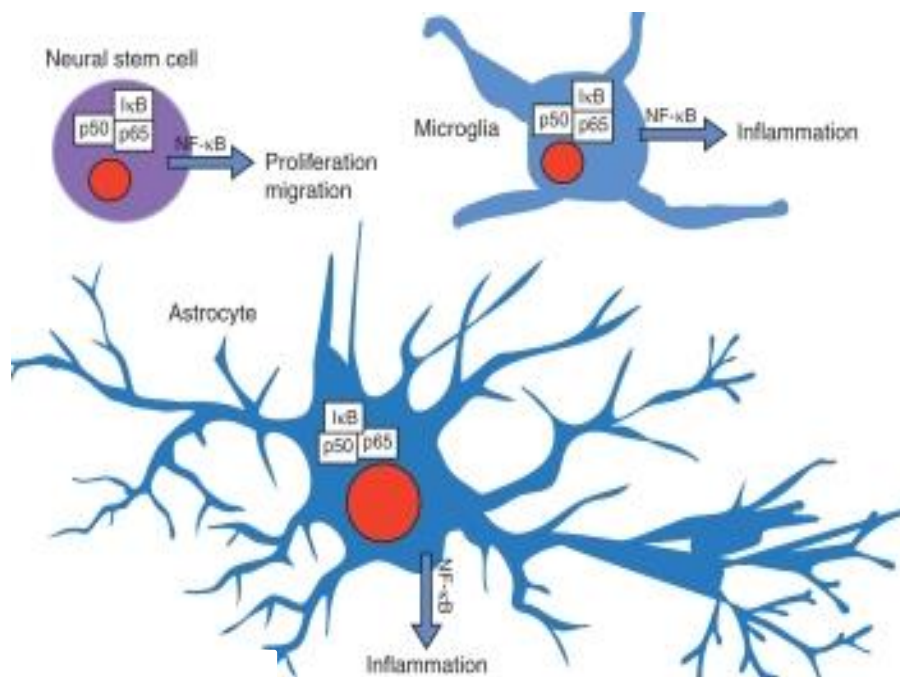


Figure 31. Rôle de NF-κB dans différentes cellules du cerveau.

La dérégulation de la voie de signalisation NF-κB par l'inflammation ou des facteurs environnementaux, interfère avec la neurogénèse dans le cerveau en développement, mais aussi adulte. Par exemple, une infection maternelle pendant la grossesse peut toucher par la libération d'activateurs proinflammatoires de NF-κB, le développement du cerveau fœtal (Van Steenwinckel J 2014) et donc plus tard entrainer, entre autres, des troubles de l'apprentissage (Boksa P 2010). De même, son activation cellulaire intrinsèque par un stress aigu dans les cellules souches neurales supprime la neurogénèse hippocampale chez les rats adultes (Koo JW 2010). Le stress dit « aigu d'immobilisation » peut aussi entrainer des défauts dans la neurogénèse, induits par l'activation de NF-κB par IL-1β (Koo JW 2010).

## 2. Dans la myélinisation

Dans le cas de démyélinisation accompagnée d'inflammation, NF- $\kappa$ B est activé dans les cellules progénitrices d'oligodendrocytes recrutées par des facteurs issus de la glie non activée. Cela entraîne leur différenciation en oligodendrocytes remyélinisants, afin de permettre la survie d'axones démyélinisés en les remyélinisant (Blank M 2014). Cela prouve que l'activation de NF- $\kappa$ B impliquant RelA et/ou IKK2 n'est pas nécessaire à la maturation des oligodendrocytes *in vitro* et *in vivo*, tout comme pour la myélinisation des axones dans le SNC (Raasch J 2011), mais est nécessaire au processus de remyélinisation.

Dans ce cas, l'activation par différents régulateurs extracellulaires de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans les astrocytes, a aussi un impact positif sur l'induction de la remyélinisation (Blank M 2014). Au contraire, dans de nombreuses maladies impliquant les oligodendrocytes, de la démyélinisation causée par l'activation de NF- $\kappa$ B peut être observée. Il n'a pas encore été déterminé si cet effet est direct ou dû aux cellules environnantes. Néanmoins, une protection contre la démyélinisation induite par des toxines, a été obtenue par l'ablation astrocytaire d'IKK2 (Raasch J 2011). Cela réduit l'induction de cytokines inflammatoires potentiellement toxiques pour les oligodendrocytes. En outre, l'inhibition astrocytaire de NF- $\kappa$ B diminue aussi l'expression par ces cellules de la disintégrine et métalloprotéase A (ADAM) 12, surtout présente dans les zones cérébrales affectées par de la perte d'oligodendrocytes (Baertling F 2010), et donc la démyélinisation (Figure 32). Or, ADAM12 clive l'IGFBP3 (Insulin-like Growth Factor-2 Binding Protein-3) (Shi Z 2000), qui semble être fonctionnellement relié au développement astrocytaire, au développement des oligodendrocytes et à la (re)myélinisation (Lovett-Racke AE 1998). Cela prouve que les astrocytes peuvent directement moduler la myélinisation par la libération de facteurs sécrétés (Moore CS 2011).



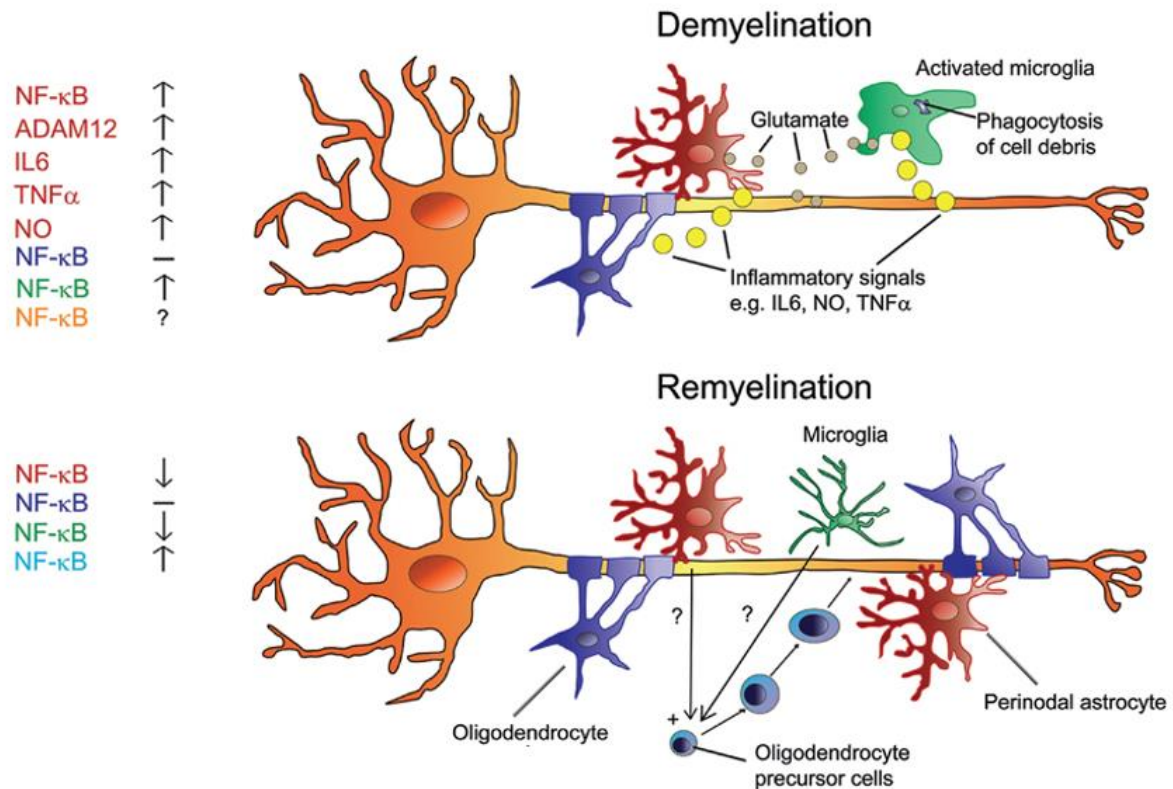


Figure 32. Les signaux de régulation de la dé- et remyélinisation dans le SNC. Lors de la démyélinisation, NF-κB est fortement activé au niveau des astrocytes et de la microglie activée. Au contraire, NF-κB est fortement activé au niveau des OPCs et très réduit au niveau des astrocytes et de la microglie, lors de la remyélinisation (Blank M 2014).

De plus, les oligodendrocytes perdus lors de la démyélinisation peuvent être remplacés par des OPCs (Oligodendrocytes Precursor Cells) (Tripathi R 2007). Une expérience *in vitro* a prouvé que la microglie non activée pouvait, en association avec NF-κB, augmenter le nombre d'oligodendrocytes survivants, par l'inhibition de l'apoptose des OPCs et la stimulation de leur maturation en oligodendrocytes (Nicholas RS 2001). En effet, ces cellules peuvent migrer jusqu'au site de la lésion et se différencier en oligodendrocytes matures et myélinisants, si l'environnement le permet (Franklin RJ 2008). Au contraire, la dégénérescence de la myéline entraîne la libération de molécules inhibitrices comme NogoA, MAG (Myelin-Associated Glycoprotein) et OMgp (Oligodendrocyte-Myelin glycoprotein) qui bloquent la remyélinisation. Elle active aussi dans les macrophages, la voie FAK/PI<sub>3</sub>K/Akt/NF-κB et augmente l'expression de médiateurs inflammatoires (Sun X 2010). Ces facteurs inhibent la régénération des axones et active des systèmes complémentaires pour détruire la myéline intacte (Chen MS 2000). De plus, la présence près des oligodendrocytes touchés, d'inhibiteurs de différenciation, tels que les cytokines et les chimiokines dont plusieurs sont régulés par NF-κB,

peut entraîner une mauvaise remyélinisation (Kremer D 2011). Finalement, NF- $\kappa$ B a un rôle dans le processus de remyélinisation via le TNF (Figure 32), qui est aussi requis pour la prolifération des OPCs (Arnett HA 2001).

### 3. Dans le vieillissement

La voie NF- $\kappa$ B a un rôle dual dans la maladie d'Alzheimer. En effet, cette voie permet l'expression de la protéine APP qui, après clivage, donne le peptide pathologique amyloïde  $\beta$  se déposant en plaques dans le cerveau des patients Alzheimer. Or, NF- $\kappa$ B tient aussi un rôle neuroprotecteur contre la toxicité du peptide A $\beta$ , en initiant la transcription de gènes-cibles neuroprotecteurs (Liu H 2015) (Kaltschmidt B 1997).

Le processus de plasticité synaptique s'altère avec le vieillissement, ce qui peut expliquer les difficultés croissantes à retenir des informations. Dans certaines formes familiales de la maladie d'Alzheimer, des mutations génétiques (au niveau des gènes codant les protéines présentées en Figure 28) sont associées à des défauts de plasticité des synapses, expliquant les troubles majeurs de mémoire dans cette maladie. Or, l'activation constitutive de NF- $\kappa$ B est une marque du vieillissement menant à son hyperactivation et l'expression de gènes proinflammatoires dans les neurones (Jurk D 2014). Cela pourrait affecter directement la transcription de gènes synaptiques dépendants de NF- $\kappa$ B et donc contribuer aux problèmes observés dans la plasticité synaptique durant le vieillissement.



## Résultats & Discussion

### I. Système analysé

Notre travail vise à élucider la cause des anomalies cérébrales souvent sévères observées chez les patientes IP [cf. II.A.1(b) Signes cliniques p. 41). Pour cela, nous utilisons un modèle murin de la pathologie qui présente une délétion du gène *Nemo*, mimant la situation observée chez 70-75% des patientes (Schmidt-Supprian M 2000). A la naissance, les portées obtenues sont viables et d'un nombre habituel. Les souris ne présentent aucune différence entre elles à la naissance (Figure 33). Les souris femelles *Nemo*<sup>+/-</sup> (IP) développent 5 jours après la naissance **une dermatose cutanée très similaire à celle des patientes IP** (Figure 33) et subissent également le phénomène d'inactivation biaisée du chromosome X, caractéristique de la pathologie.



Figure 33. Portée issue d'un croisement  $X^{cre}/Y \times X^{Nemofl}/X^{Nemofl}$ . Les animaux sont montrés à l'âge P4 (Panneau du haut) et P7 (Panneau du bas).

Les souris IP présentent un phénotype cutané variable, avec un taux de mortalité élevé à P10.

Nous avons donc analysé leur cerveau à P7, afin d'éviter toute perte conséquente d'animaux.

**Tableau 1. Hétérogénéité du phénotype cutané chez les souris IP à P7**

Phénotype	Faible	Moye n	Fort	Total
Nombre	61	111	56	228
%	26,8	48,7	24,6	100,0

Pour cela, les animaux ont été décapités et leurs têtes disséquées (élimination de la peau et des yeux) puis fixées. Elles ont ensuite été analysées en utilisant des protocoles d'IRM mis au point pour de jeunes animaux [cf. Matériels & Méthodes p. 104].

## II. Analyse des cerveaux par IRM

### A. Etude sur souris *NemoIP*

Trois classes de cerveaux *NemoIP* ont été observées après examen d'environ 200 d'entre eux, pour une analyse morphologique :

La première (environ 50% des échantillons analysés) ne présentait pas de défauts cérébraux détectables en IRM, mais uniquement un volume cérébral plus réduit que celui des souris contrôle. Nous avons montré que cette réduction générale du volume cérébral était corrélée avec le retard de développement général de l'animal, qui touche variablement toutes les femelles IP (Figure 34), et qu'il n'implique pas de domaine cérébral particulier (Figure 35).

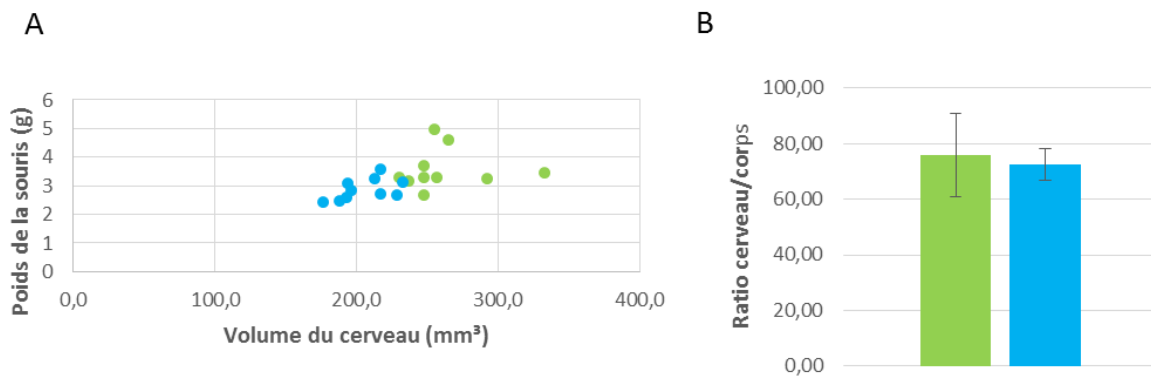


Figure 34. Volume réduit des cerveaux IP corrélé avec le retard de développement des souris. A. Analyse du volume du cerveau en fonction du poids corporel de dix souris sauvages (vert) et de dix souris IP (bleu). B. Ratio.

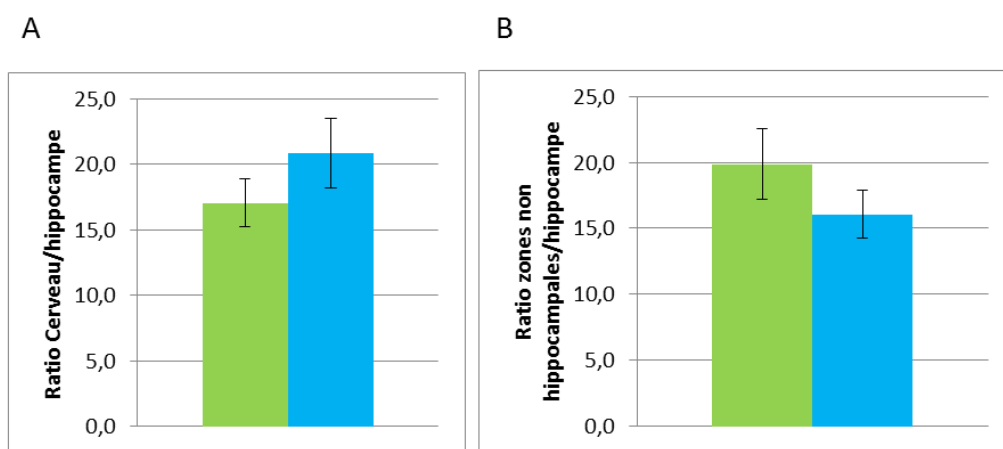


Figure 35. Calcul des ratios de développement des souris. A. Analyse du volume du cerveau en fonction du volume de l'hippocampe de dix souris sauvages (vert) et de dix souris IP (bleu). B. Calcul du ratio du volume du cerveau hors hippocampe, en fonction du volume de l'hippocampe pour les vingt même souris qu'en A.

La seconde classe de cerveaux (environ 40% des échantillons) présentait des anomalies cérébrales limitées, non observées dans les cerveaux contrôle. Il s'agissait souvent de petits spots hyper-intenses plus ou moins diffus souvent localisés au niveau antero- ou medio-cortical (Figure 36).

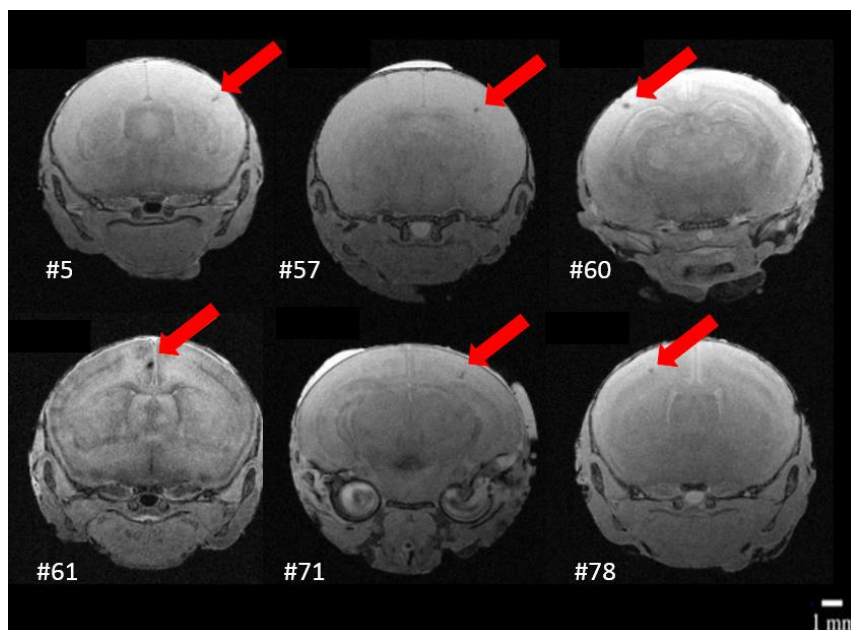


Figure 36. Anomalies cérébrales limitées affectant les souris IP. Le protocole IRM type « T1 FLASH » a été utilisé. Six exemples sont indiqués sur un total de 122 cas.

Dans un nombre réduit de cas, un protocole IRM d'analyse de diffusion de type « T2 », détectant la diffusion des fluides, a également été utilisé pour confirmer et identifier la nature des lésions. Nous avons pu montrer que le défaut détecté avec le protocole T1 était également détecté avec le protocole T2, suggérant comme dans le cas représenté sur la Figure 37, une fuite vasculaire. En effet, l'hyposignal entouré par un hypersignal IRM, observé en protocole T1 correspond au résultat attendu pour ce type d'anomalie.

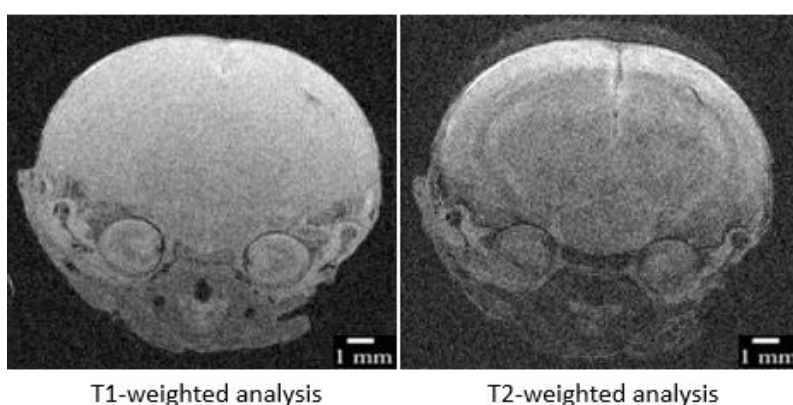


Figure 37. Analyse comparée d'IP223 avec les protocoles IRM T1 et T2.

La troisième classe de cerveaux (environ 10% des échantillons) se caractérisait par des lésions de plus grande taille. Celles-ci affectaient des régions variables (l'isocortex, la région

supérieure de l'hippocampe, le cortex entorhinal) et ressemblaient à des zones hémorragiques diffuses et des cavités. De l'atrophie du corps calleux était aussi observée, parfois. Quelques exemples représentatifs sont montrés dans la Figure 38. La Figure 40 permet de voir l'étendue de certaines de ces lésions en analyse antéro-postérieure. L'ensemble de cette analyse a donc démontré, pour la première fois, que **les souris *NemoIP* sont également un modèle d'étude des anomalies du système nerveux central observées chez les patientes IP.**

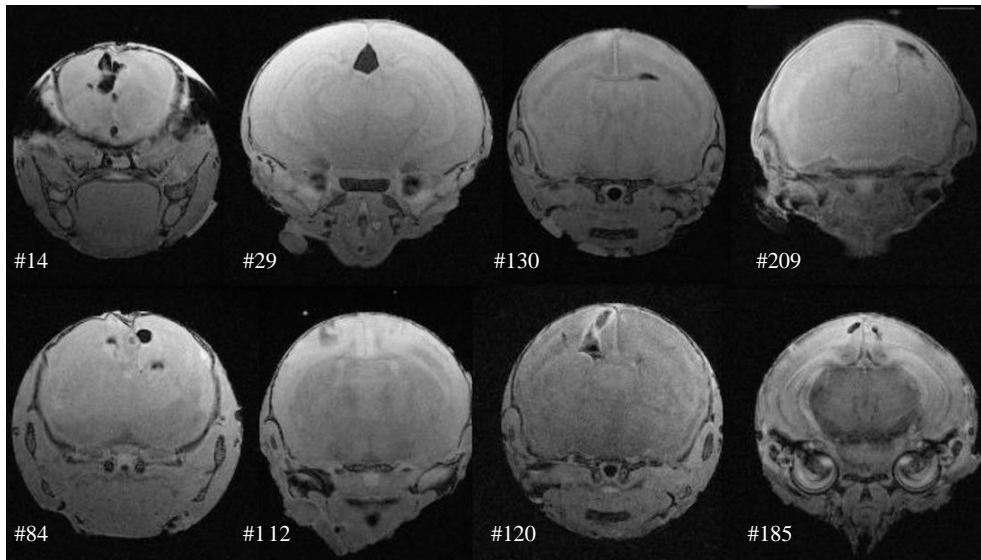


Figure 38. Fortes anomalies cérébrales affectant les souris IP. Un protocole IRM type « T1 FLASH » a été utilisé.



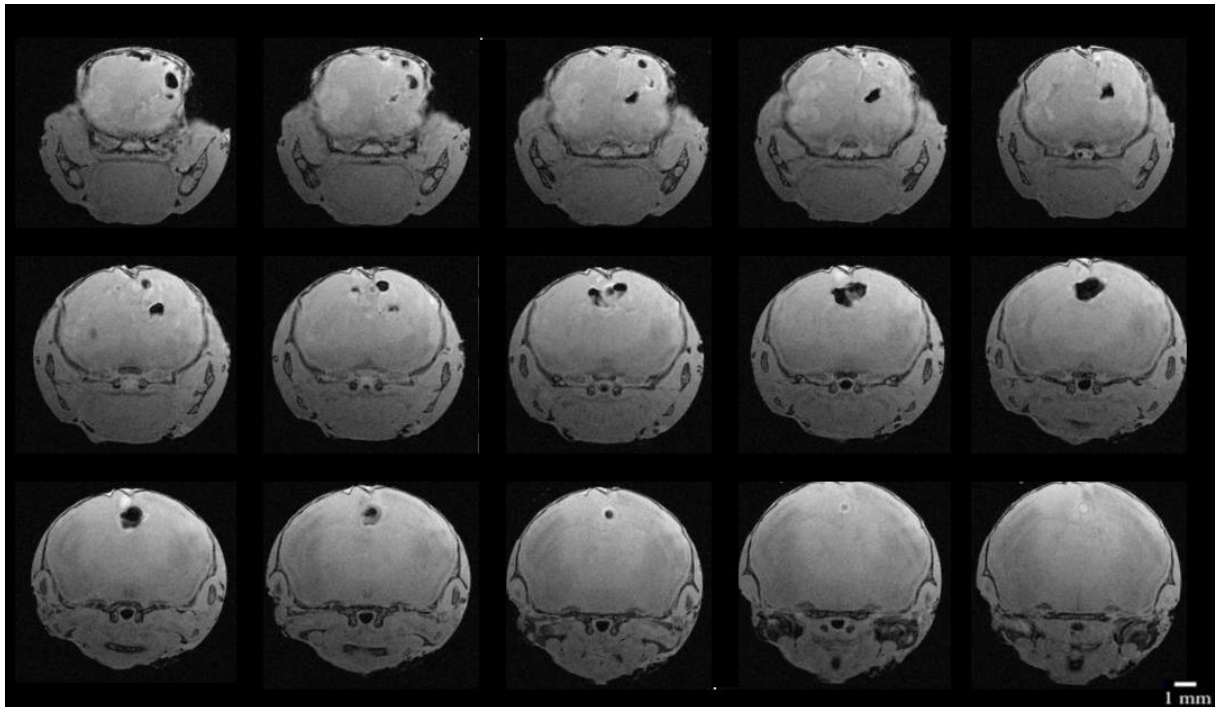


Figure 40. Etendue des anomalies cérébrales affectant les souris IP. Un protocole IRM type « T1 FLASH » a été utilisé.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'apparition des lésions cérébrales était liée au phénotype périphérique inflammatoire se développant après la naissance ou précédait celui-ci. Tout d'abord nous n'avons pas constaté de corrélation évidente entre l'apparition des lésions cérébrales et la sévérité des atteintes cutanées (Non montré). Plus remarquablement, nous avons montré que les lésions cérébrales des souris IP étaient détectables **avant leur naissance**, à E18 (Figure 39), ce qui indique un découplage avec le processus inflammatoire périphérique.

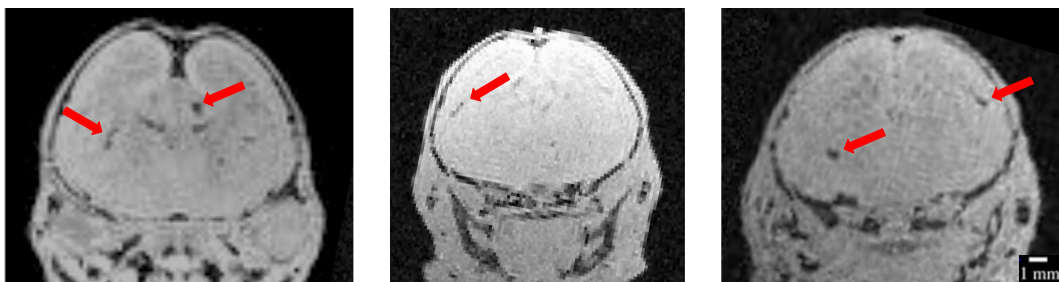


Figure 39. Anomalies cérébrales affectant les souris IP à E18. Un protocole IRM type « T1 FLASH » a été utilisé.

## B. Etude sur souris Nestin-Cre/Nemo

Nous avons examiné si des souris présentant une invalidation spécifique de *Nemo* dans les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes présentaient des lésions cérébrales comme les souris *NemoIP*.

Comme expliqué ci-dessus, les souris femelles *NemoIP* miment la situation IP chez l'humain, en présentant une **invalidation mosaïque de *Nemo* dans tout l'organisme** (Figure 41). Notre système de départ étant un système murin d'invalidation conditionnelle de *NEMO*, basé sur l'introduction de sites loxP de part et d'autre du locus *Nemo* (lignée *NemoFL*) [cf. Matériels & Méthodes p. 104], il est également possible d'induire **de façon homogène**, une invalidation de ce même locus dans un **compartiment cellulaire spécifique**. Pour cela, les souris *NemoFL* ont été croisées avec des souris exprimant la recombinaise « Cre » sous contrôle d'un promoteur présentant une expression tissulaire restreinte. C'est le cas du promoteur contrôlant l'expression de la Nestine, qui est exclusivement actif dans **les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes** (Tronche F 1999).

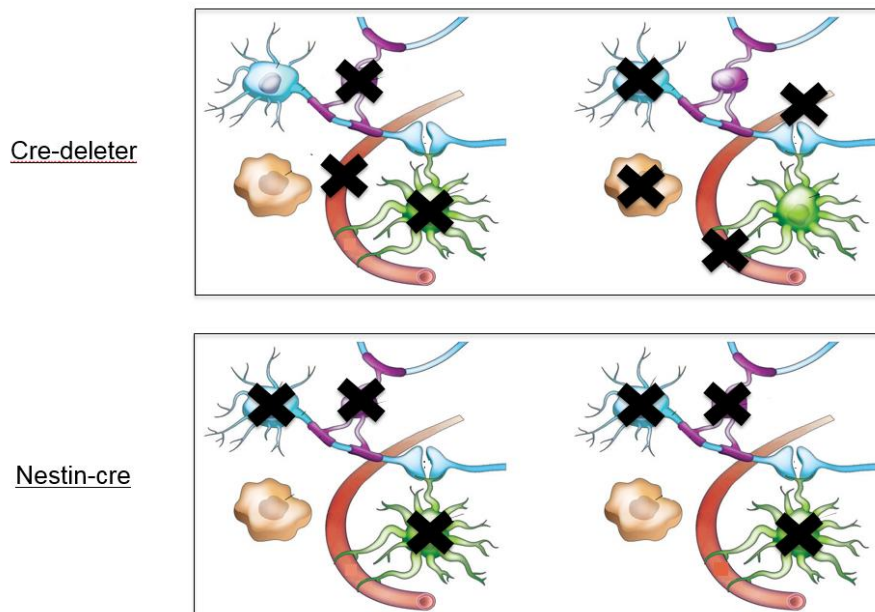


Figure 41. Stratégies d'invalidation de *Nemo*. Le croisement des souris *NemoFL* avec des souris Cre-deleter produit une invalidation mosaïque de *Nemo* dans tout l'organisme des souris femelles, y compris dans le cerveau (mimant la situation observée chez les patientes IP), alors que leur croisement avec des souris Nestin-cre induit l'invalidation de *Nemo* exclusivement dans les neurones, les astrocytes ou les oligodendrocytes sous forme intégrale (mâles, présenté ici) ou mosaïque (femelles, non présenté). Les types cellulaires représentés sont décrits dans la Figure 24.

L'analyse de dix souris mâles Nestin-cre/*Nemo*KO présentant une invalidation intégrale de *Nemo* dans ces trois types cellulaires, à cause de son expression hémizygote, n'a pas révélé de défauts cérébraux après examen par IRM (Figure 42).

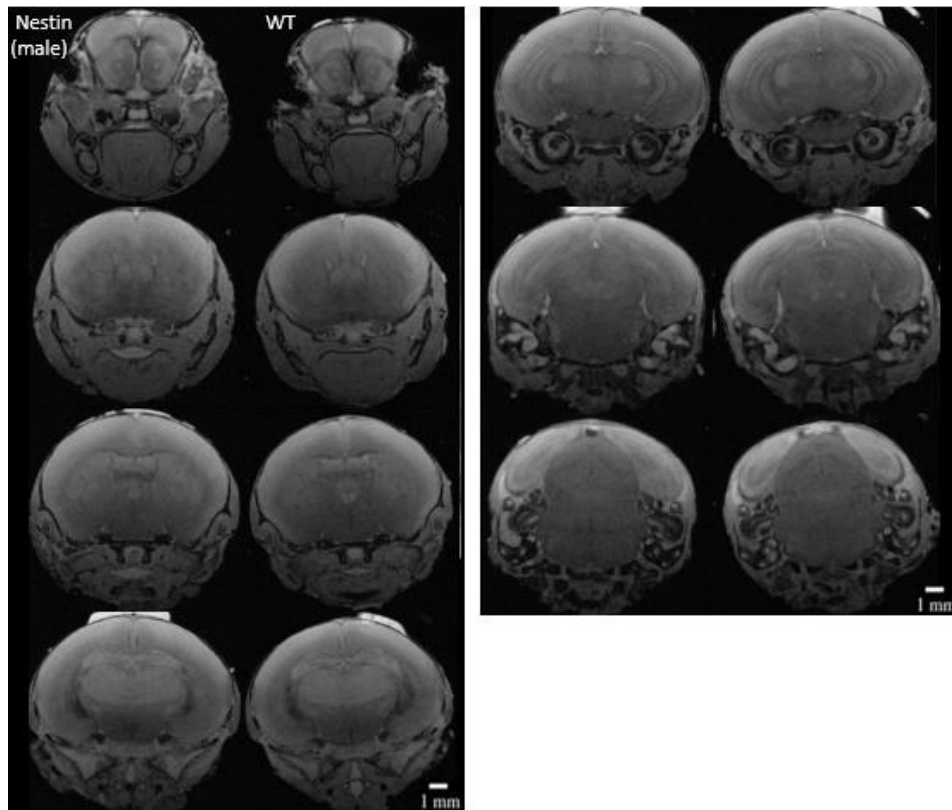


Figure 42. Absence de lésions cérébrales chez les souris mâles Nestin-Nemo.

Dans le but d'exclure un effet du mosaïcisme dans ce même type d'invalidation conditionnelle, dix femelles Nestin-cre/ $X^{NemoKO}/X^{NemoWT}$  ont également été analysées. Aucune lésion n'a été détectée (Figure 43).

Ces résultats suggèrent que le type cellulaire initiateur des lésions cérébrales des souris IP n'est **ni le neurone, ni l'astrocyte, ni l'oligodendrocyte**. Nous avons donc examiné l'hypothèse que des défauts vasculaires pourraient être à l'origine de ces lésions, hypothèse déjà avancée chez l'Homme [cf. II.A.1(b) Signes cliniques, **Manifestations cérébrales** p. 38].

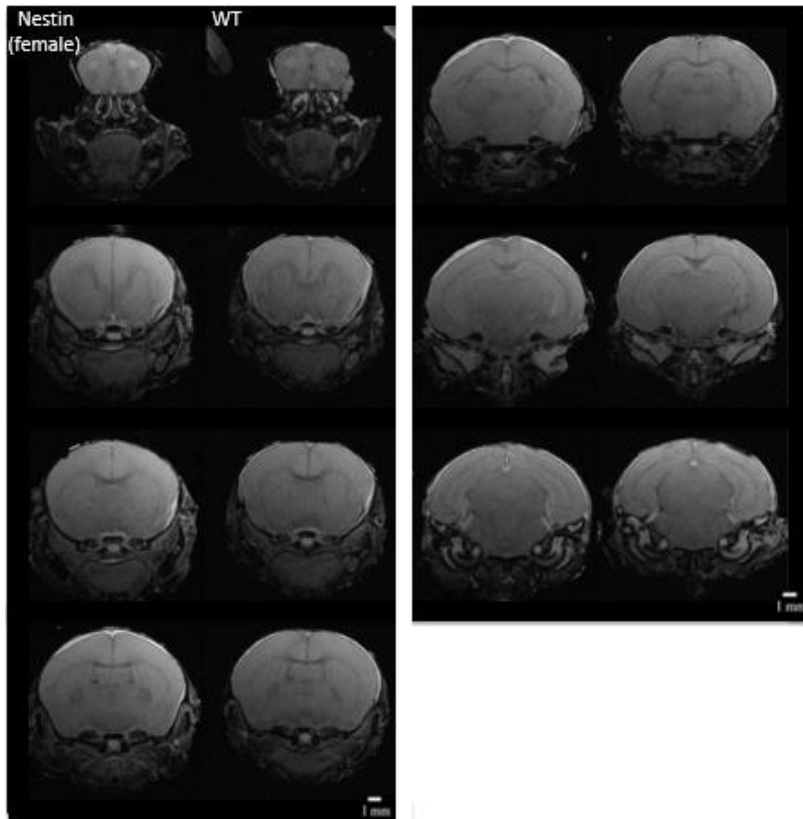


Figure 43. Absence de lésions cérébrales chez les souris femelles Nestin-Nemo.

### III. Analyse des cerveaux IP par iDISCO

Dans le but de tester l'hypothèse vasculaire, nous avons analysé avec la technique « iDISCO » le système vasculaire cérébral des souris femelles *NemoIP* à P7. Cette technique [cf. Matériels & Méthodes p. 104] consiste tout d'abord à perméabiliser un cerveau entier et à l'incuber avec des anticorps couplés à un fluorochrome. Dans un second temps, le tissu est rendu transparent en utilisant un cocktail d'éthers et de solvants. Finalement, l'échantillon est analysé en utilisant un microscope à feuille de lumière. Les images acquises sont traitées avec le logiciel Imaris (plateforme M4D, IBS Grenoble) pour reconstituer l'intégralité de la structure en 3D (Figure 45).

Utilisant cette approche, différentes anomalies ont été détectées chez les cerveaux précédemment analysés ou non par IRM, telles que des atrophies au niveau de microvaisseaux (« string vessels »), des foci de néovascularisation et des pétéchies (Figures 45 & 46).

Nous pensons donc que les anomalies du SNC des patientes IP auraient pour origine des **défauts vasculaires**.

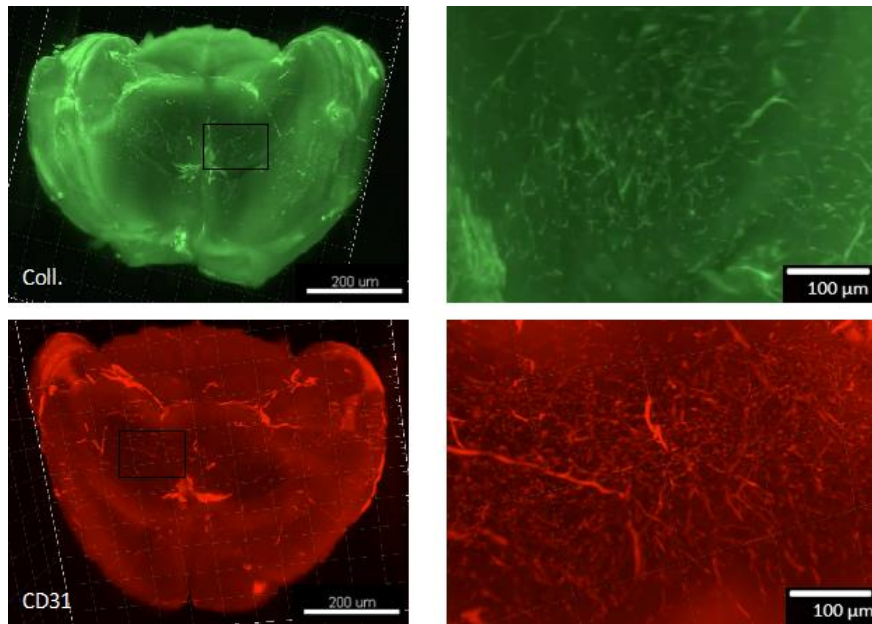


Figure 44. Etude comparative d'un cerveau NemoIP par l'utilisation de différents protocoles. L'échantillon est étudié par IRM avec un protocole T1, en coupe coronale (#10 et 11, 10 $\mu$ m), axiale et sagittale. Les flèches noires indiquent les anomalies (panneaux de gauche). Une analyse iDISCO 3D (panneau central) est ensuite réalisée avec des anticorps anti-collagenIV (vert) et CD31 (rouge) et les flèches grises montrent les anomalies vasculaires. Ces mêmes anomalies sont détectables sur les sections sériées (100 $\mu$ m) produites par analyse au microscope à feuille de lumière, avant reconstitution de l'image 3D.

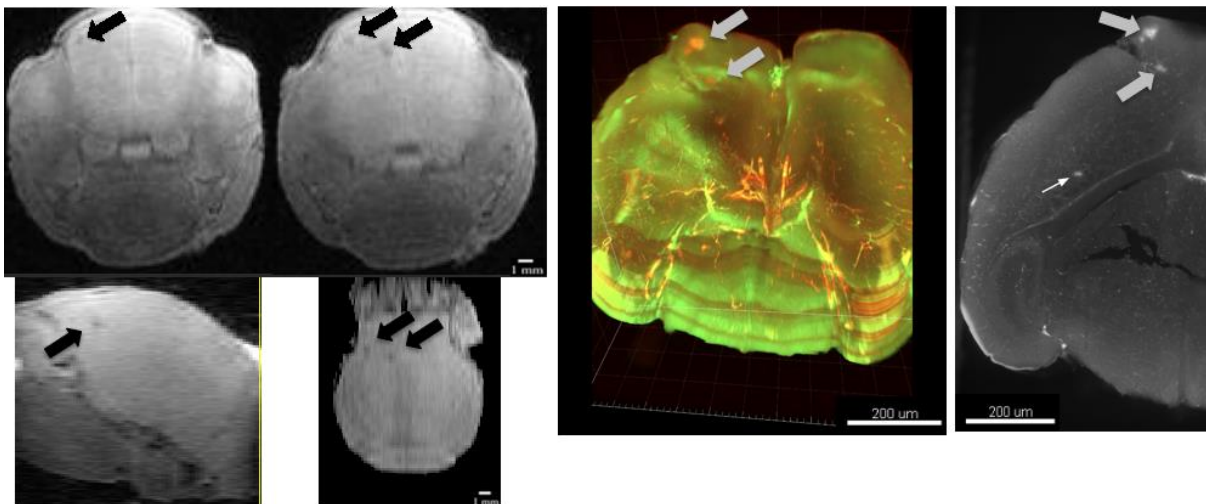


Figure 45. Analyse iDISCO 3D des microvaisseaux d'un cerveau de souris P7 avec les anticorps anti-collagen IV et anti-CD31. Les zones sélectionnées sur les images de gauche, sont montrées sous un plus grand zoom à droite.

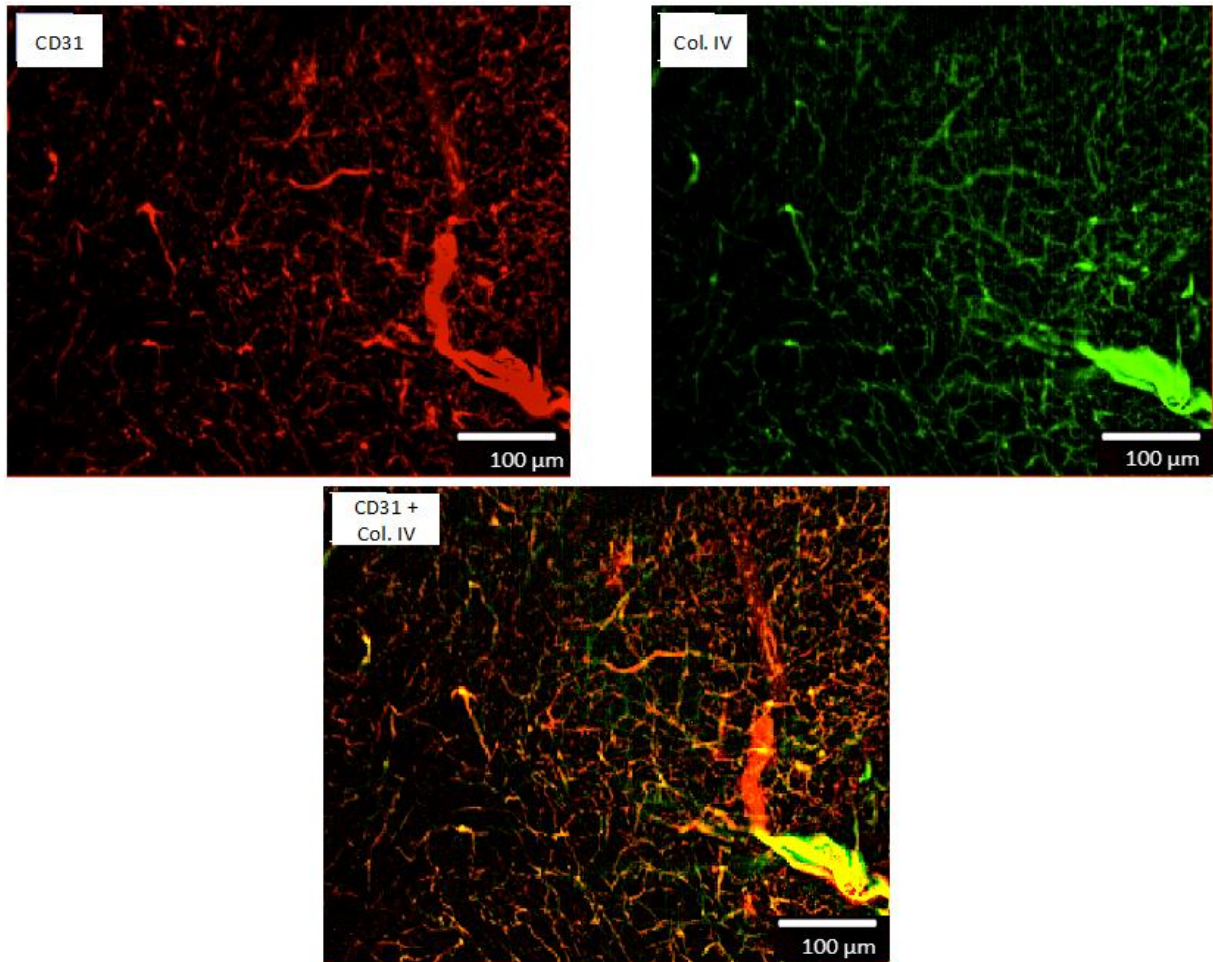


Figure 46. Zone montrant une large proportion de "string vessels" dans un cerveau murin *NemoIP* à P7.

L'ensemble de ce travail fait l'objet du manuscrit joint (« **Vascular abnormalities in the brain of mice modeling incontinentia pigmenti**», Annexe 7).

Durant la réalisation de ce travail, l'équipe du Prof. M. Schwaninger a publié un article supportant l'hypothèse vasculaire pour expliquer les anomalies cérébrales des patientes IP (Ridder DA 2015). Alors que notre approche peut être qualifiée de « Top-Down », car elle a commencé par une analyse de l'effet global de l'inactivation de *Nemo* en utilisant le système cre-deleter (situation équivalente à celle des patientes IP) pour ensuite invalider *Nemo* dans des types cellulaires spécifiques (ici les neurones, les astrocytes et le oligodendrocytes), Schwaninger et coll. ont utilisé une approche « Bottom-up ». En effet, ils ont dans un premier temps, invalidé spécifiquement *Nemo* dans le système vasculaire cérébral

(*Nemobrainvessels(bv)KO*), en utilisant un élégant système ne ciblant que les vaisseaux du cerveau, de façon inductible (Ridder DA 2015).

Analysant les souris *NemobvKO*, Ridder *et al.* ont détecté de la mortalité de cellules endothéliales, des anomalies des microvaisseaux (« string vessels ») causant de l'hypoperfusion cérébrale et une disruption de la barrière hémato-encéphalique. De manière intéressante, ces souris présentent également des signes d'épilepsie. Ils ont donc également analysé des souris femelles *NemoIP*. Le seul défaut mentionné dans ce cas, est la fréquence plus élevée de « string vessels », analysée à partir d'un nombre d'échantillons très réduit (n=6). Contrairement à notre étude, aucune analyse en IRM n'a été réalisée. De plus, une des caractéristiques majeures de la pathologie IP, récapitulée chez les souris IP, est leur état mosaïque qui a une influence cruciale sur le développement des anomalies (voir notre spectre étendu et variable de lésions détectées par IRM). Ce fait n'est pas du tout considéré dans l'étude de Ridder *et al.* Nous pensons donc que des défauts vasculaires sont vraisemblablement la cause primaire des défauts cérébraux affectant les patientes IP, Néanmoins, ils doivent être considérés dans un environnement plus global, potentiellement muté lui aussi. De plus, la majeure partie des expériences de Ridder *et al.* a été réalisée dans un système élégant, grâce au ciblage limité et inductible. Ce système est ainsi aisément contrôlé, mais est mis en œuvre sur des souris adultes, donc dans une situation très différente de la situation des patientes IP. De nombreuses questions restent donc non résolues concernant les défauts cérébraux des patientes IP. Nous en aborderons quelques-unes ici :

La première est celle du **déclenchement des problèmes cérébraux** peu après la naissance, période pendant laquelle la dermatose débute. Nos résultats en IRM suggèrent que des lésions pourraient déjà exister avant la naissance [cf. II.A Etude sur souris *NemoIP* p. 91]. Par contre, Schwaninger et coll. ont récemment suggéré (Körbelin J 2016) que l'augmentation du nombre de « string vessels » aurait lieu entre P4 et P10, période pendant laquelle des réarrangements des microvaisseaux cérébraux ont lieu, notamment en termes de composition moléculaire vaisseau/matrice. Il sera nécessaire d'aller plus avant dans l'élucidation de cette question. Nous projetons d'analyser le développement du système vasculaire cérébral chez les souris mâles *Nemo KO* (Voir ci-dessous), système génétiquement plus simple que celui des femelles.

La seconde concerne **les bases physiopathologiques de l'épilepsie IP**. Ce dysfonctionnement cérébral est une manifestation récurrente de la pathologie et donc un élément central à traiter. L'épileptogénèse est un processus dynamique et commun qui peut être d'origine génétique ou se mettre en place après des événements tel qu'un traumatisme crânien, de l'ischémie focale ou une infection (Friedman A 2012). Progressivement, cela altère l'excitabilité neuronale, établit des interconnexions critiques et peut entraine des changements structurels cérébraux. Ces changements peuvent se réaliser sous la forme de neurodégénération, de lésion(s) structurale(s) dans le cerveau et de dommages de la barrière hémato-encéphalique, avec le recrutement de cellules inflammatoires dans le tissu cérébral (Pitkänen A 2011). Ridder *et al.* ont montré que leurs souris *Nemobvko* présentent des signes d'épilepsie, ce qui conforte l'idée que l'absence de NEMO dans les cellules endothéliales du cerveau serait suffisante pour déclencher les dérèglements neuronaux. Il reste néanmoins à confirmer cette observation dans un système plus proche de la pathologie, c'est-à-dire, les femelles *NemoIP*. Cela représente un vrai challenge considérant l'hétérogénéité du système.

Finalement, il reste à étudier si, et comment, une **composante inflammatoire** influence le développement des lésions cérébrales IP. Si un processus inflammatoire est impliqué, de nombreuses stratégies pourraient être envisagées pour l'atténuer, car ce domaine est intensément étudié. Une participation du TNF- $\alpha$ , acteur majeur de nombreux processus inflammatoires, est suggérée par Ridder et al. Notre étude par iDISCO des cerveaux IP devrait permettre d'analyser des types cellulaires (microglie activée/astrocytes réactifs) et des médiateurs spécifiques de l'inflammation.

Quelles que soient les réponses apportées à ces questions, les progrès réalisés concernant la définition des anomalies cérébrales chez les modèles murins d'analyse d'IP devrait clairement générer des pistes thérapeutiques.





## *Matériels & Méthodes*

### **I. Lignées murines**

#### *A. La lignée Cre-deleter*

La souris Cre-deleter a été développée par Schwenk *et al.* (Schwenk F 1995). Le transgène a été créé par injection dans le noyau d'œufs fertilisés d'un fragment d'ADN contenant le gène Cre sous le contrôle transcriptionnel du promoteur minimal du virus humain Cytomégalovirus (CMV). Le ciblage a été produit dans des cellules souches embryonnaires C57BL/6 avec un site d'intégration sur le chromosome X. La colonie a été maintenue dans notre animalerie par reproduction hétérozygote avec des souris de type sauvage C57BL/6 pour générer des mâles Cre-deleter ( $X^{cre}/Y$ ).

#### *B. La lignée Nemofl*

La souris *Nemofl*, présentant un gène *Nemo* « floxé » avec des sites LoxP, a été développée par Schmidt-Supprian *et al.* (Schmidt-Supprian M 2000). Elle permet l'invalidation de *Nemo* de façon conditionnelle. La colonie a été maintenue dans notre animalerie par reproduction homozygote pour générer des femelles *Nemofl* ( $XNemofl/XNemofl$ ), de fond génétique C57BL/6.

#### *C. La lignée NemoIP*

Les souris *NemoIP* mimant la pathologie IP ont été obtenues par croisement de mâles Cre-deleter  $X^{cre}/Y$  et de femelles homozygotes *Nemofl*. Deux sortes de souris sont produites ainsi : des mâles  $X^{Nemofl}/Y$  (équivalent à des animaux sauvages) et des femelles  $X^{creNemowl}/X^{NemoKO}$ . En effet, le système Cre-LoxP agit en trans et crée donc un Knock-Out (KO) hétérozygote, générant des femelles  $X^{creNemowl}/X^{NemoKO}$  dénommées ici « *NemoIP* ». Par le processus d'inactivation du chromosome X, ces souris peuvent donc exprimer dans chaque cellule, soit le chromosome X sauvage, soit le mutant et sont donc mosaïques dans tous les types de cellules), y compris celles du cerveau du cerveau (Van Loo G 2006).

Ces souris ont été croisées avec des souris mâles sauvages X/Y pour générer des embryons mâles  $X^{NemoKO}/Y$ , dénommés ici « Mâles *NemoKO* ». Ces souris présentent une invalidation intégrale de *Nemo* dans tout l'organisme.

#### D. La lignée Nestin-Cre/Nemo

Cette lignée a été obtenue par croisement de souris Nestin-Cre (Raasch J 2011) avec les souris *Nemofl*. Cela induit un KO de *Nemo* chez trois types de cellules du cerveau : les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (Figure 41). Les souris de cette lignée, dénommées « Nestin-cre-Nemo » sont viables et se reproduisent normalement.

En croisant des souris mâles Nestin-Cre avec des femelles  $X^{Nemofl}/X^{Nemofl}$ , deux types d'animaux peuvent être générés : d'une part, des animaux mâles Nestin-Cre/ $X^{Nemofl}/Y$  invalidés intégralement de manière hémizygotique, et d'autre part, des femelles invalidées sur un seul chromosome X (Nestin-Cre/ $X^{Nemofl}/X^{Nemowl}$ ) et qui sont donc mosaïques.

## II. Analyse par Imagerie à Résonance Magnétique

### A. Préparation des échantillons à P7

Les souris qui présentent un phénotype cutané indiquant l'invalidation de *Nemo* ont été euthanasiées par décapitation, après avoir été filmées et pesées. Les têtes ont été débarrassées des yeux et de la peau les recouvrant, puis elles ont été fixées par immersion dans du PFA 4%/PBS, pendant deux jours à 4°C. Un chélate de Gadolinium clinique, dit « GADO » (Dotarem®, Laboratoires Guerbet), a été ajouté à 12,5 µmol/ml (c'est-à-dire au 1/40<sup>ème</sup>) pour améliorer les contrastes des structures anatomiques lors de l'analyse par IRM. Les têtes ont ensuite été placées dans une seringue (Becton Dickinson #309050) remplie d'huile LC55 (Fomblin #0206SI), huile qui ne donne pas de signal IRM en proton et qui présente une susceptibilité magnétique proche du tissu cérébral.

Des échantillons issus des mêmes portées de souris mais ne présentant pas de phénotype cutané ont également été préparés, afin de fournir des contrôles de nos expériences. Leur statut génétique (ainsi que celui des échantillons IP) a été confirmé par PCR en utilisant les deux amorces #40 (5'-TCACATCACATCGTTATCCTT-3') et #61 (5'-ATGAACAAGCACCCCTGGAAG-3') (B. W. Schmidt-Supprian M 2000) (Figure 47).

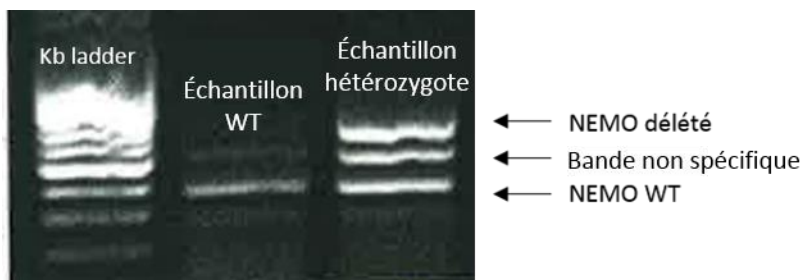


Figure 47. Génotypage NemoIP. La bande correspondant à NEMO WT fait 301 pb, et celle de NEMO délété fait 644pb.

### B. Préparation des échantillons à E18

Les souris gestantes ont été euthanasiées au CO<sub>2</sub>, au 18<sup>ème</sup> jour après observation d'un plug vaginal. Leur abdomen a été disséqué pour récupérer les embryons qui ont été placés en PBS à 4°C pour éviter de potentielles actions enzymatiques *post-mortem*. La fixation a été réalisée par immersion de l'embryon entier en PFA 4%/PBS à 4°C pendant 3h. Les embryons ont ensuite été conservés à 4°C dans un Falcon 15 ml de PBS, jusqu'à utilisation. Leur génotypage a été réalisé comme décrit ci-dessus pour confirmer la délétion de *Nemo*. Pour confirmation de leur statut sexuel (car impossibilité d'observer un phénotype cutané), nous avons utilisé deux amorces reconnaissant la séquence du gène SRY (Sex-determining Region of Y chromosome): # 5'SRY (5'-CCACTCCTCTGTGACACTTTAGCCCTCCGA-3') et #3'SRY (5'-TTGTCTAGAGAGCATCGAGGGCCATGTCAA-3') (Figure 48).

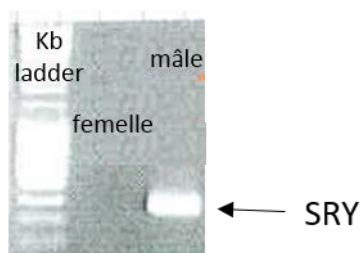


Figure 48. Génotypage SRY. La bande SRY correspond à un produit PCR de 273pb.

### C. Protocoles d'IRM

Les cerveaux ont été étudiés avec un scanner de 9.4 Tesla (console Avance III, Bruker, Ettlingen, Germany), système horizontal, avec une fréquence de 400 MHz, sur la plateforme IRMaGe (Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), Grenoble). Le diamètre interne de l'aimant est de 200 mm et celui du fourreau de gradient est de 120 mm, avec une intensité maximale de 600 mT/m.

Différentes conditions d'acquisition par IRM décrites en annexe, ont été testées afin d'optimiser le signal et le contraste sur bruit, tout en limitant la durée totale d'acquisition par cerveau à 15 min. Au final, nous avons abouti aux protocoles suivants :

En premier lieu, une séquence 2D type FLASH de localisation des échantillons (Tableau 2) nous a permis de vérifier qu'ils étaient correctement placés dans le spectromètre, qu'ils ne bougeaient pas, mais aussi de définir et modifier leur position pour que les images IRM obtenues soient optimales.

Tableau 2. Paramètres de la séquence IRM de localisation (FLASH)

Séquence IRM	Echantillon (+/- Gd 1/40 <sup>ème</sup> )
Localisation (FLASH)	
Matrice	192x192
FOV	2.5x2.5cm <sup>2</sup>
Durée	2min09s
Temps de Répétition (ms)	15
Temps d'Echo (ms)	3.5
Nombre de moyennage	1
Résolution en « x » (mm)	0.13
Résolution en « y » (mm)	0.13
Epaisseur de coupe (mm)	1

L'analyse a ensuite été réalisée selon deux protocoles composés, soit d'une séquence en écho de gradient pondérée T1 type FLASH [Fast Low Angle SHot] (Haase A 1986) (Tableau 3), qui présente un bon contraste anatomique et est sensible aux saignements, soit d'une

séquence en écho de spin T2 type RARE [Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement] (Hennig J 1986) (Tableau 3), sensible aux œdèmes. Dans le second cas, les échantillons ont été fixés sans Gadolinium. En effet, cet agent de contraste accélère la relaxation de l'aimantation et entraîne un hypersignal relatif pour les séquences pondérées en T1. Par contre, à fortes concentrations, il génère une réduction en T2 qui peut produire des hyposignaux. Les paramètres d'analyse sont indiqués dans le Tableau 2, le Tableau 3 et le Tableau 4.

**Tableau 3. Paramètres de la séquence IRM de pondération T1 (3D FLASH)**

Pondération T1 (3D FLASH)	E18 (+/- Gd 1/40 <sup>ème</sup> )	P7 (+/- Gd 1/40 <sup>ème</sup> )	Cerveau IP adulte
Matrice	192x192x64	192x192x64	128x128x70
FOV	1x1x1mm <sup>3</sup>	1x1x1mm <sup>3</sup>	2x1x1,09mm <sup>3</sup>
Durée	8min11s	12min17s	20min28s
Temps de Répétition (ms)	40	30	100
Temps d'Echo (ms)	3	4	2,6
Nombre de moyennage	1	2	1
Résolution en « x » (mm)	0.05	0.05	0.16
Résolution en « y » (mm)	0.05	0.05	0.08
Résolution en « z » (mm)	0.16	0.16	0.16
Epaisseur de coupe (mm)	1	1	1

Tableau 4. Paramètres de la séquence IRM de diffusion T2 (3D TURBORARE)

Pondération de diffusion T2 (3D TURBORARE)	E18 (+/- Gd 1/40 <sup>ème</sup> )	P7 (+/- Gd 1/40 <sup>ème</sup> )
Matrice	128x128x70	192x192x35
FOV	2x1x1.09mm <sup>3</sup>	1x1x1.09mm <sup>3</sup>
Durée	14min	14min
Temps de Répétition (ms)	1500	2000
Temps d'Echo (ms)	40	35
Nombre de moyennage	2	1
Résolution en « x » (mm)	0.16	0.05
Résolution en « y » (mm)	0.08	0.05
Résolution en « z » (mm)	0.16	0.31
Epaisseur de coupe (mm)	1	1

Le plugin BrukerFilesIJ9Beta du logiciel ImageJ a été utilisé pour l'analyse des données IRM obtenues. Nous avons inspecté visuellement toutes les images et avons noté la présence d'une ou plusieurs lésions dans le cerveau (oui/non). Une lésion correspondait à un hyposignal dans la séquence FLASH-3D et, dans une plus faible mesure, un hyposignal dans la séquence RARE-3D. Nous avons également contouré manuellement tous les cerveaux à partir des images FLASH-3D pour calculer le volume cérébral. Le volume cérébral était calculé en multipliant le nombre de pixel par le volume individuel d'un pixel (0,017 mm<sup>3</sup>).

### III. La technique de mise en transparence des échantillons

#### A. La technique iDISCO

##### 1. Principe

La technique iDISCO est une méthode alternative à la coupe de cerveau qui permet des immunomarquages sur cerveau entier rendu transparent (Renier N 2014) (Belle M 2014). Nous avons suivi le protocole décrit par Belle et al. (Belle M 2014) (Figure 49).

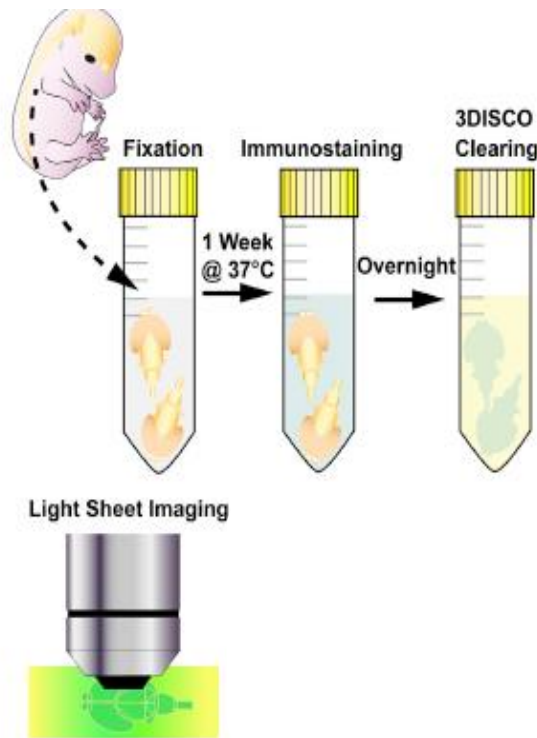


Figure 49. Les différentes étapes de la technique iDISCO (Belle M 2014)

Après retrait des cerveaux hors de la boîte crânienne et fixation au PFA 4%/PBS, ils ont été incubés 48h sous rotation à température ambiante, dans une solution de PBSGT composée de PBS 1X, 0.2% gélatine (Sigma Aldrich #48723), 0.5% Triton X100 (Sigma Aldrich #X100) et 0.01% Thimerosal (Sigma Aldrich #T5125).

L'anticorps primaire a ensuite été ajouté au 1/200, dans une solution de PBSGT préparée extemporanément. Les échantillons ont été mis sous rotation de 100 rpm à 37°C pendant 7 jours. L'anticorps primaire a ensuite été ajouté au 1:200, dans une solution de PBSGT préparée extemporanément. Les échantillons ont ensuite été mis sous rotation de 100 rpm à 37°C pendant 7 jours. Ils ont ensuite été lavés 6 fois pendant 30 min en PBSGT à température ambiante, puis incubés 7 jours à 37°C avec l'anticorps secondaire au 1:1000 dans du PBSGT. Après 6



nouveaux lavages de 30 min en PBSGT à température ambiante, l'étape de mise en transparence a été réalisée.

Toute la procédure a été réalisée sous hotte, sur un tube rotator à 14 rpm, avec protection des tubes à la lumière. Les échantillons ont subis des déshydratations successives 50%, 80%, 100% de 90 min chacune, en Tetrahydrofurane (THF, Sigma Aldrich #186562), puis ont été délipidés durant 40 min en Dichlorométhane (Sigma Aldrich #270997), période durant laquelle les échantillons doivent couler au fond du tube.

Les échantillons ont ensuite été conservés à température ambiante dans un récipient en verre sombre, contenant du Dibenzylether (Sigma Aldrich #33630).

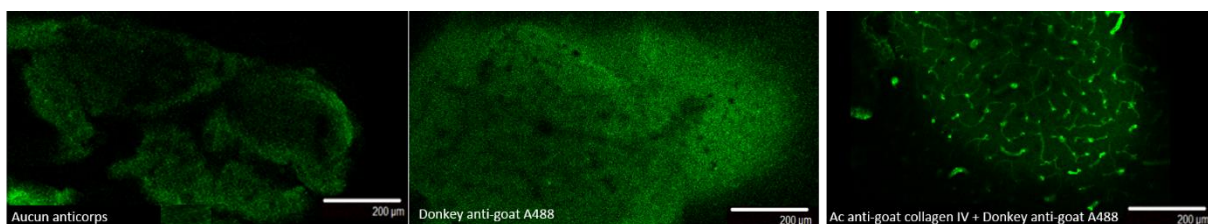
Les immunomarquages ont été étudiés en premier lieu sur un microscope confocal (Leica TCS SP2 SE, Allemagne) au CEA-Grenoble. En cas de marquage de bonne qualité, les échantillons ont ensuite été étudiés au microscope à feuille de lumière (Ultramicroscope, LaVision BioTec, Allemagne) en utilisant des lasers 488nm et 588nm sur la plateforme Imagerie de l'Institut de la Vision, Paris.

Les données acquises ont finalement été traitées sur le logiciel Imaris 8, de la société Bitplane.

## 2. Anticorps utilisés & spécificité

Tout d'abord, la spécificité de l'anticorps primaire goat anti-collagen IV (#AB769, Merck Millipore) et de son anticorps secondaire Donkey anti-goat conjugué à Alexa488 (#A11055, Life Technologies), ont été vérifiés à 488nm (Figure 49).

Comme montré ci-dessous, l'anticorps détectant le collagen IV génère un signal spécifique (Figure 50).



**Figure 50. Test de spécificité du marquage collagenIV en technique iDISCO.**

Aucun signal n'a été détecté avec l'anticorps secondaire seul, contrairement à son association avec l'anticorps primaire goat anti-collagen IV où le système vasculaire est détecté.

De même, la spécificité de l'anticorps anti-CD31 couplé à la Phycoerythrin (#ab25644 Abcam) a été testée à 543nm. Même si le signal est plus faible que celui du collagen IV utilisé en association pour les doubles immunomarquages, cet anticorps est spécifique (

Figure 51).

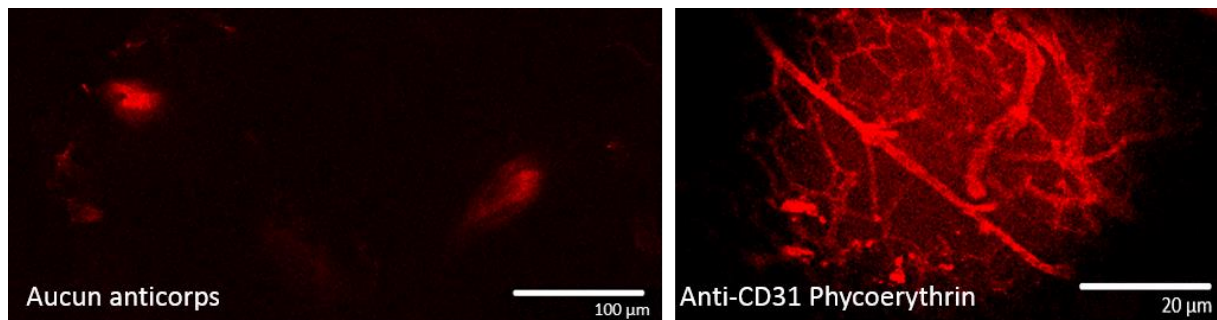


Figure 51. Test de spécificité du marquage CD31 en technique iDISCO.



## ***Bibliographie***

- Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD. «c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation.» *Learn Mem* 7, n° 15 (2008): 539-49.
- Albensi BC, Mattson MP. «Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity.» *Synapse* 2, n° 35 (2000): 151-9.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell: sixth edition*. Garland science, 2014.
- Allen NJ, Barres BA. «Neuroscience: Glia - more than just brain glue.» *Nature* 2009: 675-7.
- Alvarez VA, Sabatini BL. «Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines.» *Annu Rev Neurosci.* 30 (2007): 79-97.
- Aradhya S, Bardaro T, Galgóczy P, Yamagata T, Esposito T, Patlan H, Ciccodicola A, Munnich A, Kenwrick S, Platzer M, D'Urso M, Nelson DL. «Multiple pathogenic and benign genomic rearrangements occur at a 35 kb duplication involving the NEMO and LAGE2 genes.» *Hum Mol Genet.* 10, n° 22 (2001): 2557-67.
- Ardley HC, Robinson PA. «E3 ubiquitin ligases.» *Essays Biochem* 41 (2005): 15-30.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. «TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination.» *Nat Neurosci.* 4, n° 11 (2001): 1116-22.
- Baek, KH. «Conjugation and deconjugation of ubiquitin regulating the destiny of proteins.» *Exp Mol Med.* 1, n° 35 (2003): 1-7.
- Baertling F, Kokozidou M, Pufe T, Clarner T, Windoffer R, Wruck CJ, Brandenburg LO, Beyer C, Kipp M. «ADAM12 is expressed by astrocytes during experimental demyelination.» *Brain Res.* 1326 (2010): 1-14.
- Beg AA, Baltimore D. «An essential role for NF-κB in preventing TNF-alpha-induced cell death.» *Science* 5288, n° 274 (1996): 782-4.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. «Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B.» *Nature* 6536, n° 376 (1995): 2994-9.
- Belle M, Godefroy D, Dominici C, Heitz-Marchaland C, Zelina P, Hellal F, Bradke F, Chédotal A. «A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system.» *Cell Rep.* 4, n° 9 (2014): 1191-201.

- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. «Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival.» *J Neurosci* 19, n° 22 (2002): 8466-75.
- Blank M, Prinz T. «NF-κB signaling regulates myelination in the CNS.» *Front Mol Neurosci* 7, n° 47 (2014): 1-6.
- Bliim N, Leshchyn'ska I, Sytnyk V, Janitz M. «Transcriptional regulation of long-term potentiation.» *Neurogenetics*, *in press*.
- Bloch, B. «Eigentumliche, bisher nicht beschriebene Pigmentaffektion (incontinentia pigmenti).» *Schweiz Med Wochenschr* 7 (1926): 404-5.
- Bodak N, Hadj-Rabia S, Hamel-Teillac D, de Prost Y, Bodemer C. «Late recurrence of inflammatory first-stage lesions in incontinentia pigmenti: an unusual phenomenon and a fascinating pathologic mechanism.» *Arch Dermatol* 2, n° 139 (2003): 201-4.
- Bodemer, C. «Incontinentia pigmenti and hypomelanosis of Ito.» *Handb Clin Neurol* 111 (2013): 341-7.
- Boksa, P. «Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models.» *Brain Behav Immun* 6, n° 24 (2010): 881-97.
- Bracchi-Ricard V, Brambilla R, Levenson J, Hu WH, Bramwell A, Sweatt JD, Green EJ, Bethea JR. «Astroglial nuclear factor-kappaB regulates learning and memory and synaptic plasticity in female mice.» *J Neurochem* 3, n° 104 (2008): 611-23.
- Bren GD, Solan NJ, Miyoshi H, Pennington KN, Pobst LJ, Paya CV. «Transcription of the RelB gene is regulated by NF-κB.» *Oncogene* 20, n° 53 (2001): 7722-33.
- Burns SO, Plagnol V, Gutierrez BM, Al Zahrani D, Curtis J, Gaspar M, Hassan A, Jones AM, Malone M, Rampling D, McLatchie A, Doffinger R, Gilmour KC, Henriquez F, Thrasher AJ, Gaspar HB, Nejentsev S. «Immunodeficiency and disseminated mycobacterial infection associated with homozygous nonsense mutation of IKKβ.» *J Allergy Clin Immunol* 1, n° 134 (2014): 215-8.
- Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. «Mutations in the IκBα gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκBα.» *Oncogene* 20, n° 18 (1999): 3063-70.
- Carney, RG. «Incontinentia pigmenti. A world statistical analysis.» *Arch Dermatol* 112 (1976): 535-542.

- Chariot, A. «The NF- $\kappa$ B-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer.» *Trends Cell Biol* 8, n° 19 (2009): 404–413.
- Chen CJ, Han IC, Tian J, Muñoz B, Goldberg MF. «Extended Follow-up of Treated and Untreated Retinopathy in Incontinentia Pigmenti: Analysis of Peripheral Vascular Changes and Incidence of Retinal Detachment.» *JAMA Ophthalmol.* 5, n° 133 (2015): 542-8.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. «Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1.» *Nature* 403, n° 6768 (2000): 434-9.
- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. «ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation.» *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3, n° 77 (1980): 1365-8.
- Clague MJ, Coulson JM, Urbe S. «Cellular functions of the DUBs.» *Journal of Cell Science,* n° 125 (2012): 277-86.
- Clarke A, Phillips DI, Brown R, Harper PS. «Clinical aspects of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia.» *Arch Dis Child* 1987: 989-96.
- Conte MI, Pescatore A, Paciolla M, Esposito E, Miano MG, Lioi MB, McAleer MA, Giardino G, Pignata C, Irvine AD, Scheuerle AE, Royer G, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Bonnefont JP, Munnich A, Smahi A, Steffann J, Fusco F, Ursini MV. «Insight into IKBKG/NEMO locus: report of new mutations and complex genomic rearrangements leading to incontinentia pigmenti disease.» *Hum Mutat* 2, n° 35 (2014): 165-77.
- Conte MI, Pescatore A, Paciolla M, Esposito E, Miano MG, Lioi MB, McAleer MA, Giardino G, Pignata C, Irvine AD, Scheuerle AE, Royer G, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Bonnefont JP, Munnich A, Smahi A, Steffann J, Fusco F, Ursini MV. «Insight into IKBKG/NEMO locus: report of new mutations and complex genomic rearrangements leading to incontinentia pigmenti disease.» *Hum Mutat* 2, n° 35 (2014): 165-77.
- Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Doffinger R, Cancrini C, Bonnet M, Puel A, Chable-Bessia C, Yamaoka S, Feinberg J, Dupuis-Girod S, Bodemer C, Livadiotti S, Novelli F, Rossi P, Fischer A, Israel A, Munnich A, Le Deist F, Casanova JL. «A hypermorphic I $\kappa$ B $\alpha$  mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency.» *J Clin Investig*, n° 112 (2003): 1108–15.

- Crampton SJ, O'Keeffe GW. «NF- $\kappa$ B: emerging roles in hippocampal development and function.» *Int J Biochem Cell Biol* 8, n° 45 (2013): 1821-4.
- Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. «Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation.» *Science* 284, n° 5412 (1999): 309-13.
- Denis-Donini S, Dellarole A, Crociara P, Francese MT, Bortolotto V, Quadrato G, Canonico PL, Orsetti M, Ghi P, Memo M, Bonini SA, Ferrari-Toninelli G, Grilli M. «Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF-kappaB p50-deficient mice.» *J Neurosci* 15, n° 28 (2008): 3911-9.
- Dickson KM, Bhakar AL, Barker PA. «TRAF6-dependent NF-kB transcriptional activity during mouse development.» *Dev Dyn* 1, n° 231 (2004): 122-7.
- Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwrick S, Dupuis-Girod S, Blanche S, Wood P, Rabia SH, Headon DJ, Overbeek PA, Le Deist F, Holland SM, Belani K, Kumararatne DS, Fischer A, Shapiro R, Conley ME, Reimund E. «X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling.» *Nat Genet* 3, n° 27 (2001): 277-85.
- Doi TS, Marino MW, Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old LJ, Obata Y. «Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality.» *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6, n° 96 (1999): 2994-9.
- Doi TS, Takahashi T, Taguchi O, Azuma T, Obata Y. «NF-kappa B RelA-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses.» *J Exp Med*. 5, n° 185 (1997): 953-61.
- Duckworth EA, Butler T, Collier L, Collier S, Pennypacker KR. «NF-kappaB protects neurons from ischemic injury after middle cerebral artery occlusion in mice.» (*Brain Res*) 1, n° 1088 2006: 167-75.
- Edelmann MJ, Iphofer A, Akutsu M, Altun M, di Gleria K, Kramer HB, Fiebiger E, Dhe-Paganon S, Kessler BM. «Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination.» *The Biochemical journal*, n° 418 (2009): 379-90.
- Ehlers, MD. «Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system.» *Nat Neurosci* 3, n° 6 (2003): 231-42.
- Engelmann C, Haenold R. «Transcriptional Control of Synaptic Plasticity by Transcription Factor NF- $\kappa$ B.» *Neural Plast*. 2016.

- Finck A, Van der Meer JW, Schäffer AA, Pfannstiel J, Fieschi C, Plebani A, Webster AD, Hammarström L, Grimbacher B. «Linkage of autosomal-dominant common variable immunodeficiency to chromosome 4q.» *Eur J Hum Genet.* 7, n° 14 (2006): 867-75.
- Fliegauf M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K, Winzer S, Bulashevskaya A, Scerri T, Leung E, Jordan A, Keller B, de Vries E, Cao H, Yang F, Schäffer AA, Warnatz K, Browett P, Douglass J, Ameratunga RV, van der Meer JW, Grimbacher B. «Haploinsufficiency of the NF- $\kappa$ B1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency.» *Am J Hum Genet.* 3, n° 97 (2015): 389-403.
- Franklin RJ, Ffrench-Constant C. «Remyelination in the CNS: from biology to therapy.» *Nat Rev Neurosci.* 11, n° 9 (2008): 839-55.
- Frederiksen AL, Larsen MJ, Brusgaard K, Novack DV, Knudsen PJ, Schrøder HD, Qiu W, Eckhardt C, McAlister WH, Kassem M, Mumm S, Frost M, Whyte MP. «Neonatal High Bone Mass With First Mutation of the NF- $\kappa$ B Complex: Heterozygous De Novo Missense (p.Asp512Ser) RELA (Rela/p65).» *J Bone Miner Res.* 2015.
- Friedman A, Heinemann U. *Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis.* Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition, 2012.
- Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. «Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity.» *Nature* 7399, n° 485 (2012): 517-21.
- Fusco F, Bardaro T, Fimiani G, Mercadante V, Miano MG, Falco G, Israël A, Courtois G, D'Urso M, Ursini MV. «Molecular analysis of the genetic defect in a large cohort of IP patients and identification of novel NEMO mutations interfering with NF-kappaB activation.» *Hum Mol Genet.* 16, n° 13 (2004): 1763-73.
- Fusco F, Mercadante V, Miano MG, Ursini MV. «Multiple regulatory regions and tissue-specific transcription initiation mediate the expression of NEMO/IKKgamma gene.» *Gene,* n° 383 (2006): 99-107.
- Fusco F, Paciolla M, Napolitano F, Pescatore A, D'Addario I, Bal E, Lioi MB, Smahi A, Miano MG, Ursini MV. «Genomic architecture at the Incontinentia Pigmenti locus favours de novo pathological alleles through different mechanisms.» *Hum Mol Genet.* 6, n° 21 (2012): 1260-71.



- Fusco F, Paciolla M, Pescatore A, Lioi MB, Ayuso C, Faravelli F, Gentile M, Zollino M, D'Urso M, Miano MG, Ursini MV. «Microdeletion/duplication at the Xq28 IP locus causes a de novo IKBKG/NEMO/IKKgamma exon4\_10 deletion in families with Incontinentia Pigmenti.» *Hum Mutation* 9, n° 30 (2009): 1284-91.
- García-Martín P, Hernández-Martín A, Torrelo A. «Ectodermal Dysplasias: A Clinical and Molecular Review.» *Actas Dermosifiliogr* 2013: 451-70.
- Garrod, AE. «Peculiar pigmentation of the skin of an infant.» (*Trans Clin Soc Lond*), n° 39 (1906): 216.
- Gautheron J, Pescatore A, Fusco F, Esposito E, Yamaoka S, Agou F, Ursini MV, Courtois G. «Identification of a new NEMO/TRAF6 interface affected in incontinentia pigmenti pathology.» *Hum Mol Genet.* 16, n° 19 (2010): 3138-49.
- Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, Banerjee A. «Unravelling the complexities of the NF- $\kappa$ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models.» *Oncogene* 51, n° 25 (2006): 6781–99.
- Gutierrez H, Davies AM. «Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF- $\kappa$ B.» *Trends Neurosci* 6, n° 36 (2011): 316-25.
- Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A. «NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS.» *Development* 7, n° 132 (2005): 1713-26.
- Gutierrez, H, GW O'Keeffe, N Gavaldà, D Gallagher, et AM Davies. «Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA.» *J Neurosci* 33, n° 28 (2008): 8246-56.
- Haase A, Frahm J, Matthaei D, Hanicke W, Merboldt KD. «FLASH imaging. Rapid NMR imaging using low flip-angle pulses.» *J. of Magnetic Resonance* 2, n° 67 (1986): 258-66.
- Hadj-Rabia S, Froidevaux D, Bodak N, Hamel-Teillac D, Smahi A, Touil Y, Fraitag S, de Prost Y, Bodemer C. «Clinical study of 40 cases of incontinentia pigmenti.» *Arch Dermatol.* 9, n° 139 (2003): 1163-70.
- Happle, R. «Incontinentia pigmenti versus hypomelanosis of Ito: the whys and wherefores of a confusing issue.» *Am. J. Med. Genet* 79 (1998): 64-5.
- Hayden MS, Ghosh S. «Shared principles in NF-kappaB signaling.» *Cell* 3, n° 132 (2008): 344-62.

- Hennel SJ, Ekert PG, Volpe JJ, Inder TE. «Insights into the pathogenesis of cerebral lesions in incontinentia pigmenti.» *Pediatr Neurol.* 2003: 148-50.
- Hennig J, Nauerth A, Friedburg H. «RARE imaging - a fast imaging method for clinical MR.» *Magn Reson Med* 3 (1986): 823-33.
- Henson PM, Hume DA. «Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis.» *Trends Immunol.* 5, n° 27 (2006): 244-50.
- Herrmann O, Baumann B, de Lorenzi R, Muhammad S, Zhang W, Kleesiek J, Malfertheiner M, Köhrmann M, Potrovita I, Maegele I, Beyer C, Burke JR, Hasan MT, Bujard H, Wirth T, Pasparakis M, Schwaninger M. «IKK mediates ischemia-induced neuronal death.» *Nat. Med* 12, n° 11 (2005): 1322-9.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. «Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown.» *J Biol Chem.* 13, n° 258 (1983): 8206-14.
- Hoffmann A, Leung TH, Baltimore D. «Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities.» *EMBO J.* 20, n° 22 (2003): 5530-9.
- Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. «Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase.» *Science* 284, n° 5412 (1999): 316-20.
- Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M. «IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB.» *Nature* 6829, n° 410 (2001): 710-4.
- Imielski Y, Schwamborn JC, Lüningschrör P, Heimann P, Holzberg M, Werner H, Leske O, Püschel AW, Memet S, Heumann R, Israel A, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. «Regrowing the Adult Brain: NF-κB Controls Functional Circuit Formation and Tissue Homeostasis in the Dentate Gyrus.» *PLoS One* 7, n° 2 (2012): 1-13.
- Iwasaki A, Medzhitov R. «Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.» *Science* 5963, n° 327 (2010): 291-5.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. «Innate immune recognition.» *Annu Rev Immunol.*, n° 20 (2002): 197-216.
- Janssen R, van Wengen A, Hoeve MA, ten Dam M, van der Burg M, van Dongen J, van de Vosse E, van Tol M, Bredius R, Ottenhoff TH, Weemaes C, van Dissel JT, Lankester A. «The same IkappaBalpha mutation in two related individuals leads to completely different clinical syndromes.» *The J Exp Med*, n° 200 (2004): 559–68.

- Jean-Baptiste S, O'Toole EA, Chen M, Guitart J, Paller A, Chan LS. «Expression of eotaxin, an eosinophil-selective chemokine, parallels eosinophil accumulation in the vesiculobullous stage of incontinentia pigmenti.» *Clin Exp Immunol* 3, n° 127 (2002): 470-8.
- Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G, Pender SL, Fullard N, Nelson G, Mann J, van de Sluis B, Mann DA, von Zglinicki T. «Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice.» *Nat Commun.* 2 (2014): 4172.
- Kalay E, Sezgin O, Chellappa V, Mutlu M, Morsy H, Kayserili H, Kreiger E, Cansu A, Toraman B, Abdalla EM, Aslan Y, Pillai S, Akarsu NA. «Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome.» *Am J Hum Genet.* 1, n° 90 (2012): 76-85.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. «NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain.» *Front Mol Neurosci.* 8, n° 69 (2015).
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. «NF-kappaB in the nervous system.» *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3, n° 1 (2009): 1-13.
- Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. «Transcription factor NF- $\kappa$ B is activated in primary neurons by amyloid  $\beta$  peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease.» *Proc Natl Acad Sci* 6, n° 94 (1997): 2642-7.
- Karin M, Ben-Neriah Y. «Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.» *Annu Rev Immunol*, n° 18 (2000): 621-63.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. «NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit.» *Nat Rev Cancer.* 4, n° 2 (2002): 301-10.
- Karin, M. «Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression.» *Nature* 441, n° 7092 (2006): 431-6.
- Kawai T, Nishikomori R, Heike T. «Diagnosis and treatment in anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency.» *Allergol Int.* 2, n° 61 (2012): 207-17.
- Kenwrick S, Woffendin H, Jakins T, Shuttleworth SG, Mayer E, Greenhalgh L, Whittaker J, Rugolotto S, Bardaro T, Esposito T, D'Urso M, Soli F, Turco A, Smahi A, Hamel-Teillac D, Lyonnet S, Bonnefont JP, Munnich A, Aradhya S, Kashork CD, Shaffer LG, Nelson. «Survival of male patients with incontinentia pigmenti carrying a lethal

- mutation can be explained by somatic mosaicism or Klinefelter syndrome.» *Am J Hum Genet.* 6, n° 69 (2001): 1210-7.
- Keusekotten K, Elliott PR, Glockner L, Fiil BK, Damgaard RB, Kulathu Y, Wauer T, Hospenthal MK, Gyrd-Hansen M, Krappmann D. «OTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing Met1-linked polyubiquitin.» *Cell* 6, n° 153 (2013): 1312–26.
- Klement JF, Rice NR, Car BD, Abbondanzo SJ, Powers GD, Bhatt PH, Chen CH, Rosen CA, Stewart CL. «I $\kappa$ Ba deficiency results in a sustained NF- $\kappa$ B response and severe widespread dermatitis in mice.» *Mol Cell Biol.* 5, n° 16 (1996): 2341-9.
- Komander D, Clague MJ, Urbe S. «Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases.» (*Nature reviews. Molecular cell biology.*, n° 10 (2009): 550-63.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C. «Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes.» *Nat Genet* 2, n° 32 (2002): 285-9.
- Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. «Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior.» *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6, n° 107 (2010): 2669-74.
- Körbelin J, Dogbevia G, Michelfelder S, Ridder DA, Hunger A, Wenzel J, Seismann H, Lampe M, Bannach J, Pasparakis M, Kleinschmidt JA, Schwaninger M, Trepel M. «A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases.» *EMBO Mol Med.*, 2016: 609-25.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G. «The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- $\kappa$ B signalling by deubiquitination.» *Nature* 6950, n° 424 (2003): 801–805.
- Kremer D, Aktas O, Hartung HP, Küry P. «The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors.» *Ann Neurol.* 4, n° 69 (2011): 602-18.
- Kretz A, Herrmann KH, Fischer S, Engelmann C, Witte OW, Reichenbach JR, Weih F, Haenold R. «Dysfunctional NF- $\kappa$ B and brain myelin formation.» *Eur J Hum Genet.* 6, n° 22 (2014): 724-5.

- Kuester F, Olbing H. «Incontinentia Pigmenti. Report of nine cases in one family and one necropsy investigation.» *Ann Paediatr* 202 (1964): 92-100.
- Kumari S, Bonnet MC, Ulvmar MH, Wolk K, Karagianni N, Witte E, Uthoff-Hachenberg C, Renauld JC, Kollias G, Toftgard R, Sabat R, Pasparakis M, Haase I. «Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice.» *Immunity* 5, n° 39 (2013): 899-911.
- Kyrargyri V, Vega-Flores G, Gruart A, Delgado-García JM, Probert L. «Differential contributions of microglial and neuronal IKK $\beta$  to synaptic plasticity and associative learning in alert behaving mice.» *Glia* 4, n° 63 (2015): 549-66.
- Lahtela J, Nousiainen HO, Stefanovic V, Tallila J, Viskari H, Karikoski R, Gentile M, Saloranta C, Varilo T, Salonen R, Kestilä M. «Mutant CHUK and severe fetal encasement malformation.» *N Engl J Med* 17, n° 363 (2010): 1631-7.
- Landy SJ, Donnai D. «Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome).» *J Med Genet* 30 (1993): 53-59.
- Lawrence T, Fong C. «The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB.» (*Int J Biochem Cell Biol.*) 4, n° 42 (2010): 519-23.
- Ledoux AC, Perkins ND. «NF- $\kappa$ B and the cell cycle.» *Biochem Soc Trans.* 1, n° 42 (2014): 76-81.
- Leslie EJ, O'Sullivan J, Cunningham ML, Singh A, Goudy SL, Ababneh F, Alsubaie L, Ch'ng GS, van der Laar IM, Hoogeboom AJ, Dunnwald M, Kapoor S, Jiramongkolchai P, Standley J, Manak JR, Murray JC, Dixon MJ. «Expanding the genetic and phenotypic spectrum of popliteal pterygium disorders.» *Am J Med Genet A* 3, n° 167A (2015): 545-52.
- Li Q, Estepa G, Memet S, Israel A, Verma IM. «Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation.» *Genes Dev.* 14, n° 14 (2000): 1729-33.
- Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. «Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene.» *Science* 5412, n° 284 (1999): 321-5.
- Li X, Liu H, Fischhaber PL, Tang TS. «Toward therapeutic targets for SCA3: Insight into the role of Machado-Joseph disease protein ataxin-3 in misfolded proteins clearance.» *Prog Neurobiol*, n° 132 (2015): 34-58.

- Lilienbaum A, Israël A. «From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons.» *Mol Cell Biol.* 8, n° 23 (2003): 2680-98.
- Liu H, Deng Y, Gao J, Liu Y, Li W, Shi J, Gong Q. «Sodium Hydrosulfide Attenuates Beta-Amyloid-Induced Cognitive Deficits and Neuroinflammation via Modulation of MAPK/NF-κB Pathway in Rats.» *Curr Alzheimer Res.* 7, n° 12 (2015): 673-683.
- Liu X, Popescu IR, Denisova JV, Neve RL, Corriveau RA, Belousov AB. «Regulation of cholinergic phenotype in developing neurons.» *J Neurophysiol.* 5, n° 99 (2008): 2443-55.
- Loh NR, Jadresic LP, Whitelaw A. «A genetic cause for neonatal encephalopathy: incontinentia pigmenti with NEMO mutation.» *Acta Paediatr* 3, n° 97 (2008): 379-81.
- Lopez-Granados E, Keenan JE, Kinney MC, Leo H, Jain N, Ma CA, Quinones R, Gelfand EW, Jain A. «A novel mutation in NFKBIA/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency.» *Hum Mutat*, n° 29 (2008): 861–8.
- Louis M, Hofmann K, Broemer M. «Evolutionary Loss of Activity in De-Ubiquitylating Enzymes of the OTU Family.» *PLoS One* 11, n° 10 (2015): 783-8.
- Lovett-Racke AE, Bittner P, Cross AH, Carlino JA, Racke MK. «Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis with insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF-1/IGF-binding protein-3 complex (IGF-1/IGFBP3).» *J Clin Invest.* 8, n° 101 (1998): 1797-804.
- Lu XJ, Chen XQ, Weng J, Zhang HY, Pak DT, Luo JH, Du JZ. «Hippocampal spine-associated Rap-specific GTPase-activating protein induces enhancement of learning and memory in postnatally hypoxia-exposed mice.» *Neuroscience* 2, n° 162 (2009): 404-14.
- Lu ZY, Yu SP, Wei JF, Wei L. «Age-related neural degeneration in nuclear-factor kappaB p50 knockout mice.» *Neuroscience* 3, n° 139 (2006): 965-78.
- Lubin FD, Sweatt JD. «The IkappaB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories.» *Neuron* 6, n° 55 (2007): 942-57.
- Mahul-Mellier AL, Pazarentzos E, Datler C, Iwasawa R, AbuAli G, Lin B, Grimm S. «De-ubiquitinating protease USP2a targets RIP1 and TRAF2 to mediate cell death by TNF.» *Cell Death Differ* 5, n° 19 (2012): 891–9.
- Mak TW, Saunders ME. *The immune response: basic and clinical principles*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2006.

- Makris C, Godfrey VL, Krähn-Senftleben G, Takahashi T, Roberts JL, Schwarz T, Feng L, Johnson RS, Karin M. «Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti.» *Mol Cell*. 6, n° 5 (2000): 969-79.
- Mao Y, Senic-Matuglia F, Di Fiore PP, Polo S, Hodsdon ME, De Camilli P. «Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, n° 102 (2005): 12700-5.
- Marini AM, Jiang X, Wu X, Tian F, Zhu D, Okagaki P, Lipsky RH. «Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype.» *Restor Neurol Neurosci*. 2, n° 22 (2004): 121-30.
- Martini G, Ursini MV. «A new lease of life for an old enzyme.» *Bioessays* 8, n° 18 (1996): 631-7.
- Mathieu P, Adami PV, Morelli L. «Notch signaling in the pathologic adult brain.» *Biomol Concepts* 5, n° 4 (2013): 465-76.
- Mattson MP, Camandola S. «NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders.» *J Clin Invest*. 3, n° 107 (2001): 247-54.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B. «BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders.» *Trends Neurosci*. 10, n° 27 (2004): 589-94.
- Mattson MP, Meffert MK. «Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease.» *Cell Death Differ*. 5, n° 13 (2006): 852-60.
- McDonald DR, Mooster JL, Reddy M, Bawle E, Secord E, Geha RS. «Heterozygous N-terminal deletion of IkappaBalpha results in functional nuclear factor kappaB haploinsufficiency, ectodermal dysplasia, and immune deficiency.» *The J Allergy Clin Immunol*, n° 120 (2007): 900-7.
- Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG, Routtenberg A. «Gene expression of the transcription factor NF-kB in hippocampus: Regulation by synaptic activity.» *Brain Res Mol Brain Res*, 1996: 179-90.
- Meffert MK, Baltimore D. «Physiological functions for brain NF-kappaB.» *Trends Neurosci*. 1, n° 28 (2005): 37-43.

- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. «NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior.» *Nat Neurosci.* 10, n° 6 (2003): 1072-8.
- Meldrum, BS. «Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology.» *J Nutr.*, 2000: 1007S-15S.
- Methot L, Hermann R, Tang Y, Lo R, Al-Jehani H, Jhas S, Svoboda D, Slack RS, Barker PA, Stifani S. «Interaction and antagonistic roles of NF-κB and Hes6 in the regulation of cortical neurogenesis.» *Mol Cell Biol.* 14, n° 33 (2013): 2797-808.
- Meuwissen ME, Mancini GM. «Neurological findings in incontinentia pigmenti; a review.» *Eur J Med Genet.* 5, n° 55 (2012): 323-31.
- Micheau O, Tschopp J. «Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes.» *Cell* 2 (2003): 181–90.
- Mikkola ML, Thesleff I. «Ectodysplasin signaling in development.» *Cytokine Growth Factor Rev.* 3-4, n°14 (2003): 211-24.
- Ming GL, Song H. «Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.» *Annu Rev Neurosci.* 28 (2005): 223-50.
- Minić S, Trpinac D, Gabriel H, Gencik M, Obradović M. «Dental and oral anomalies in incontinentia pigmenti: a systematic review.» *Clin Oral Investig.* 1, n° 17 (2013): 1-8.
- Minić S, Trpinac D, Obradović M. «Systematic review of central nervous system anomalies in incontinentia pigmenti.» *Orphanet J Rare Dis.* 8, n° 13 (2013): 25.
- Montes CM, Maize JC, Guerry-Force ML. «Incontinentia pigmenti with painful subungual tumors: a two-generation study.» *J Am Acad Dermatol* 2 Suppl, n° 50 (2004): S45-52.
- Moore CS, Abdullah SL, Brown A, Arulpragasam A, Crocker SJ. «How factors secreted from astrocytes impact myelin repair.» *J Neurosci Res.* 1, n° 89 (2011): 13-21.
- Mortier K, Wackens G. «Ectodermal dysplasia anhidrotic.» *Orphanet* 2004: 1-6.
- Mousallem T, Yang J, Urban TJ, Wang H, Adeli M, Parrott RE, Roberts JL, Goldstein DB, Buckley RH, Zhong XP. «A nonsense mutation in IKBKB causes combined immunodeficiency.» *Blood* 13, n° 124 (2014): 2046-50.
- Nakada D, Levi BP, Morrison SJ. «Integrating physiological regulation with stem cell and tissue homeostasis.» *Neuron* 4, n° 70 (2011): 703-18.
- Nataf, S. *Le tissu nerveux*. 2009. <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-nerveux--cours-n-1--2009-> (accès le 22 mars 2016).
- Nathan , C. «Points of control in inflammation.» *Nature* 6917, n° 420 (2002): 846-52.



- Nenci A, Huth M, Funteh A, Schmidt-Supprian M, Bloch W, Metzger D, Chambon P, Rajewsky K, Krieg T, Haase I, Pasparakis M. «Skin lesion development in a mouse model of incontinentia pigmenti is triggered by NEMO deficiency in epidermal keratinocytes and requires TNF signaling.» *Hum Mol Genet* 15, n° 4 (2006): 531-42.
- Nicholas RS, Wing MG, Compston A. «Nonactivated microglia promote oligodendrocyte precursor survival and maturation through the transcription factor NF-kappa B.» *Eur J Neurosci* 5, n° 13 (2001): 959-67.
- Nielsen C, Jakobsen MA, Larsen MJ, Muller AC, Hansen S, Lillevang ST, Fisker N, Barington T. «Immunodeficiency associated with a nonsense mutation of IKBKB.» *J. Clin. Immunol.*, n° 34 (2014): 916-21.
- Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R. «A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes.» *Cell*, n° 123 (2005): 773-86.
- O'Doherty M, Mc Creery K, Green AJ, Tuwir I, Brosnahan D. «Incontinentia pigmenti – ophthalmological observation of a series of cases and review of the literature.» *Br J Ophthalmol* 1, n° 95 (2011): 11–6.
- Oberle EJ, Verbsky JW, Routes J, Hintermeyer M, Worthey E, Dasu T, Bengtson C, Buzzell A. «A172: Metaphyseal Chondrodysplasia, Ectodermal Dysplasia, Short Stature, Hypergammaglobulinemia, and Spontaneous Inflammation Without Infections in an Extended Family Due to Mutation in NFKB1A.» *Arthritis Rheumatol* 66, n° suppl.S3 (2014): 224-5.
- Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N. «A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome.» *The J Allergy Clin Immunol*, n° 129 (2012): 578–80.
- O'Mahony A, Raber J, Montano M, Foehr E, Han V, Lu SM, Kwon H, LeFevour A, Chakraborty-Sett S, Greene WC. «NF-kappaB/Rel regulates inhibitory and excitatory neuronal function and synaptic plasticity.» *Mol Cell Biol.* 19, n° 26 (2006): 7283-98.
- Oster SF, McLeod DS, Otsuji T, Goldberg MF, Lutty GA. «Preliminary ocular histopathological observations on heterozygous NEMO-deficient mice.» *Exp Eye Res.* 3, n° 88 (2009): 613-6.

- Page A, Navarro M, Garín M, Pérez P, Casanova ML, Moreno R, Jorcano JL, Cascallana JL, Bravo A, Ramírez A. «IKK $\beta$  leads to an inflammatory skin disease resembling interface dermatitis.» *J Invest Dermatol.* 6, n° 130 (2010): 1598-610.
- Pak DT, Yang S, Rudolph-Correia S, Kim E, Sheng M. «Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP.» *Neuron* 2, n° 31 (2001): 289-303.
- Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, Henneke P, Rensing-Ehl A, Rizzi M, Janda A, Hese K, Schlesier M, Holzmann K, Borte S, Laux C, Rump EM, Rosenberg A, Zelinski T, Schrezenmeier H, Wirth T, Ehl S, Schroeder ML, Schwarz K. «Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation.» *N Engl J Med* 26, n° 369 (2013): 2504-14.
- Parrish JE, Scheuerle AE, Lewis RA, Levy ML, Nelson DL. «Selection against mutant alleles in blood leukocytes is a consistent feature in Incontinentia Pigmenti type 2.» *Hum Mol Genet.* 11, n° 5 (1996): 1777-83.
- Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gillitzer R, Israel A, Krieg T, Rajewsky K, Haase I. «TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2.» *Nature* 6891, n° 417 (2002): 861-6.
- Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. «Dissection of the NF- $\kappa$ B signalling cascade in transgenic and knockout mice.» *Cell Death Differ* 5, n° 13 (2006): 861-72.
- Pickart CM, Eddins MJ. «Ubiquitin: structures, functions, mechanisms.» *Biochim Biophys Acta.* 1-3, n° 1695 (2004): 55-72.
- Pickart CM, Fushman D. «Polyubiquitin chains: polymeric protein signals.» *Curr Opin Chem Biol.* 6, n° 8 (2004): 610-6.
- Pitkänen A, Lukasiuk K. «Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets.» *Lancet Neurol*, 2011: 173-86.
- Pizzamiglio MR, Piccardi L, Bianchini F, Canzano L, Palermo L, Fusco F, D'Antuono G, Gelmini C, Garavelli L, Ursini MV. «Incontinentia pigmenti: learning disabilities are a fundamental hallmark of the disease.» *PLoS One* 1, n° 9 (2014).
- Prasad AV, Pilcher WH, Joseph SA. «Nuclear factor-kappa B in rat brain: enhanced DNA-binding activity following convulsant-induced seizures.» *Neurosci. Lett.* *Neurosci. Lett.* 170 (1994): 145-8.

- Puel A, Picard C, Ku CL, Smahi A, Casanova JL. «Inherited disorders of NF- $\kappa$ B-mediated immunity in man.» *Curr Opin Immunol* 1, n° 16 (2004): 34-41.
- Raasch J, Zeller N, van Loo G, Merkler D, Mildner A, Erny D, Knobloch KP, Bethea JR, Waisman A, Knust M, Del Turco D, Deller T, Blank T, Priller J, Brück W, Pasparakis M, Prinz M. «I $\kappa$ B kinase 2 determines oligodendrocyte loss by non-cell-autonomous activation of NF- $\kappa$ B in the central nervous system.» *Brain* 134 (2011): 1184-98.
- Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, Kensche T, Uejima T, Bloor S, Komander D, Randow F, Wakatsuki S, Dikic I. «Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- $\kappa$ B activation.» *Cell* 6, n° 136 (2009): 1098-109.
- Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. «iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging.» *Cell* 4, n° 159 (2014): 896-910.
- Reyes-Turcu FE, Wilkinson KD. «Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes.» *Chemical reviews*, n° 109 (2009): 1495-508.
- Ridder DA, Wenzel J, Müller K, Töllner K, Tong XK, Assmann JC, Stroobants S, Weber T, Niturad C, Fischer L, Lembrich B, Wolburg H, Grand'Maison M, Papadopoulos P, Korpos E, Truchetet F, Rades D, Sorokin LM, Schmidt-Supprian M, Bedell BJ. «Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit.» *J Exp Med.*, 2015: 1529-49.
- Rosenfeld ME, Prichard L, Shiojiri N, Fausto N. «Prevention of hepatic apoptosis and embryonic lethality in RelA/TNFR-1 double knockout mice.» *Am J Pathol* 3, n° 156 (2000): 997–1007.
- Röther, J. «Neuroprotection Does Not Work!» *Stroke* 2, n° 39 (2008): 523-4.
- Rushe M, Silvian L, Bixler S, Chen LL, Cheung A, Bowes S, Cuervo H, Berkowitz S, Zheng T, Guckian K, Pellegrini M, Lugovskoy A. «Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site.» *Structure* 5, n° 16 (2008): 798-808.
- Saaristo A, Karkkainen MJ, Alitalo K. «Insights into the molecular pathogenesis and targeted treatment of lymphedema.» *Ann N Y Acad Sci*, 2002: 94-110.

- Salama-Cohen P, Arévalo MA, Grantyn R, Rodríguez-Tébar A. «Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3.» *J Neurochem* 5, n° 97 (2006): 1269-78.
- Salles A, Boccia M, Blake M, Corbi N, Passananti C, Baratti CM, Romano A, Freudenthal R. «Hippocampal dynamics of synaptic NF-kappa B during inhibitory avoidance long-term memory consolidation in mice.» *Neuroscience* 291 (2015): 70-80.
- Salles A, Romano A, Freudenthal R. «Synaptic NF-kappa B pathway in neuronal plasticity and memory.» *J Physiol Paris* 4-6, n° 108 (2014): 256-62.
- Salzer, JL. «Polarized domains of myelinated axons.» (*Neuron*) 2, n° 40 (2003): 297-318.
- Sanclemente G, Murphy R, Contreras J, García H, Bonfill Cosp X. «Anti-TNF agents for paediatric psoriasis.» *Cochrane Database Syst Rev.* 11 (2015).
- Saneyoshi T, Fortin DA, Soderling TR. «Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways.» *Curr Opin Neurobiol* 1, n° 20 (2010): 108-15.
- Schimke LF, Rieber N, Rylaarsdam S, Cabral-Marques O, Hubbard N, Puel A, Kallmann L, Sombke SA, Notheis G, Schwarz HP, Kammer B, Hökfelt T, Repp R, Picard C, Casanova JL, Belohradsky BH, Albert MH, Ochs HD, Renner ED, Torgerson TR. «A novel gain-of-function IKBA mutation underlies ectodermal dysplasia with immunodeficiency and polyendocrinopathy.» *J Clin Immunol.* 6, n° 33 (2013): 1088-99.
- Schmeisser MJ, Baumann B, Johannsen S, Vindedal GF, Jensen V, Hvalby ØC, Sprengel R, Seither J, Maqbool A, Magnutzki A, Lattke M, Oswald F, Boeckers TM, Wirth T. «IκB kinase/nuclear factor κB-dependent insulin-like growth factor 2 (Igf2) expression regulates synapse formation and spine maturation via Igf2 receptor signaling.» *J Neurosci.* 16, n° 32 (2012): 5688-703.
- Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G, Addicks K, Israël A, Rajewsky K, Pasparakis M. «NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti.» *Mol Cell.*, 2000: 981-92.
- Schmidt-Ullrich R, Mémet S, Lilienbaum A, Feuillard J, Raphaël M, Israel A. «NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity.» *Development* 7, n° 122 (1996): 2117-28.

- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. «A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells.» *Nucleic Acids Res.* 24, n° 23 (1995): 5080-1.
- Sebban H, Courtois G. «NF-kappaB and inflammation in genetic disease.» *Biochem Pharmacol* 9, n° 72 (2006): 1153-60.
- Sebban-Benin H, Pescatore A, Fusco F, Pascuale V, Gautheron J, Yamaoka S, Moncla A, Ursini MV, Courtois G. «Identification of TRAF6-dependent NEMO polyubiquitination sites through analysis of a new NEMO mutation causing incontinentia pigmenti.» *Hum Mol Genet* 23, n° 16 (2007): 2805-15.
- Sefiani A, Abel L, Heuertz S, Sinnott D, Lavergne L, Labuda D, Hors-Cayla MC. «The gene for incontinentia pigmenti is assigned to Xq28.» *Genomics* 3, n° 4 (1989): 427-9.
- Sen R, Baltimore D. «Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.» *Cell* 5, n° 46 (1986): 705-16.
- Shi Z, Xu W, Loechel F, Wewer UM, Murphy LJ. «ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3.» *J Biol Chem.* 24, n° 275 (2000): 18574-80.
- Shuper A, Bryan RN, Singer HS. «Destructive encephalopathy in incontinentia pigmenti: a primary disorder?» *Pediatr Neurol* 1990: 137-40.
- Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuertz S, Munnich A, Israël A, Heiss NS, Klauck SM, Kioschis P, Wiemann S, Poustka A, Esposito T, Bardarocola A, D'Urso M, Woffendin H, Jakins T, Donnai D, Stewart H, Kenwrick SJ, Ara. «Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium.» *Nature* 6785, n° 405 (2000).
- Spallone, A. «Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome): seven case reports from one family.» *Br J Ophthalmol* 71 (1987): 629-34.
- Stratis A, Pasparakis M, Rupec RA, Markur D, Hartmann K, Scharffetter-Kochanek K, Peters T, van Rooijen N, Krieg T, Haase I. «Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation.» *J Clin Invest.* 8, n° 116 (2006): 2094-104.
- Sulzberger, MB. «Uber eine bisher nicht beschriebene congenitale Pigment anomalie (IP).» *Arch Dermatol Syph* 154 (1928): 19-32.

- Sun MY, Yetman MJ, Lee TC, Chen Y, Jankowsky JL. «Specificity and efficiency of reporter expression in adult neural progenitors vary substantially among nestin-CreER(T2) lines.» *J Comp Neurol.* 5, n° 522 (2014): 1191-208.
- Sun X, Wang X, Chen T, Li T, Cao K, Lu A, Chen Y, Sun D, Luo J, Fan J, Young W, Ren Y. «Myelin activates FAK/Akt/NF-kappaB pathways and provokes CR3-dependent inflammatory response in murine system.» *PLoS One* 2, n° 5 (2010).
- Sun, SC. «Non-canonical NF-κB signaling pathway.» *Cell Res.* 1, n° 21 (2011): 71-85.
- Tada H, Yoshida S, Yamaji Y, Fujisawa K, Ishibashi T. «NEMO mutational analysis in a Japanese family with incontinentia pigmenti.» *Eye Lond* 2007: 888-90.
- Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, Kawai T, Sanjo H, Yoshikawa K, Terada N, Akira S. «Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha.» *Science* 5412, n°284 (1999): 313-6.
- Tang T, Zhang J, Yin J, Staszkiwicz J, Gawronska-Kozak B, Jung DY, Ko HJ, Ong H, Kim JK, Mynatt R, Martin RJ, Keenan M, Gao Z, Ye J. «Uncoupling of inflammation and insulin resistance by NF-kappaB in transgenic mice through elevated energy expenditure.» *J Biol Chem.* 7, n° 285 (2010): 4637-44.
- Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N. «Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization.» *J Cell Biol.* 1, n° 155 (2001): 65-76.
- Tripathi R, McTigue DM. «Prominent oligodendrocyte genesis along the border of spinal contusion lesions.» *Glia* 7, n° 55 (2007): 698-711.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G. «Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety.» *Nat Genet.*, 1999: 99-103.
- Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M. «Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-κB signaling.» *Nat Immunol* 12, n° 9 (2008): 1364–70.
- Van Loo G, De Lorenzi R, Schmidt H, Huth M, Mildner A, Schmidt-Supprian M, Lassmann H, Prinz MR, Pasparakis M. «Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice.» *Nat Immunol.* 9, n° 7 (2006): 954-61.

- Van Steenwinckel J, Schang AL, Sigaut S, Chhor V, Degos V, Hagberg H, Baud O, Fleiss B, Gressens P. «Brain damage of the preterm infant: new insights into the role of inflammation.» *Biochem Soc Trans.* 2, n° 42 (2014): 557-63.
- Walczak, H. «TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer.» *Immunol Rev* 1, n° 244 (2011): 9-28.
- Walker WH, Stein B, Ganchi PA, Hoffman JA, Kaufman PA, Ballard DW, Hannink M, Greene WC. «The v-rel oncogene: insights into the mechanism of transcriptional activation, repression, and transformation.» *J Virol* 8, n° 66 (1992): 5018-29.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. «TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK.» *Nature* 6844, n° 412 (2001): 346-51.
- Wang G, Gao Y, Li L, Jin G, Cai Z, Chao JI, Lin HK. «K63-linked ubiquitination in kinase activation and cancer.» *Front Oncol.* 2 (2012): 5.
- Wertz I, Dixit V. «A20—a bipartite ubiquitin editing enzyme with immunoregulatory potential.» *Adv Exp Med Biol*, n° 809 (2014): 1-12.
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME. «Regulation of transcription factors by neuronal activity.» *Nat Rev Neurosci.* 12, n° 3 (2002): 921-31.
- Whiteside ST, Israël A. «I kappa B proteins: structure, function and regulation.» Édité par 75-82. *Semin Cancer Biol.* 2, n° 8 (1997).
- Williamson LL, Sholar PW, Mistry RS, Smith SH, Bilbo SD. «Microglia and memory: modulation by early-life infection.» *J Neurosci.* 43, n° 31 (2011): 15511-21.
- Wolf DS, Golden WC, Hoover-Fong J, Applegate C, Cohen BA, Germain-Lee EL, Goldberg MF, Crawford TO, Gauda EB. «High-dose glucocorticoid therapy in the management of seizures in neonatal incontinentia pigmenti: a case report.» *J Child Neurol.* 1, n° 30 (2015): 100-6.
- Wooten, MW. «Function for NF- $\kappa$ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C.» *J Neurosci Res* 5, n° 58 (1999): 607-11.
- Wu H, Luo J, Yu H, Rattner A, Mo A, Wang Y, Smallwood PM, Erlanger B, Wheelan SJ, Nathans J. «Cellular resolution maps of X chromosome inactivation: implications for neural development, function, and disease.» *Neuron* 1, n° 81 (2014): 103-19.
- Yamanishi E, Yoon K, Alberi L, Gaiano N, Mizutani K. «NF- $\kappa$ B signaling regulates the generation of intermediate progenitors in the developing neocortex.» *Genes Cells* 9, n° 20 (2015): 706-19.

- Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, Yeh WC, Mak TW. «Noncanonical NF- $\kappa$ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK.» *Nat Immunol* 12, n° 9 (2008): 1371–8.
- Zhang W, Potrovita I, Tarabin V, Herrmann O, Beer V, Weih F, Schneider A, Schwaninger M. «Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia.» *J Cereb Blood Flow Metab* 1, n° 25 (2005): 30-40.
- Zhang Y, Liu J, Yao S, Li F, Xin L, Lai M, Bracchi-Ricard V, Xu H, Yen W, Meng W, Liu S, Yang L, Karmally S, Liu J, Zhu H, Gordon J, Khalili K, Srinivasan S, Bethea JR, Mo X, Hu W. «Nuclear factor kappa B signaling initiates early differentiation of neural stem cells.» *Stem Cells* 3, n° 30 (2012): 510-24.
- Zhang Y, Yang WX. «Tight junction between endothelial cells: the interaction between nanoparticles and blood vessels.» *Beilstein J Nanotechnol*, 2016: 675-84.
- Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, Lin R. «The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways.» *Nat Immunol*. 6, n° 8 (2007): 592-600.





# *Annexes*

## **Annexes techniques**

**Annexe 1.** Paramètres d'optimisation des protocoles IRM

**Annexe 2.** Données de calcul du ratio cerveau/corps chez la souris contrôle et IP

**Annexe 3.** Données de calcul du ratio hippocampe/cerveau chez la souris contrôle et IP

**Annexe 4.** Données de calcul du ratio hippocampe/cerveau hors hippocampe chez la souris contrôle et IP

## **Annexes bibliographiques**

**Annexe 5.** Article “**IKK-related genetic diseases: probing NF- $\kappa$ B functions in humans and other matters**” Senegas et al. (2015), *CMLS*. 72(7): 1275-87.

**Annexe 6.** Livre “NF- $\kappa$ B-Related Genetic Diseases” Courtois *et al.* (2016), SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology.

**Annexe 7.** Manuscrit “**Vascular abnormalities in the brain of mice modeling Incontinentia pigmenti**” Senegas *et al.* (en cours de soumission)

**Annexe 1 :**

**Paramètres d'optimisation des protocoles IRM**

Séquences IRM	E18 (+/- Gd 1/40 <sup>ème</sup> ) (n=31)	P7 (+/- Gd 1/40 <sup>ème</sup> ) (n=219)
Localisation (FLASH)		
Matrice	192x192	192x192
FOV	2.5x2.5cm <sup>2</sup>	2.5x2.5cm <sup>2</sup>
Durée	2min09s	2min09s
Temps de Répétition (ms)	15	15
Temps d'Echo (ms)	3.5	3.5
Nombre de moyennage	1	1
Résolution en « x » (mm)	0.13	0.13
Résolution en « y » (mm)	0.13	0.13
Epaisseur de coupe (mm)	1	1

Pondération T1 (3D FLASH)		
Matrice	192x192x64	144x104x64/ 192x192x64
FOV	1x1x1mm <sup>3</sup>	1.06x1.14x1mm <sup>3</sup> / 1x1x1mm <sup>3</sup>
Durée	16min23s / 8min11s	15min21s / 12min17s
Temps de Répétition (ms)	80/40	100/30
Temps d'Echo (ms)	5/3	2,65/4
Nombre de moyennage	1	1/2
Résolution en « x » (mm)	0.05	0.05
Résolution en « y » (mm)	0.05	0.05
Résolution en « z » (mm)	0.16	0.16
Epaisseur de coupe (mm)	1	1

Pondération de diffusion T2 (3D TURBORARE)		
Matrice	192x192x70/ 128x128x70	192x192x35
FOV	1x1x1.09mm <sup>3</sup> /2x1x1.09mm <sup>3</sup>	1x1x1.09mm <sup>3</sup>
Durée	21min/14min	21min/14min
Temps de Répétition (ms)	1500	1500/2000
Temps d'Echo (ms)	40	40/35
Nombre de moyennage	1/2	2/1
Résolution en « x » (mm)	0.05/0.16	0.05
Résolution en « y » (mm)	0.05/0.08	0.05
Résolution en « z » (mm)	0.16	0.31
Epaisseur de coupe (mm)	1	1

**Annexe 2 :**

**Données de calcul du ratio cerveau/corps chez la souris contrôle et IP**

Souris contrôle	Poids de la souris (g)	Volume cerveau (mm <sup>3</sup> )	Ratio cerveau/corps
C9	3,25	248,0	76,31
C31	3,27	257,1	78,64
C32	4,59	265,3	57,80
C34	3,14	237,3	75,57
C35	3,66	248,1	67,77
C44	4,94	255,3	51,69
C45	3,45	333,3	96,62
C46	3,21	292,9	91,23
C47	3,26	230,3	70,65
C48	2,64	248,2	94,02
Moyenne	3,5 ± 0,7	261,6 ± 30,4	76 ± 14,9

Souris IP	Poids de la souris (g)	Volume cerveau (mm <sup>3</sup> )	Ratio cerveau/corps
IP4	2,56	188,60	73,67
IP36	2,58	182,37	70,69
IP43	2,87	192,28	67,00
IP48	2,85	205,58	72,13
IP49	2,37	176,97	74,67
IP58	2,6	195,73	75,28
IP60	2,4	178,37	74,32
IP121	2,84	204	71,83
IP183	2,38	170,58	71,67
IP217	2,96	205,9	69,56
Moyenne	2,6 ± 0,2	190,0 ± 12,8	72,1 ± 2,6

**Annexe 3 :**

**Données de calcul du ratio hippocampe/cerveau  
chez la souris contrôle et IP**

Souris contrôle	Volume du cerveau (mm <sup>3</sup> )	Volume de l'hippocampe (mm <sup>3</sup> )	Ratio cerveau/hippocampe
C9	248,0	13,48	18,40
C31	257,1	14,77	17,41
C32	265,3	15,06	17,62
C34	237,3	16,52	14,36
C35	248,1	13,88	17,87
C44	255,3	13,53	18,87
C45	333,3	22,36	14,91
C46	292,9	20,54	14,26
C47	230,3	12,52	18,40
C48	248,2	13,52	18,36
<b>Moyenne</b>	<b>261,6 ± 30,4</b>	<b>15,6 ± 3,3</b>	<b>17,0 ± 1,8</b>

Souris IP	Volume du cerveau (mm <sup>3</sup> )	Volume de l'hippocampe (mm <sup>3</sup> )	Ratio cerveau/hippocampe
IP7	229,19	12,88	17,79
IP37	193,37	8,37	23,10
IP38	197,06	7,97	24,73
IP41	194,58	8,96	21,72
IP44	177,24	7,37	24,05
IP45	217,78	10,06	21,65
IP55	217,24	12,21	17,79
IP215	213,1	10,94	19,48
IP222	232,8	13,42	17,35
IP226	188,2	9,04	20,82
<b>Moyenne</b>	<b>206,1 ± 18,5</b>	<b>10,1 ± 2,1</b>	<b>20,8 ± 2,7</b>

**Annexe 4 :****Données de calcul du ratio (cerveau hors hippocampe)/hippocampe  
chez la souris contrôle et IP**

Souris IP	Volume du cerveau (mm <sup>3</sup> )	Volume de l'hippocampe (mm <sup>3</sup> )	Volume cérébral non hippocampal (mm <sup>3</sup> )	ratio cerveau hors hippocampe/hippocampe
IP7	229,19	12,88	216,31	16,79
IP37	193,37	8,37	185,00	22,10
IP38	197,06	7,97	189,09	23,73
IP41	194,58	8,96	185,62	20,72
IP44	177,24	7,37	169,87	23,05
IP45	217,78	10,06	207,72	20,65
IP55	217,24	12,21	205,03	16,79
IP215	213,1	10,94	202,20	18,48
IP222	232,8	13,42	219,38	16,35
IP226	188,2	9,04	179,17	19,82
<b>Moyenne</b>	206,1 ± 18,5	10,1 ± 2,1	195,9 ± 16,5	19,8 ± 2,7

Souris contrôle	Volume du cerveau (mm <sup>3</sup> )	Volume de l'hippocampe (mm <sup>3</sup> )	Volume cérébral non hippocampal (mm <sup>3</sup> )	ratio cerveau hors hippocampe/hippocampe
C9	248,0	13,48	234,52	17,40
C31	257,1	14,77	242,37	16,41
C32	265,3	15,06	250,26	16,62
C34	237,3	16,52	220,77	13,36
C35	248,1	13,88	234,17	16,87
C44	255,3	13,53	241,81	17,87
C45	333,3	22,36	310,98	13,91
C46	292,9	20,54	272,32	13,26
C47	230,3	12,52	217,81	17,40
C48	248,2	13,52	234,68	17,36
<b>Moyenne</b>	261,6 ± 30,4	15,6 ± 3,3	246,0 ± 27,5	16,0 ± 1,8

## **Annexe 5**

Article

**“IKK-related genetic diseases:  
probing NF- $\kappa$ B functions in humans and other matters”**

Senegas et al. (2015), CMLS. 72(7): 1275-87.



# *IKK-related genetic diseases: probing NF- $\kappa$ B functions in humans and other matters*

**Anna Senegas, Jérémie Gautheron, Alice Gentil Dit Maurin & Gilles Courtois**

**Cellular and Molecular Life Sciences**

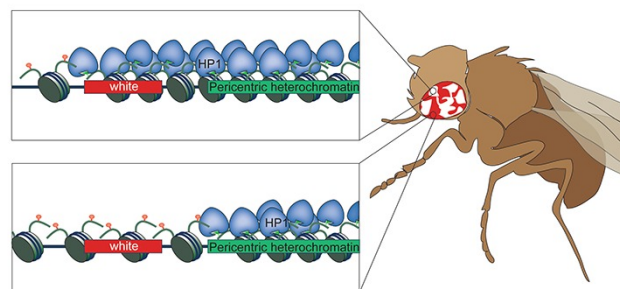
ISSN 1420-682X

Cell. Mol. Life Sci.

DOI 10.1007/s00018-014-1793-y

Cellular and  
Molecular  
Life Sciences

ONLINE  
FIRST



 Springer

 Springer

**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Basel. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# IKK-related genetic diseases: probing NF- $\kappa$ B functions in humans and other matters

Anna Senegas · Jérémie Gautheron ·  
Alice Gentil Dit Maurin · Gilles Courtois

Received: 10 July 2014 / Revised: 4 November 2014 / Accepted: 20 November 2014  
© Springer Basel 2014

**Abstract** The transcription factor NF- $\kappa$ B plays a key role in numerous physiological processes such as inflammation, immunity, cell proliferation or control of cell death. Its activation is tightly controlled by a kinase complex, I $\kappa$ B kinase (IKK), composed of three core proteins: IKK1/IKK $\alpha$ , IKK2/IKK $\beta$  and NEMO/IKK $\gamma$ . The first two are structurally related kinases whereas the third one is a regulatory subunit exhibiting affinity for upstream activators modified by polyubiquitin chains. Over the years, several inherited diseases caused by mutations of each of the three subunits of IKK have been identified in humans together with diseases caused by mutations of several of its substrates. They are associated with very specific and complex phenotypes involving a broad range of abnormalities such as impaired innate and acquired immune response, perturbed skin development and defects of the central nervous system. Here, we summarize the diverse clinical, cellular and molecular manifestations of IKK-related genetic diseases and show that studying patient-related mutations

affecting the IKK subunits and some of their substrates offers the opportunity to understand the various functions of NF- $\kappa$ B in humans, complementing studies performed with mouse models. This analysis also provides glimpses about putative functions of IKK subunits that may be NF- $\kappa$ B-independent.

**Keywords** NF- $\kappa$ B · IKK · Genetic diseases · Immunodeficiencies · Skin development

The standard procedure for dissecting signaling pathways through combined biochemical/structural analysis of their components and interrogation of their function(s) through genetic manipulations in model organisms such as mouse, zebrafish or drosophila has recently benefited from the development of powerful techniques that allow high-rate DNA sequencing of patients suffering from a wide range of inherited diseases. In several instances, this has provided a deeper view of the physiological role played by key proteins in these pathways and suggested strategies to correct their deregulated functions in humans. The case of the NF- $\kappa$ B pathway, which plays a critical role in immunity, inflammation and cell death and can be a direct cause or an amplification element of various pathological conditions, illustrates the interest of this combined approach.

A. Senegas and J. Gautheron contributed equally to this study.

Patients exhibiting NIK mutations have been identified by Willmann et al. (Nat Commun 5:5360, 2014. doi:10.1038/ncomms6360). They suffer from an immunodeficiency presenting similarities with the one observed in NFKB2 mutated patients but with more severe signs.

A. Senegas · A. G. D. Maurin · G. Courtois  
INSERM U1038, iRTSV, CEA Grenoble, Grenoble, France

A. Senegas · A. G. D. Maurin · G. Courtois (✉)  
Université Grenoble Alpes, Grenoble, France  
e-mail: gilles.courtois@inserm.fr

J. Gautheron  
Department of Gastroenterology, University Hospital RWTH  
Aachen, Aachen, Germany

## The NF- $\kappa$ B signaling pathway

NF- $\kappa$ B represents an evolutionarily conserved family of inducible transcription factors that controls a large set of physiological processes ranging from basic inflammatory responses and innate and acquired immunity to the regulation of cell death such as apoptosis, autophagy and senescence. In

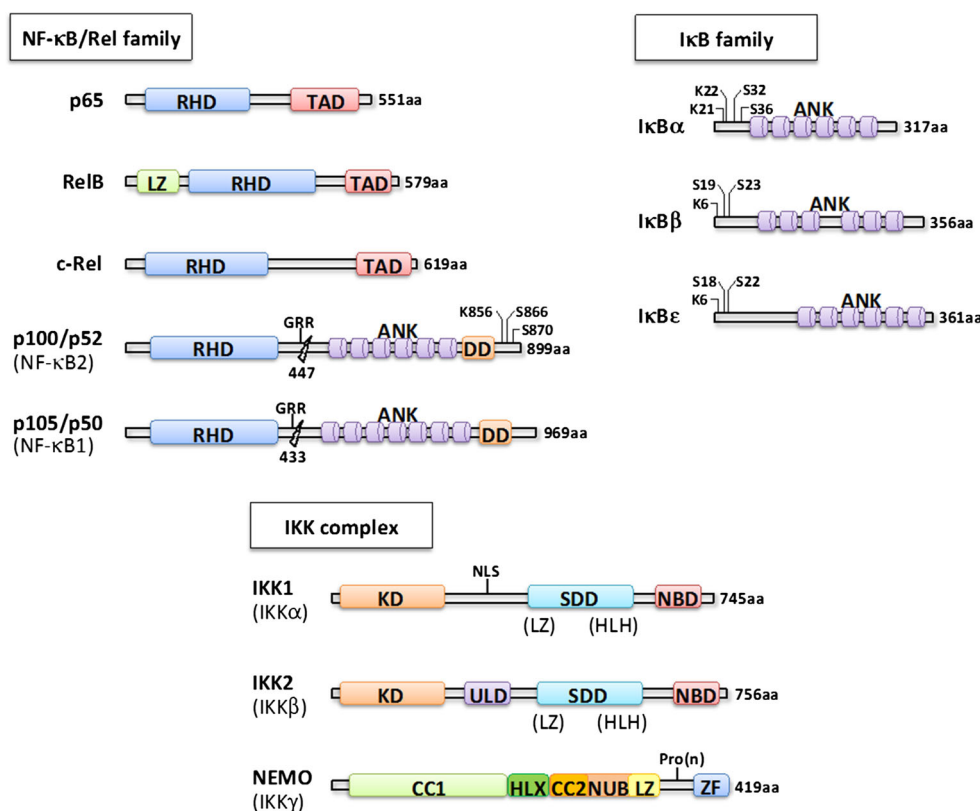
addition, NF- $\kappa$ B coordinates the expression of specific genes that mediates proliferation, cell adhesion and differentiation [1, 2]. The NF- $\kappa$ B family consists of NFKB1 (p50), NFKB2 (p52), RelA (p65), RelB and c-Rel proteins, which associate to form homo- or heterodimers (Fig. 1). The subunits p50 and p52 are synthesized as a p105 and p100 precursor protein, respectively. They undergo—constitutively or in a stimulus-dependent manner—a proteasome-mediated limited processing to yield the active form.

In resting cells, NF- $\kappa$ B is sequestered in the cytoplasm in an inactive state through the interaction with I $\kappa$ B inhibitors (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  and I $\kappa$ B $\epsilon$ ) (Fig. 1). Following activation, I $\kappa$ Bs are phosphorylated at conserved serine residues, then ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase SCF- $\beta$ TrCP and finally degraded by the proteasome, which in turn allows the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and thereby activation of its target genes. The kinase complex responsible for the phosphorylation of I $\kappa$ Bs has remained elusive for many years until the biochemical purification of a cytoplasmic high-molecular weight complex containing two serine/threonine kinases, IKK1 (IKK $\alpha$  or CHUK) and IKK2 (IKK $\beta$ ) [3] (Fig. 1). A third non-catalytic component called NEMO (IKK $\gamma$ ) was subsequently identified by complementation of an NF- $\kappa$ B-unresponsive cell line and by sequencing of IKK-associated polypeptides [3] (Fig. 1). Studies based on cell transfections and mouse gene ablation revealed that NF- $\kappa$ B can actually be activated by two

alternative signaling pathways. The canonical pathway is induced by a large variety of stimuli such as pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), bacterial products (LPS, peptidoglycan), viral proteins (Tax, LMP-1) or diverse forms of stress (UV, oxidative stress) and is strictly dependent on NEMO, which ensures the signal transmission from the receptor to the catalytic IKK2 subunit [2]. In most situations, IKK1 only mildly contribute to the overall kinase activity of IKK [4] but in the absence of IKK2 might help preserving low levels of NF- $\kappa$ B activation (see below). In contrast, the non-canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation is turned on by a restricted group of stimuli such as lymphotoxin- $\alpha/\beta$ , CD40L or BAFF and is independent on NEMO and IKK2 but specifically requires IKK1. In this case, the signaling complexes stabilize kinase NIK that phosphorylates IKK1, which in turn phosphorylates and marks p100 for C-terminal processing by the proteasome to generate p52-relB dimers. This non-canonical pathway appears to play a critical role in the development of lymphoid organs and mammary glands [5]. In addition, IKK1 is able to regulate NF- $\kappa$ B-dependent and -independent transcription through its nuclear localisation and ability to phosphorylate Ser10 of Histone H3 [6, 7].

This way of presenting the two distinct modes of NF- $\kappa$ B activation does not take into account the functional interplays that exist between them and their integration in a single module [8]. Indeed, it has been shown that several

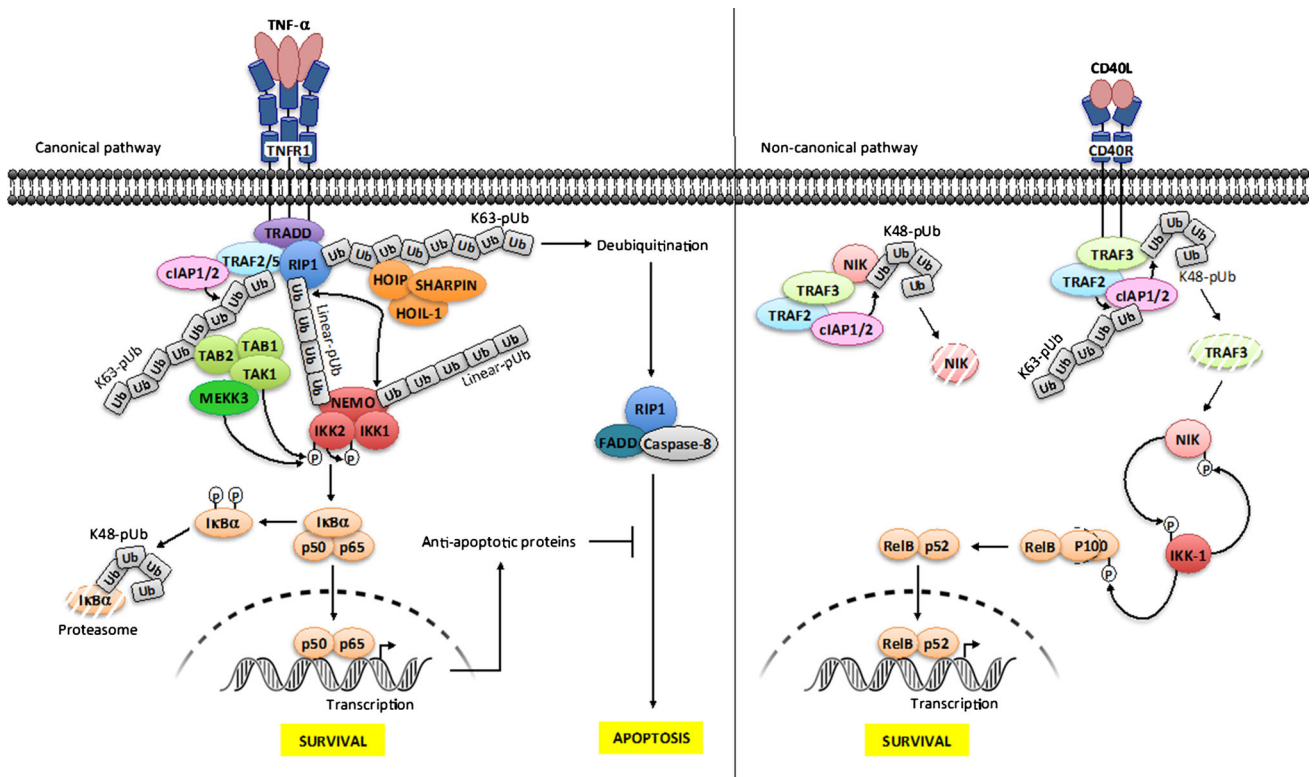
**Fig. 1** Components of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Alternative nomenclatures appear in *brackets*. The respective domains of each protein family are indicated with *RHD* REL homology domain, *TAD* transactivation domain, *LZ* leucine zipper, *GRR* glycine-rich region, *ANK* ankyrin repeat, *DD* death domain, *KD* kinase domain, *NLS* nuclear localization sequence, *SDD*  $\alpha$ -helical scaffold/dimerization domain, *HLH* helix-loop-helix, *CC* coiled coil, *HLX* helix, *NUB* NEMO ubiquitin binding, *Pro(n)* proline rich region, *ZF* zinc finger. Residues modified by phosphorylation or ubiquitination are also shown



receptors activating the non-canonical pathway can also activate the canonical one. Moreover, the expression or activity of several components of one pathway is controlled by the other. For instance, canonical NF- $\kappa$ B dimers regulate the transcription of *RELB* whose product is the main partner of p52, whereas I $\kappa$ B $\delta$ , which is derived from p100, provides a negative feedback on the canonical NF- $\kappa$ B signaling.

Although many signaling pathways can induce NF- $\kappa$ B activation, there is a sequence of common molecular events that leads to the activation of IKK. This sequence involves the modification of specific residues of NEMO by lys63- or

linear-linked polyubiquitin chains [9] (see Fig. 2 for the specific case of the TNF- $\alpha$  signaling pathway). In contrast to lys48-linked polyubiquitination, these linkages do not lead to proteasomal degradation but serve as binding sites for other molecules required for the activation of IKK. In addition, NEMO can also recognize lys63 and linear ubiquitin chains from a multitude of modified proteins [9]. This dual ability allows polyubiquitinated activators to be put in proximity to IKKs or to induce conformational change in the IKK complex. The non-canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation is also regulated by complex ubiquitination processes which result in stabilization of labile NIK,



**Fig. 2** Ubiquitination and phosphorylation processes in NF- $\kappa$ B signaling. Canonical NF- $\kappa$ B pathway/TNF-R1 receptor (*left panel*). The engagement of TNF- $\alpha$  on its cognate receptor induces the recruitment of the adapter TRADD, the E3 ligases cIAP1/2 and TRAF2 and the kinase RIP1. cIAP1/2 catalyze the formation of lys63-linked polyubiquitin (K63-pUb) chains on TRAF2/TRAF5 and RIP1. K63-pUb recruits on one hand the TAB 1–TAB 2–TAK1 kinase complex and on the other hand the LUBAC ligase complex (HOIP, HOIL-1 and SHARPIN), which catalyzes the formation of linear-linked polyubiquitin (linear-pUb) chains on RIP1. Linear-pUb is recognized by NEMO, allowing the recruitment of the IKK complex. TAK1 mediates the activation of IKK-2 by phosphorylation, allowing its auto-phosphorylation, which in turn enables IKK2 to phosphorylate I $\kappa$ B proteins, inducing their degradation by the proteasome and the release of active NF- $\kappa$ B. Another kinase, MEKK3 also participates in this process although its function is less understood. The ubiquitination of NEMO by LUBAC through linear-pUb might amplify NF- $\kappa$ B activation by recruiting more IKK complex. Shortly

after signal transmission deubiquitination of RIP1 also results in formation of a FADD-RIP1-Caspase-8 complex, which provokes apoptosis. This process is negatively regulated by a set of anti-apoptotic proteins whose transcription is under NF- $\kappa$ B control. Non-canonical NF- $\kappa$ B pathway/CD40 receptor (*right panel*). In basal condition, cIAP1/2 catalyzes the formation of lys48-linked polyubiquitin chains (K48-pUb) on NIK, leading to its constitutive degradation. Upon activation, TRAF2-TRAF3-cIAP1/2 complex is recruited to the receptor, allowing TRAF2 to ubiquitinate cIAP1/2 through K63-pUb. This modification on cIAP1/2 induces a switch on its K48 ubiquitin ligase activation from NIK to TRAF3. The consecutive degradation of TRAF3 allows the accumulation of newly synthesized NIK, which in turn phosphorylates IKK-1. Then, IKK-1 phosphorylates and marks p100 for processing through degradation, releasing RelB-p52 that translocates to the nucleus for gene activation. As a negative feedback loop, IKK-1 phosphorylates NIK for turning off its activity

allowing activation of IKK1 and processing of p100 (see Fig. 2 for the specific case of the CD40 signaling pathway).

The physiological roles of the various IKK components have been analyzed using a collection of KO mice. Mice deficient for IKK2 die during embryogenesis at E12.5–13.5 as a result of massive hepatic apoptosis [10] which emphasizes the essential role of IKK2 in the canonical activation of NF- $\kappa$ B. Upon crossing with *Tnfr1* KO mice, survival is observed, indicating that TNF- $\alpha$  is the inducer of liver apoptosis. Using conditional targeting of *Ikk2* in the mouse allowed to demonstrate the key function of IKK2 in immunity [11]. The same kind of lethality by hepatic apoptosis is observed at E12.5–E13 in male mice invalidated for the X-linked *Nemo* gene [12]. In contrast, *Nemo* +/– females survive and develop a dermatosis which mimics what is observed in humans (see below) [13, 14]. Mice lacking IKK1 survive until birth and do not present any signs of liver apoptosis. However, the mice have severe defects in epidermal differentiation and skeleton development [4, 15], which shows that besides NF- $\kappa$ B signaling pathways, IKK1 has diverse functions. The NF- $\kappa$ B family genes have also been knocked out. While *RelA* deficient mice are embryonic lethal at E15, again due to excessive liver apoptosis [16], mice lacking one of the other NF- $\kappa$ B subunits, such as p50, p52 or c-rel survive but present various immune defects due to abnormal T or B cell response [17].

## NF- $\kappa$ B-related genetic diseases

### NEMO-related genetic diseases

As the regulatory subunit of IKK, NEMO is absolutely required for proper activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway in response to a wide range of stimuli, as outlined above. Another key feature of this protein is the location of its encoding gene on the X-chromosome. The intricate consequences of these combined properties, a broad involvement of NEMO in many NF- $\kappa$ B-inducing pathways and an X-linkage, became apparent when patients displaying mutations of *NEMO* were identified. Here, we will only summarize the main characteristics of these diseases since recent reviews describing them in details can be found elsewhere [18, 19].

### Incontinentia pigmenti

Incontinentia pigmenti (IP, [MIM # 308300]), also known as Bloch–Sulzberger syndrome, is an X-linked dominant genodermatosis that is lethal for males before the second trimester of gestation [20]. In females, the inflammatory outbreak, which occurs within 2 weeks after birth, is the

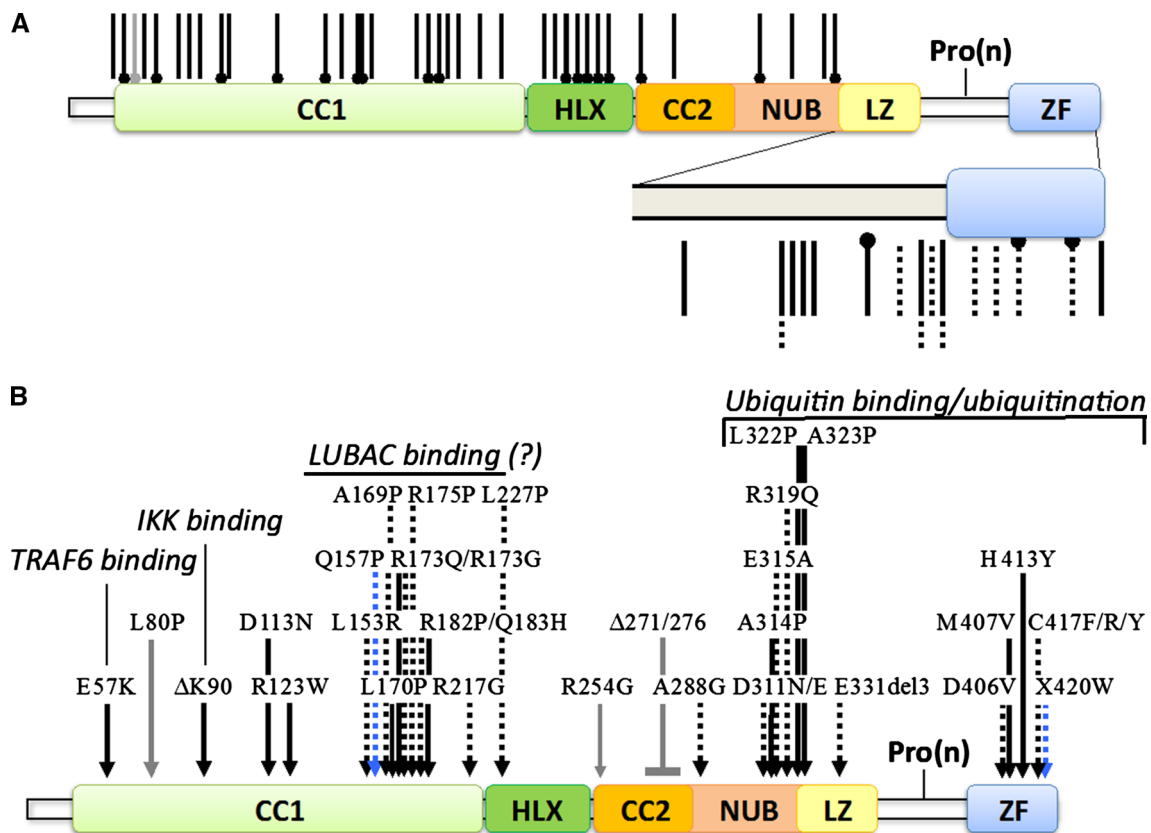
first phase of the disease with large dyskeratotic cells and intraepidermal spongiosis (vesicular stage). This stage is followed by hyperproliferation of keratinocytes in the epidermis with acanthosis and papillomatosis (verrucous stage). The third phase is characterized by an accumulation of melanocytes that produce pathologically high amounts of melanin (pigmented stage). The process is terminated by regression of the cutaneous lesions (atrophic stage), leaving behind hypopigmented areas and lack of eccrine glands. This complete process takes weeks or months but can restart following an infection during the rest of patient's life. It appears to be caused by cells expressing the mutated X-chromosome along the so-called Blaschko lines that are selectively eliminated around the time of birth.

Frequently this genodermatosis is accompanied by unilateral ophthalmological problems (foveal hypoplasia, retinal ischemia and strabismus) that are often highly debilitating. Indeed, ocular involvement persists during all the patient's life, in contrary to dermalogical symptoms that are attenuated over the years. These abnormalities are often associated with neurological involvement, which are present in 30 % of cases and characterized by psychomotor retardation, cerebellar ataxia, microcephaly, hemiplegia, epilepsy and intellectual impairment. A correlation between the severity of the ophthalmologic problem and the neurological phenotype might be due to vascular insufficiency caused by necrosis and ischemia.

With a prevalence of 33 %, hair changes are reported in IP patients like clairsement during infancy and mostly alopecia on the vertex or dull and brittleness hair in adulthood. Hyperplasia or absence of eyebrows and eyelashes may be observed. Finally, IP is a congenital factor of malocclusion and oligodontia. Patients may present hemifacial hypoplasia and delayed tooth eruption with conical teeth in 80 % of the IP cases. Dental features are quite similar in another disease called EDA-ID caused by *NEMO* mutations (see below).

Approximately 70 % of IP patients share the same genomic rearrangement that eliminates exons 4–10 of the *NEMO* gene [21]. This rearrangement involves a *NEMO* pseudogene that is located nearby and contains sequences highly similar to those of exons 4–10 of *NEMO*. In addition to this frequent recurrent rearrangement, the *NEMO* locus of IP patients can also present other kinds of rearrangements [22] and non-sense or frameshift mutations that severely truncate the protein or even rare missense mutations [19] (Fig. 3).

The lack of function of truncated and unstable NEMO protein in IP results in higher sensitivity of cells to TNF- $\alpha$  and increased apoptosis. This may explain why male patients do not survive during development if liver apoptosis occurs like in *Nemo* KO mice [12–14], something not formally demonstrated yet. In female, this clearly



**Fig. 3** NEMO mutations found in human diseases. **a** Truncating mutations. Non-sense mutations generating IP or EDA-ID are indicated by *dumbbell-shaped black* or *dotted bars*, respectively. Frameshift mutations generating IP or EDA-ID are indicated by *black* or *dumbbell-shaped bars*, respectively. An EDA-ID-linked N-terminal deletion resulting from a translational reinitiation is indicated by a

*gray dumbbell-shaped bar*. **b** Missense mutations and short deletions. IP-associated mutations are indicated by *black arrows*, EDA-ID-associated ones by *dotted arrows*, OL-EDA-ID-associated ones by *blue arrows* and ID-associated ones by *gray arrows*. The defined or putative molecular dysfunctions are also indicated. Mutations are compiled from [18, 21]

contributes to the dermatosis process and its resolution. Indeed, it has been proposed that the mosaic status of the neonatal skin/epidermis of IP females, composed of wild-type cells expressing NEMO and mutant cells lacking NEMO, is the trigger for the whole process [13]. Mutant cells, most likely keratinocytes, would start to overexpress pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  after birth, the reason why remaining uncertain [necrosis of some cells? Dysregulated adaptation to the (bacterial) environment at birth?...]. Production of IL-1 $\beta$  by mutant cells would induce TNF- $\alpha$  synthesis by neighboring wild-type cells, and TNF- $\alpha$  would in turn act back on mutant cells, inducing their death and clearance. This sequence of events may explain the final atrophic stage of IP dermatosis, linked to lesion disappearance. This model is based on what has been observed in mice exhibiting impaired NF- $\kappa$ B signaling in the skin, for instance by invalidating *Nemo* [23] or *Ikk2* [24] specifically in the epidermis. In this case, mice develop abnormalities similar to the ones observed in IP, with extensive inflammation and cell death, which can

be fully corrected by only inhibiting TNFR-1 signaling. Besides regulating cell death TNF- $\alpha$  may also have an additional pro-inflammatory function in the process. Indeed, it has been shown that, upon TNF- $\alpha$  exposure, upregulation of IL-19/24 in NF- $\kappa$ B-deficient keratinocytes results in STAT3 activation and cytokines/chemokines production [25].

#### X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency

Anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency [EDA-ID, (MIM # 300291)] is a rare syndrome affecting only males. It is characterized by impaired development of skin appendages (teeth, hair and sweat glands) and recurrent bacterial and viral infections [26–29].

On the EDA side, the development of tooth buds in EDA-ID patients frequently gives absent teeth and/or pointed teeth with enamel potentially defective whereas abnormalities of the hair follicles result in excessively thin

and sparse hair that may grow very slowly or sporadically. In addition, patients have often fragile and lightly pigmented skin and cannot perspire because of sweat glands dysfunctions or inactive proteins at this level. Therefore, the body cannot regulate temperature properly.

Combined to this EDA is a severe life-threatening immunodeficiency characterized by weak cell responses to IL-1 $\beta$ , IL-18, CD40 or lipopolysaccharide (LPS). The production of specific antibodies is defective, with decreased IgG and increased IgA synthesis, accompanied by hyper-IgM syndrome. These B cell defects may be linked to impaired co-stimulation by CD40 and are associated with T cell impairment and problem of NK cell activation, despite normal cell count and proper development [30]. Moreover, there is a defective interferon (IFN) synthesis resulting in reduced response to virus exposure [31].

EDA-ID is caused by hypomorphic *NEMO* mutations that allow male survival and cause negligible effects (very weak IP signs) in females [26–29]. In most cases, short truncations of the protein occur due to non-sense or frameshift mutation but missense mutations are also observed (Fig. 3). They often affect domains or sequences required for recognition of ubiquitin by NEMO but the activity of the protein is not completely impaired since this recognition involves two distinct portions of NEMO located at the C-terminus of NEMO (NEMO zinc finger) and in the middle of it (NEMO ubiquitin binding (NUB) domain), respectively [32].

The identification of *NEMO* mutations and associated impaired activation of NF- $\kappa$ B, as a cause of EDA has allowed identification of a new component playing a role of effector in the *eda*/EDAR pathway that had been previously identified through the genetic study of patients exhibiting pure EDA. In these studies, a ligand (ectodysplasin) working through its specific receptor (EDAR) and adaptor (EDARADD) had been demonstrated to be absolutely required for skin appendage development [33].

Another related pathology to EDA-ID, caused by the destabilizing addition of 27aa at the C-terminal of NEMO (mutation X420 W), has been reported [27]. It is called Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency, Osteopetrosis and Lymphedema [OL-EDA-ID, (MIM # 300301)]. The immunodeficiency syndrome presents similarities to the EDA-ID-related one but patients also display increased bone mass due to defective osteoclast function and lymphedema caused by impaired function of lymphatic vessels. This phenotype supports the idea that NF- $\kappa$ B plays an important role in skeletal development and demonstrated a new role for this transcription factor in lymphatic vessel physiology.

## Immunodeficiencies

Several cases of primary immunodeficiencies without associated EDA were also shown to be caused by missense mutations or short truncations of NEMO (NEMO ID) [34–37]. These male patients suffer from recurring infections, often *Mycobacteria* related, and some specific impaired cell responses are observed, such as reduced IL-12 synthesis in response to CD40. Upon close examination, very mild tooth abnormalities can also be detected in some patients. How those *NEMO* mutations, despite their similarities to the ones causing EDA-ID, generate a phenotype that does not include skin appendage abnormalities remains unclear. The simplest possibility would be that mild mutations of *NEMO* unable to affect the skin *eda*/EDAR signaling pathway are still able to perturb the few immune-related pathways that are the most sensitive to slightly reduced NF- $\kappa$ B activity and the *eda*/EDAR pathway responsible for tooth development.

## IKK1-related genetic disease (Cocoon syndrome)

IKK1 is one of the two catalytic subunits of IKK but in contrast to NEMO, which only play a very narrow range of functions outside of the NF- $\kappa$ B pathway, performs additional NF- $\kappa$ B-independent functions [38]. In addition, it has been shown very early on to be dispensable for full IKK catalytic activity, being an intrinsically weaker kinase than IKK-2. In contrast, it plays a unique role in the non-canonical NF- $\kappa$ B activation pathway (see above).

Two cases of fetal encasement malformations occurring in a consanguineous finnish family were recently reported to present some striking similarities with the phenotype of *Ikk1* KO mice [39]. Among the numerous abnormalities detected in the fetuses at 12–13 weeks of gestation were defective face, with an abnormal cyst in the cranial region and a large defect in the craniofacial area, an omphalocele and lobulation defect in the lungs. Poorly developed skeletal muscles were observed as well as seemingly absent limbs, which were bound to the trunk and encased under the skin.

This limb encasement being reminiscent of the phenotype observed after targeting IKK1 in the mouse convinced the authors to sequence the *IKBKA* gene in the two fetuses. An homozygous missense mutation, c.1264C—T, was detected in exon 12, generating a large truncation of IKK1 deleting its catalytic domain (aa 422–745) (Fig. 4). Actually, the overall expression of this deleted protein appeared strongly decreased, demonstrating its instability. Since a similar case was previously reported in the literature [40],



but not genetically characterized, and qualified as “Cocoon fetus” the term “Cocoon syndrome” has been proposed by Lahtela et al. [39] to be used for this IKK1-related inherited disease.

The molecular basis of the Cocoon syndrome remains poorly defined. In particular, it remains to be examined if the proposed effect of IKK1 as a repressor of FGF members in skeletal and craniofacial development [41] also operates in humans. Analyzing the transcriptome of F1 and F2, Lahtela et al. [39] demonstrated a severe reduction in numerous mRNAs. Among them, one coding for matrix metalloproteinase 14 (MMP-14) was present at only 5 % of the control. In contrast, the opposite was observed when studying the expression level of MMP-14. Since this enzyme plays an important role in skeletal development such aberrant regulation might also be involved in craniofacial and skeletal abnormalities.

How may this and other described abnormalities observed in the Cocoon syndrome relate to NF- $\kappa$ B? As previously demonstrated by Hu et al. [41], the peculiar skin phenotype resulting from IKK-1 lack of function is unlikely to directly result from a canonical IKK/NF- $\kappa$ B deregulation. Besides being very different from the one observed in incontinentia pigmenti, clearly caused by impaired NF- $\kappa$ B activation in the epidermis, it is also characterized by a lack of keratinocyte differentiation which can not be corrected by activating NF- $\kappa$ B. Actually, as a whole, the Cocoon syndrome displays several similarities with a limb pterygium syndrome (LPS) called lethal-type popliteal pterygium syndrome (LPPS)/Bartocas–Papas syndrome (BPS) (MIM # 263650) [42]. Interestingly, this specific syndrome has been demonstrated to be caused by mutations of *RIPK4* [43, 44], which codes for a member of the RIP kinase family originally proposed to be an NF- $\kappa$ B activator in PKC $\beta$ -dependent pathways [45, 46]. Nevertheless, the original data were obtained by performing overexpression experiments, which can often generate artefacts. Besides this putatively weak link between the main signs observed in *Ikk1* KO mice/Cocoon syndrome and the NF- $\kappa$ B signaling pathway other developmental pathways may be affected, involving both IKK1 and RIPK4, sequentially or in parallel. Among them is the p63 pathway, which appears deregulated in BPS [43], and the  $\beta$ -Catenin pathway which was recently shown to be regulated by RIPK4 [47]. Even in the case of a p63 involvement, an indirect link with NF- $\kappa$ B can not be formally excluded as isoforms of p63 have been shown to be activators of IKK1 in the epidermis and to interact with c-rel and relA, two members of the NF- $\kappa$ B family of transcription factors [48]. It remains, therefore, quite difficult to estimate which parts of Cocoon syndrome anomalies, if any, are NF- $\kappa$ B related, something complicated by the severity of the disease and its paucity.

Nevertheless, *Ikk1* KO mice being available a back and forth analysis between data issued from human samples and mice might be envisioned.

### IKK2-related genetic disease (IKK2 SCID)

As the kinase displaying the strongest catalytic activity within IKK, IKK2 is considered to be a key enzymatic element of this protein complex. Nevertheless, it has been shown that its absence in numerous cellular settings is not as detrimental in the canonical NF- $\kappa$ B activation process as the absence of NEMO. Indeed, residual IKK activation can still occur due to IKK1 being able to compensate to some extent the lack of IKK2 activity [13, 49].

A severe combined immunodeficiency (SCID) characterized by recurrent infections and hypogammaglobulinemia/agammaglobulinemia but normal T cell counts were recently identified in several individuals [50–53]. The first ones and the most extensively characterized presented a common genetic origin (Northern Cree ancestry), but no consanguinity [50]. Homozygosity mapping revealed a candidate 11.6 Mbp region on chromosome 8. After sequencing the 40 genes located at this locus only one was shown to exhibit in four distinct cases an homozygous duplication (c.1292dupG) in exon 13 of the gene encoding IKK2. This frameshift mutation was shown to produce a very unstable truncated IKK2 protein (Fig. 4), as revealed by Western blotting. Unexpectedly, the expression level of other IKK components, IKK1 and NEMO, appeared reduced also.

Several signaling pathways were shown to be affected by the lack of IKK2 when patient-derived cells were stimulated. Among the most perturbed pathways in fibroblasts were the ones responding to TNF- $\alpha$ , LPS (TLR4), flagellin (TLR5) or PMA. In contrast, the IL-1 signaling pathway appeared less impaired. As a consequence, target genes of NF- $\kappa$ B were differentially affected depending on the stimulus used and more or less sensitive to a lack of IKK2 activity.

Expression of activation markers such as CD25 and CD69 was reduced upon exposure of IKK2 SCID T cells to CD3/CD28 but proliferation of the cells was only mildly impaired. Indeed, if little response was observed to soluble or plate-bound anti-CD3 antibodies, Phytohemagglutinin mitogenic responses were moderately reduced as well as proliferation in response to CD3/CD28. One may, therefore, consider the overall activation capacity of T cells to be reduced to some extent but not abolished.

When patient-derived B cells were stimulated with CD40L and IL-21, which are usually provided by follicular helper T cell, they did not proliferate and differentiate into plasmablasts. In addition, they did not produce

immunoglobulins (Igs). In contrast, proliferation was still observed when induced by the B cell receptor or the cytosine–guanine dinucleotide polymer CpG, through TLR9, but Ig production was impaired.

In line with the severe phenotype of the patients and the signal transduction abnormalities described above, many immune defects were identified in situ. Although T and B cell development was not impaired many signs of their perturbed differentiation were observed. For instance,  $\gamma\delta$  T cells were absent and most CD4 and CD8 cells expressed naive antigens such as CD45RA or CD27 despite the exposure of patients to various germs. Absence of CD25<sup>high</sup>FOXP3+CD4+Tregs was also noted in two patients. B cells were almost exclusively naive, with a normal proportion of CD38+IGM+ transitional cells and a lack of CD27+ IGD– class-switched memory cells and CD38+ CD20– plasmablasts. In addition, activation of NK cells appeared deficient.

Surprisingly, no EDA was observed in these IKK2 SCID patients whereas this is a feature of patients displaying hypomorphic *NEMO* mutations (see above) and autosomal dominant *IKBA* mutations (see below). This suggests that IKK2 is dispensable for skin appendage development. Most likely, the catalytic activity of IKK1 is sufficient to compensate for the absence of IKK2 catalytic activity in this setting.

Most of the abnormalities observed in patients carrying an homozygous nucleotide duplication in *IKBKB* were also recently found in other patients displaying mutations in the same locus [51–53]. An homozygous non-sense mutation in *IKBKB* (R286X) resulting in truncation of IKK2 (Fig. 4) induced a lack of its expression [51]. The level of NEMO was also decreased confirming the observation made by Pannicke et al. [50]. Defective activation of T, B and NK cells was detected, associated with the absence of memory B cells, accumulation of CD45RA+ T cells and low number of Tregs. A similar clinical and cellular picture was reported for other non-sense mutations (Y107X and R272X) leading to IKK2 truncation (Fig. 4) [52, 53]. In all these cases, no obvious signs of EDA were observed confirming the negligible role of IKK2 in skin adnexal development. The only major discrepancy reported by these different studies concerns the reduction in NEMO amount, which was observed by Pannicke et al. [50] and Mousallem et al. [51], and in IKK1 amount reported by Pannicke et al. [50], but were not confirmed by Nielsen et al. [53]. The reason for these differences is puzzling since all four reported mutations result in the same lack of IKK2 expression.

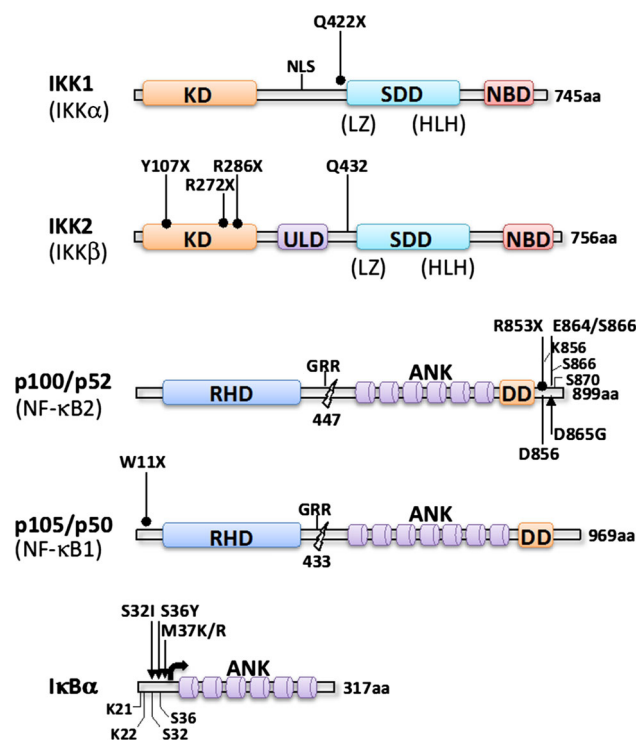
## Genetic diseases caused by mutations of IKK substrates

I $\kappa$ B $\alpha$ -related genetic disease (autosomal-dependent EDA-ID)

As shown above, EDA-ID can be caused by hypomorphic mutations of *NEMO*. Another component of the NF- $\kappa$ B signaling pathway that can generate EDA-ID when mutated is I $\kappa$ B $\alpha$ . In several instances, heterozygous mutations of I $\kappa$ B $\alpha$  impairing its degradation by IKK have been reported to cause a syndrome that shares many clinical similarities with *NEMO*-linked EDA-ID [54–61] [autosomal-dominant (AD) EDA-ID, (MIM # 612132)]. So far, all these mutations affect the Ser residues (Ser32, Ser36) that are phosphorylated by IKK upon cell stimulation [54–56], the residues nearby the DSGLDS phosphorylation motif, such as Met37 [57, 58], or delete the N-terminus of I $\kappa$ B $\alpha$  (Q9X, W11X, E14X), reinitiation of translation occurring at Met37 and thus eliminating the phospho-acceptor sites [59–61] (Fig. 4). Because of this lack of phosphorylation, I $\kappa$ B can not be degraded and acts as a dominant negative protein by accumulating and sequestering NF- $\kappa$ B species such as relA, c-rel or p50 in the cytoplasm. This explains why an heterozygous mode of genetic transmission is sufficient enough to trigger the disease.

Mutations of both *NEMO* and *I $\kappa$ B $\alpha$*  as a cause of EDA-ID in humans confirm in vivo the participation of these two components in the same signaling pathways. Nevertheless, how NF- $\kappa$ B signaling is impaired in each case is biochemically quite distinct. In *NEMO*-mutated patients generating EDA-ID the overall catalytic activity of IKK is reduced but not abolished. Therefore, the various substrates of IKK, among them the members of the I $\kappa$ B family of inhibitors, are putatively similarly affected. In the case of mutations affecting I $\kappa$ B $\alpha$ , degradation of the other I $\kappa$ B inhibitors is still properly controlled. The similitude between *NEMO*- and *I $\kappa$ B $\alpha$* -related EDA-IDs indicates that I $\kappa$ B $\alpha$  is indeed a prime target of IKK in many distinct tissues, among them the hematopoietic compartment and the skin appendages. It also confirms that its function in controlling the activity of specific NF- $\kappa$ B subunits can not be overcome by other properly regulated I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B complexes.

Because of the severity of EDA-ID, caused by either *IKBA* or *NEMO* mutations, treating those patients with allogenic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) represents a therapeutic option. In several cases, caused by *IKBA* mutations, HSCT was shown to allow a full recovery of immune functions [62]. In a more severe case caused



**Fig. 4** IKK- and IKK substrates-related mutations found in human diseases. Non-sense mutations are indicated by *dumbbell-shaped black bars*, frameshift mutations by *black bars* and missense mutations by *black arrows*. An N-terminal deletion of IκBα resulting from a translational reinitiation at Met37 is indicated by a *bracketed arrow*

by a *NEMO* mutation, this approach was unfortunately not successful [63].

**NF-κB1-related genetic disease**

It has been recently reported the description of a patient exhibiting bone and joints defects, ectodermal dysplasia, hypergammaglobulinemia and sterile inflammation [64]. Upon DNA sequencing, an heterozygous mutation was detected in *NFKB1*, the gene encoding p105, the precursor of the NF-κB p50 subunit (Fig. 4). Since this mutation introduces a stop codon (W11E) at the beginning of the coding sequence of p105, a 50 % reduced expression of this protein can be predicted. How such reduction in p105 expression may generate such complex-associated phenotype remains uncertain and will require the characterization of additional patients.

**NF-κB2-related genetic disease (NF-κB2-CVID)**

Common variable immunodeficiency [CVID, (MIM # 607594)], which occurs in approximately 1:10,000–1:50,000

people, is a clinically and genetically heterogeneous disorder characterized by hypogammaglobulinemia with poor response to antigens [65]. It can be caused by mutations affecting many genes coding for proteins regulating peripheral or terminal B cell development. For instance, 8–10 % of CVID patients have been identified with homozygous and heterozygous variants in *TNFRSF13B* and 1–2 % of individuals harbor variants in *ICOS*.

Recently, four cases (out of 37) from two distinct families were shown to exhibit after exome sequencing heterozygous mutations of *NFKB2*, the gene encoding p100 [66] (Fig. 4). In each situation, the mutations generated short C-terminal truncations of p100 at aa 852 or 854, respectively. Importantly, this short truncation was large enough to eliminate not only Serine residues S866 and S870, but also Lysine residue K856 which are all essentials for processing of p100 to p52. Indeed, S866 and S870 are phosphorylation sites for IKK1 which are then required to trigger ubiquitination at K856 and recognition by the proteasome [5]. A lack of p100 processing was demonstrated using EBV-transformed B lymphocytes derived from three *NFKB2* mutated patients. In all cases, a shorter form of p100 was detected below the full-length p100, as expected from their heterozygous status, and production of p52 appeared reduced by half. As a consequence, nuclear translocation of p52 was impaired.

Like other CVID patients, *NFKB2*-mutated patients exhibited markedly reduced levels of serum immunoglobulins, including low IgG levels, and poor response to antigens but normal levels of circulating B cells. They suffered from recurrent infections (viral respiratory infections, pneumonia, sinusitis, etc.) and asthma. Interestingly, they also suffered of alopecia areata and central adrenal insufficiency (ACTH and cortisol deficiency). Since this latter abnormality is an unusual feature of CVID its intriguing link to p100/NF-κB will require further investigation. Chen et al. [66] have proposed that alterations in thymic AIRE expression may result in aberrant T cell-mediated self-tolerance of endocrine-related organs.

More recently, other patients displaying heterozygous *NFKB2* mutations impairing p52 production were identified [67–69], allowing a more comprehensive view of this subtype of CVID. Besides confirming a recurrent specific impairment of B cell functions and auto-immunity (alopecia areata and/or central adrenal insufficiency) they also suggested a putative phenotype heterogeneity which might be due to an indirect effect of specific *NFKB2* mutations on the canonical pathway of NF-κB activation in addition to the non-canonical one. For instance, it has been proposed that full-length proteins exhibiting missense mutations, such as D865G, may behave like IκB-like molecules, also acting on the canonical pathway of NF-κB activation and impairing B cell development in addition to B cell function

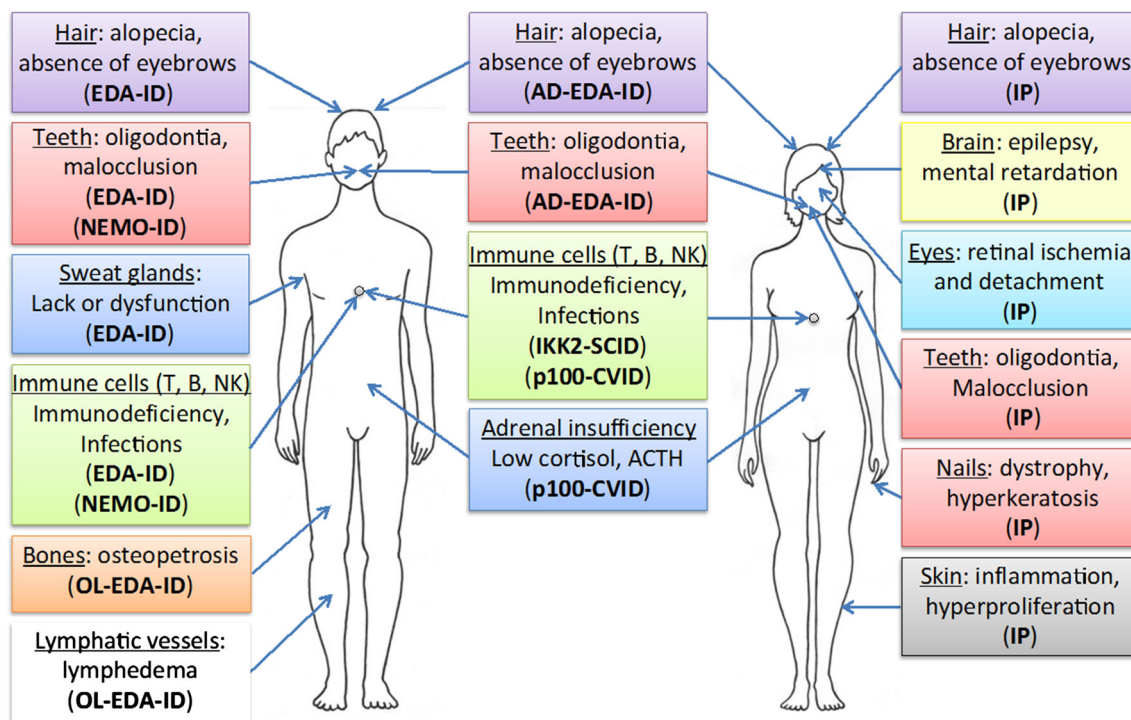
[69]. Therefore, a complex genetic basis mixing haploinsufficiency and autosomal dominant effects is at the origin of *NFKB2*-related CVIDs.

**Conclusion**

Many lessons can be drawn from the NF-κB data originating from human genetics (Fig. 5). First of all, experts in the NF-κB field will recognize their favorite pathway and its main associated features. Among them are numerous immune defects resulting from NF-κB impairment and impact on the inflammatory process, even if not necessary in the expected sense. In addition, the respective role of each IKK subunit appears to be confirmed with NEMO playing a critical role in the IKK/NF-κB activation process, IKK2 performing a key function in the canonical pathways and IKK1 having its own social life, NF-κB-dependent and independent. Even at the level of IκBs and IκB-like molecules predicted features, mostly immune related, are observed. Finally, the phenotypes caused by NF-κB-related diseases in humans are grossly similar to the ones observed with KO mice.

The clinical investigation of these diseases has nevertheless provided additional info regarding the NF-κB pathway, sometimes unpredicted ones. As said above, the

X-linkage of *NEMO*, which was not originally considered when studying this protein in individual cells, has a critical impact on NEMO-related diseases and explain their complexity. This provides a unique opportunity to see how a mutated cell interacts with its wild-type environment, something especially striking for the IP dermatosis but which might also apply to the CNS abnormalities found in a fraction of IP patients. Moreover, the identification in EDA-ID of an unpredicted ectodermal anhidrotic dysplasia, associated with a much more predictable immunodeficiency, has provided the first demonstration that NF-κB was also playing a key role in skin appendage development. Only, when *Traf6* KO mice were subsequently re-analyzed, such connection with NF-κB was confirmed [70]. Discovery of a severe form of EDA-ID, OL-EDA-ID, has revealed for the first time that NF-κB participates in lymphatic vessels function. More recently, the unexpected occurrence of central adrenal insufficiency in CVID patients exhibiting *NFKB2* mutations has also demonstrated how informative the identification and study of NF-κB-deficient patients can be. Interestingly, this kind of abnormality has also been reported for one patient exhibiting an *IKBA* mutation [58], demonstrating that comparing the clinical features of distinct NF-κB-related genetic diseases may also be useful.



**Fig. 5** Main clinical features of IKK-related genetic diseases Various abnormalities found in males vs females are listed with their associated disease (see text for details). The Cocoon syndrome caused by IKK-1 mutation is not presented given its severity leading

to early fetus death. In addition, the anomalies of a putatively complex syndrome resulting from an *NFKB1* mutation found in only one patient are not represented

In addition to allowing discovery of new functions of NF- $\kappa$ B, the study of NF- $\kappa$ B-related genetic diseases is also informative for assessing the degree of similarity that exists in the NF- $\kappa$ B signaling pathway between human and mouse, the usual organismal system used to dissect this pathway. Although it appears quite high, as noted above, differences exist and are worth noting. For instance, it is clearly established that a lack of NF- $\kappa$ B activity during mouse development results in liver apoptosis at E12-E14 and that TNF- $\alpha$  is the triggering factor for cell death [16]. This explains the disappearance of males *Nemo* KO and *Ikk2* KO embryos during embryogenesis. The situation appears different in humans. So far, no explanation has been provided for the early death of males fetuses suffering from IP before the second trimester, leaving the question open. More surprisingly, IKK2 SCID patients develop normally despite a demonstrated lack of IKK2 protein. Whether this reflects a simple difference in sensitivity of the hepatocytes to TNF- $\alpha$  during mouse versus human development or a true difference in functions of NF- $\kappa$ B during embryogenesis between these two organisms remains to be established.

Another example of distinct phenotypic consequence of impaired NF- $\kappa$ B signaling between humans and mice has been noticed by Pannicke et al. [50] and concerns  $\gamma\delta$  T cells which were shown to be absent in IKK2 SCID patients.

In summary, the discovery and analysis of genetic diseases caused by mutation of NF- $\kappa$ B components nicely complements the study of this pathway done using standard biochemical and genetical analysis. Given the importance of the NF- $\kappa$ B pathway in numerous physiological processes and its frequent deregulation in pathology, refinement of its characterization in the human context is likely to have an important impact on basic knowledge of NF- $\kappa$ B functions but also repercussions in the clinic.

**Acknowledgments** A.S is supported by a CEA/IRTELIS grant. We thank C. Gautheron for expert artwork and Incontinentia Pigmenti France for support.

## References

- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621–663
- Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* 132(3):344–362
- Hinz M, Scheidereit C (2014) The I $\kappa$ B kinase complex in NF- $\kappa$ B regulation and beyond. *EMBO Rep* 15(1):46–61
- Hu Y, Baud V, Delhase M et al (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK $\alpha$  subunit of I $\kappa$ B kinase. *Science* 284(5412):316–320
- Sun SC (2011) Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res* 21(1):71–85
- Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S et al (2003) Histone H3 phosphorylation by IKK- $\alpha$  is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423:655–659
- Anest V, Hanson JL, Cogswell PC et al (2003) A nucleosomal function for I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  in NF- $\kappa$ B-dependent gene expression. *Nature* 423:659–663
- Shih VF, Tsui R, Caldwell A et al (2011) A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* 21:86–102
- Iwai K (2014) Diverse roles of the ubiquitin system in NF- $\kappa$ B activation. *Biochim Biophys Acta* 1843(1):129–136
- Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F et al (1999) Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science* 284(5412):321–325
- Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M (2006) Dissection of the NF- $\kappa$ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* 13(5):861–872
- Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A et al (2000) Severe liver degeneration and lack of NF- $\kappa$ B activation in NEMO/IKK $\gamma$ -deficient mice. *Genes Dev* 14:854–862
- Makris C, Godfrey VL, Krähn-Senftleben G et al (2000) Female mice heterozygous for IKK $\gamma$ /NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5(6):969–979
- Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G et al (2000) NEMO/IKK  $\gamma$ -deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5(6):981–992
- Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T et al (1999) Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK $\alpha$ . *Science* 284(5412):313–316
- Beg AA, Baltimore D (1996) An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science* 274(5288):782–784
- Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R et al (2006) Unravelling the complexities of the NF- $\kappa$ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25(51):6781–6799
- Sebban H, Courtois G (2006) NF- $\kappa$ B and inflammation in genetic disease. *Biochem Pharmacol* 72(9):1153–1160
- Courtois G, Israël A (2011) IKK regulation and human genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* 349:73–95
- Landy SJ, Donnai D (1993) Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J Med Genet* 30(1):53–59
- Smahi A, Courtois G, Vabres P et al (2000) Genomic rearrangement in NEMO impairs NF- $\kappa$ B activation and is a cause of incontinentia pigmenti. *Nature* 405(6785):466–472
- Conte MI, Pescatore A, Paciolla M et al (2014) Insight into IKBKG/NEMO locus: report of new mutations and complex genomic rearrangements leading to incontinentia pigmenti disease. *Hum Mutat* 35:165–177
- Nenci A, Huth M, Funteh A et al (2006) Skin lesion development in a mouse model of incontinentia pigmenti is triggered by NEMO deficiency in epidermal keratinocytes and requires TNF signaling. *Hum Mol Genet* 15:531–542
- Pasparakis M, Courtois G, Hafner M et al (2002) TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417:861–866
- Kumari S, Bonnet MC, Ulvmar MH et al (2013) Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice. *Immunity* 39:899–911
- Zonana J, Elder ME, Schneider LC et al (2000) A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK- $\gamma$  (NEMO). *Am J Hum Genet* 67(6):1555–1562
- Döffinger R, Smahi A, Bessia C et al (2001) X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- $\kappa$ B signaling. *Nat Genet* 27(3):277–285

28. Jain A, Ma CA, Liu S et al (2001) Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol* 2(3):223–228
29. Aradhya S, Courtois G, Rajkovic A et al (2001) Atypical forms of incontinentia pigmenti in male individuals result from mutations of a cytosine tract in exon 10 of NEMO (IKK- $\gamma$ ). *Am J Hum Genet* 68(3):765–771
30. Orange JS, Brodeur SR, Jain A et al (2002) Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK- $\gamma$ /NEMO mutations. *J Clin Invest* 109(11):1501–1509
31. Zhao T, Yang L, Sun Q et al (2007) The NEMO adaptor bridges the nuclear factor- $\kappa$ B and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* 8:592–600
32. Gautheron J, Courtois G (2010) “Without Ub I am nothing”: NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF- $\kappa$ B activation. *Cell Mol Life Sci* 67(18):3101–3113
33. Mikkola ML (2009) Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A* 149A(9):2031–2036
34. Niehues T, Reichenbach J, Neubert J et al (2004) Nuclear factor  $\kappa$ B essential modulator-deficient child with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 114:1456–1462
35. Orange JS, Levy O, Brodeur SR et al (2004) Human nuclear factor  $\kappa$ B essential modulator mutation can result in immunodeficiency without ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 114:650–656
36. Mooster JL, Cancrini C, Simonetti A et al (2010) Immune deficiency caused by impaired expression of nuclear factor- $\kappa$ B essential modifier (NEMO) because of a mutation in the 5' untranslated region of the NEMO gene. *J Allergy Clin Immunol* 126:127–132
37. Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH et al (2006) X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med* 203:1745–1759
38. Huang WC, Hung MC (2013) Beyond NF- $\kappa$ B activation: nuclear functions of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ . *J Biomed Sci* 20:3
39. Lahtela J, Nousiainen HO, Stefanovic V et al (2010) Mutant CHUK and severe fetal encasement malformation. *N Engl J Med* 363(17):1631–1637
40. Stevenson RE, Saul RA, Collins J et al (1987) Cocoon fetus—fetal encasement secondary to ectodermal dysplasia. *Proc Greenwood Genet Center* 6:10–15
41. Hu Y, Baud V, Oga T et al (2001) IKK $\alpha$  controls formation of the epidermis independently of NF- $\kappa$ B. *Nature* 410(6829):710–714
42. Bartsocas CS, Papas CV (1972) Popliteal pterygium syndrome. Evidence for a severe autosomal recessive form. *Med Genet* 9:222–226
43. Mitchell K, O'Sullivan J, Missero C et al (2012) Exome sequence identifies RIPK4 as the Bartsocas-Papas syndrome locus. *Am J Hum Genet* 90(1):69–75
44. Kalay E, Sezgin O, Chellappa V et al (2012) Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome. *Am J Hum Genet* 90(1):76–85
45. Meylan E, Martinon F, Thome M et al (2002) RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF- $\kappa$ B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 3(12):1201–1208
46. Cariappa A, Chen L, Haider K et al (2003) A catalytically inactive form of protein kinase C-associated kinase/receptor interacting protein 4, a protein kinase C beta-associated kinase that mediates NF- $\kappa$ B activation, interferes with early B cell development. *J Immunol* 171:1875–1880
47. Huang X, McGann JC, Liu BY et al (2013) Phosphorylation of Dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling. *Science* 339(6126):1441–1445
48. Yang X, Lu H, Yan B, Romano RA et al (2011)  $\Delta$ Np63 versatilely regulates a broad NF- $\kappa$ B gene program and promotes squamous epithelial proliferation, migration, and inflammation. *Cancer Res* 71(10):3688–3700
49. Schmidt-Supprian M, Courtois G, Tian J et al (2003) Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19:377–389
50. Pannicke U, Baumann B, Fuchs S et al (2013) Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *N Engl J Med* 369(26):2504–2514
51. Mousallem T, Yang J, Urban TJ et al (2014) A nonsense mutation in IKBKB causes combined immunodeficiency. *Blood* 124:2046–2050
52. Burns SO, Plagnol V, Gutierrez BM et al (2014) Immunodeficiency and disseminated mycobacterial infection associated with homozygous nonsense mutation of IKK $\beta$ . *J Allergy Clin Immunol* 134:215–218
53. Nielsen C, Jakobsen MA, Larsen MJ et al (2014) Immunodeficiency associated with a nonsense mutation of IKBKB. *J Clin Immunol* (Epub ahead of print)
54. Courtois G, Smahi A, Reichenbach J et al (2003) A hypermorphic I $\kappa$ B $\alpha$  mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 112(7):1108–1115
55. Janssen R, van Wengen A, Hoeve MA et al (2004) The same I $\kappa$ B $\alpha$  mutation in two related individuals leads to completely different clinical syndromes. *J Exp Med* 200(5):559–568
56. Yoshioka T, Nishikomori R, Hara J et al (2013) Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a novel NFKBIA mutation, p.Ser36Tyr, presents with mild ectodermal dysplasia and non-infectious systemic inflammation. *J Clin Immunol* 33:1165–1174
57. Giancane G, Ferrari S, Carsetti R et al (2013) Anhidrotic ectodermal dysplasia: a new mutation. *J Allergy Clin Immunol* 132(6):1451–1453
58. Schimke LF, Rieber N, Rylaarsdam S et al (2013) A novel gain-of-function IKBA mutation underlies ectodermal dysplasia with immunodeficiency and polyendocrinopathy. *J Clin Immunol* 33(6):1088–1099
59. Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T et al (2012) A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 129:578–580
60. McDonald DR, Mooster JL, Reddy M et al (2007) Heterozygous N-terminal deletion of I $\kappa$ B $\alpha$  results in functional nuclear factor  $\kappa$ B haploinsufficiency, ectodermal dysplasia, and immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 120(4):900–907
61. Lopez-Granados E, Keenan JE, Kinney MC et al (2008) A novel mutation in NFKBIA/IKBA results in a degradation-resistant N-truncated protein and is associated with ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Hum Mutat* 29:861–868
62. Kawai T, Nishikomori R, Heike T (2012) Diagnosis and treatment in anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Allergol Int* 61:207–217
63. Dupuis-Girod S, Corradini N, Hadj-Rabia S et al (2002) Osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia, and immunodeficiency in a boy and incontinentia pigmenti in his mother. *Pediatrics* 109(6):e97
64. Oberle EJ, Verbsky JW, Routes J et al (2014) A172: metaphyseal chondrodysplasia, ectodermal dysplasia, short stature, hypergammaglobulinemia, and spontaneous inflammation without infections in an extended family due to mutation in NFKB1A. *Arthritis Rheumatol* 66(Suppl 11):S224–S225
65. Cunningham-Rundles C, Bodian C (1999) Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 92(1):34–48

66. Chen K, Coonrod EM, Kumánovics A et al (2013) Germline mutations in NFKB2 implicate the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 93(5):812–824
67. Liu Y, Hanson S, Gurugama P et al (2014) Novel NFKB2 Mutation in early-onset CVID. *J Clin Immunol* 34:686–690
68. Lindsley AW, Qian Y, Valencia CA et al (2014) Combined immune deficiency in a patient with a novel NFKB2 mutation. *J Clin Immunol* (Epub ahead of print)
69. Lee CE, Fulcher DA, Whittle B et al (2014) Autosomal dominant B cell deficiency with alopecia due to a mutation in NFKB2 that results in non-processible p100. *Blood*. pii: blood-2014-06-578542
70. Naito A, Yoshida H, Nishioka E et al (2002) TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(13):8766–8771

# **Annexe 6**

Livre

“NF-κB-Related Genetic Diseases”

Courtois *et al.* (2016), SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology





6 Gilles Courtois · Alessandra Pescatore  
7 Jérémie Gautheron · Francesca Fusco  
8 Matilde Valeria Ursini · Anna Senegas

9 NF- $\kappa$ B-Related Genetic  
10 Diseases  
11





Author Proof

29 Gilles Courtois  
30 CEA Grenoble  
36 INSERM U1038/iRTSV  
32 Grenoble  
38 France

Francesca Fusco  
International Institute of Genetics  
and Biophysics—CNR  
Naples  
Italy

39 Alessandra Pescatore  
30 International Institute of Genetics  
36 and Biophysics—CNR  
32 Naples  
38 Italy

Matilde Valeria Ursini  
International Institute of Genetics  
and Biophysics—CNR  
Naples  
Italy

39 Jérémie Gautheron  
30 Department of Gastroenterology  
36 University Hospital RWTH Aachen  
42 Aachen  
38 Germany

Anna Senegas  
CEA Grenoble  
INSERM U1038/iRTSV  
Grenoble  
France

47

48 ISSN 2211-9353 ISSN 2211-9361 (electronic)  
50 SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology  
52 ISBN 978-3-319-25848-5 ISBN 978-3-319-25850-8 (eBook)  
53 DOI 10.1007/978-3-319-25850-8  
54

55 Library of Congress Control Number: 2015959918

56 © The Author(s) 2016

57 This work is subject to copyright. All rights are reserved by the Publisher, whether the whole or part  
58 of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations,  
59 recitation, broadcasting, reproduction on microfilms or in any other physical way, and transmission  
60 or information storage and retrieval, electronic adaptation, computer software, or by similar or  
61 dissimilar methodology now known or hereafter developed.

62 The use of general descriptive names, registered names, trademarks, service marks, etc. in this  
63 publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt  
64 from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

65 The publisher, the authors and the editors are safe to assume that the advice and information in this  
66 book are believed to be true and accurate at the date of publication. Neither the publisher nor the  
67 authors or the editors give a warranty, express or implied, with respect to the material contained  
68 herein or for any errors or omissions that may have been made.

69 Printed on acid-free paper

70

71 This Springer imprint is published by Springer

72 The registered company is Springer International Publishing AG Switzerland



# Chapter 2

## Genetic Diseases Affecting the Canonical Pathway of NF- $\kappa$ B Activation

Gilles Courtois, Alessandra Pescatore, Francesca Fusco, Matilde Valeria Ursini and Anna Senegas

**Abstract** The IKK complex represents the core component of the canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation. Any mutation affecting it should therefore impact on NF- $\kappa$ B signaling to some extent. Nevertheless, since IKK-1 and IKK-2 have also been shown to play NF- $\kappa$ B-independent functions, those functions may be affected as well, complicating the picture. Generating further complexity is the location of *NEMO* on the X-chromosome that can cause Lyonization-related effects. Over the years, all this predictable intricacy has been confirmed with the discovery of a set of seemingly disparate pathologies, complemented with pathologies caused by mutations of NF- $\kappa$ B subunits regulating exclusively the canonical pathway. They allowed to confirm the essential role of canonical NF- $\kappa$ B activation in innate and acquired immunity or inflammation but also revealed new functions of this pathway.

**Keywords** ■■■

### 2.1 NEMO-Related Genetic Diseases

NEMO is the regulatory subunit of IKK that allows, though its affinity to polyubiquitinated chains, recruitment of upstream activators and IKK catalytic activation (see Chap. 1). In cells, devoid of NEMO activation of NF- $\kappa$ B through the canonical pathway is abolished.

#### 2.1.1 *Incontinentia Pigmenti*

##### 2.1.1.1 Clinical Features

Incontinentia pigmenti (IP) (OMIM # 308300) is an X-linked genetic disease that is lethal in males early during development, usually before the second trimester [1, 2]. In females, because of the X-inactivation process mitigating the genetic defect, the

pathology is much more complex and highly variable in presentation. The common feature of the disease is a severe dermatosis that usually starts within two weeks after birth and follows a specific course that covers months/years and can be divided in four distinct, but sometimes overlapping, stages. First, patients exhibit skin blisters and an inflammatory response, accompanied by a massive eosinophilic granulocytes infiltration into the epidermis (Stage I/vesicular stage). Subsequently, verrucous hyperkeratotic lesions develop (Stage II/verrucous stage) then disappear over time, leaving behind areas of hyperpigmentation due to melanin accumulation (Stage III/hyperpigmented stage). These areas that follow the lines of Blaschko [3] usually vanish by the second decade (Stage IV/atrophic stage), but adults may still exhibit areas of dermal scarring with lack of hair follicle. As will be explained below, this set of events can sometimes re-occur later during lifetime.

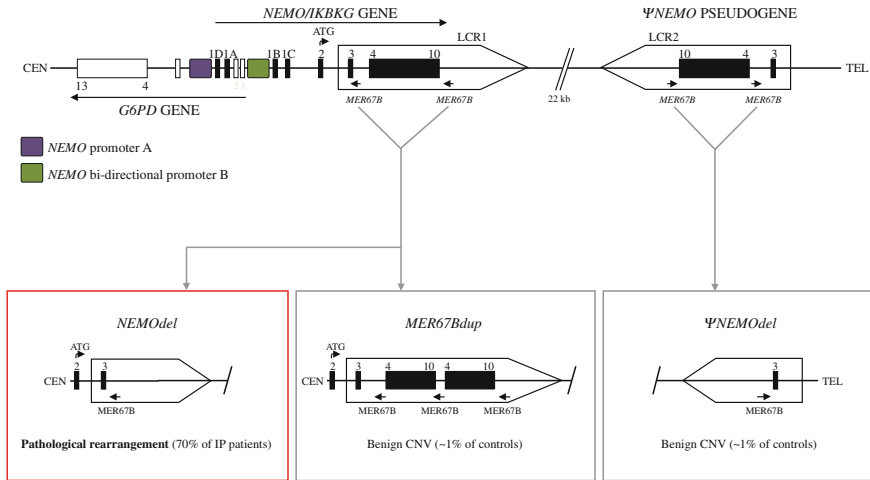
In addition to these common skin abnormalities, IP patients can also suffer from odontological, ophthalmological, or neurological problems and in very rare cases of nail dystrophy. Odontological problems are characterized by delayed eruption, oligodontia, agenesis, peg-shaped or malformed teeth, supernumerary teeth, and supplementary cusps and affect more than 80 % of IP patients [4]. Ophthalmological problems that affect approximately 35 % of patients mostly represent abnormalities of the developing retinal vessels [5]. Retinal detachment can be observed as a consequence of a neovascularization following retinal ischemia caused by abnormal peripheral retinal vessels. In the most severe cases, blindness can occur. Neurological abnormalities, found in approximately 30 % of IP cases, start during the first weeks of life, which may concord with the neonatal cutaneous eruption, and include epilepsy, mental retardation, hemiparesis, spasticity, microcephaly, and cerebellar ataxia [6]. In very rare instances, the CNS abnormalities can be fatal, when seizures lead to death due to severe vascular cerebral damages resulting in thalamic hemorrhage, ischemia, and necrosis of both hemispheres.

### 2.1.1.2 Genetic and Molecular Basis

The gene causing IP has been associated with the chromosomal region Xq28 [7]. It has been demonstrated that *NEMO*, which is located at this position, was the mutated gene. Indeed, a PCR analysis of the *NEMO locus* in cells derived from IP-affected male fetuses revealed an absence of amplified fragment corresponding to exons 4–10 [8]. This loss of exons is caused by a recurrent genomic rearrangement (NEMOdel) affecting approximately 70–80 % of IP patients. It is generated by nonallelic homologous recombination (NAHR) occurring between two repeated MEdium REiterated 67B (MER67B) sequences located upstream of exon 4 and downstream exon 10 of *NEMO* (Fig. 2.1).

*NEMO* maps in a region with a unique genomic organization, which will be called here the “IP locus”. In the centromeric direction, it partially overlaps with the *glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)* gene. The two overlapping genes share a conserved promoter region (Promoter B), distinct from the specific *NEMO* promoter (Promoter A), which has a housekeeping bidirectional activity [9]. It is

## 2.1 NEMO-Related Genetic Diseases

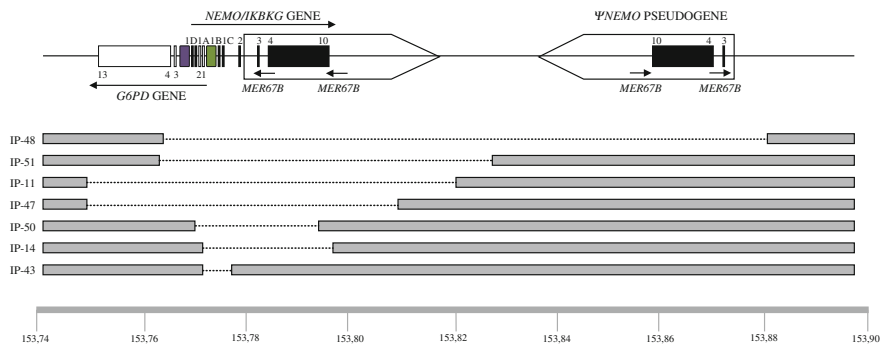


**Fig. 2.1** DNA rearrangements of the *NEMO* and  $\psi$ -*NEMO* loci. In the upper part of the figure, the genomic organization of the *NEMO* gene and the pseudogene  $\psi$ -*NEMO* (IP locus) is shown together with the genomic organization of the neighboring gene *G6PD*, which shares promoter elements with *NEMO*. In the lower part of the figure are shown the main rearrangements occurring in the IP locus. Among them is the recurrent one that deletes exon 4–10 of *NEMO* in approximately 70 % of IP patients (Red frame). See text for details

70 worth noting that *G6PD* is a disease gene causing the X-linked *G6PD*  
 71 deficiency (OMIM 305900) [10], the most common enzymopathy in humans. In the  
 72 telomeric direction, *NEMO* is part of a 35.7-kb segmental duplication (low  
 73 copy repeats, LCRs) containing also its non-functional truncated copy,  
 74 *pseudoNEMO* ( $\psi$ -*NEMO*). The two LCRs, covering the functional gene (LCR1)  
 75 and its pseudogene copy (LCR2), are arranged in an opposite orientation and are  
 76 highly homologous and prone to recombination [11–13].

77 Recent findings have demonstrated that the IP locus undergoes NAHR pro-  
 78 ducing either a pathological rearrangement (*NEMOdel*) or benign variants  
 79 (*MER67Bdup* and  $\psi$ -*NEMOdel*) (Fig. 2.1). These non-pathological variants do  
 80 not interfere with the function of *NEMO* but are considered to be structural vari-  
 81 ations of the human genome or small copy number variations (CNVs), with low  
 82 frequencies in the control population (1 %). Genetic evidence has demonstrated that  
 83  $\psi$ -*NEMOdel* and *MER67Bdup* variants should be considered as risk alleles for  
 84 sporadic IP cases [11].

85 Aradhya et al. [14] detected evidence for sequence exchange between the LCR1  
 86 and LCR2 copies, pointing out that inversion events promoted by their opposite  
 87 orientation might be responsible for the maintenance of their similarity. Moreover,  
 88 it has been observed that the recombination events produced by NAHR between the two  
 89 LCRs repositioned de novo polymorphic alterations arising in the pseudogene such as  
 90 the exon 4–10 deletion ( $\psi$ -*NEMOdel*) or point mutation, from the pseudogene to  
 91 the *NEMO* gene, causing de novo IP pathogenic mutations [11–13, 15].

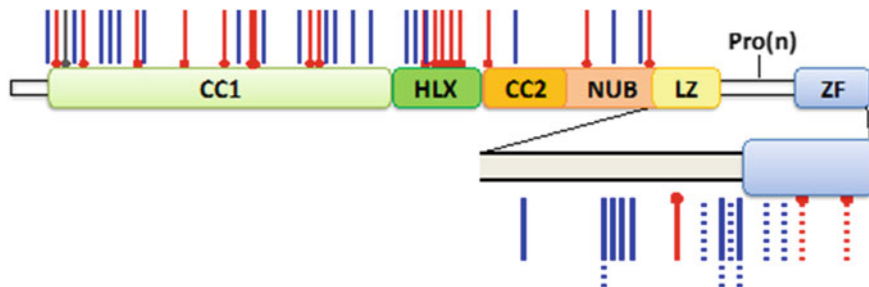


**Fig. 2.2** Chromosomal deletions affecting the *NEMO* gene in IP. The various deletions that have been identified are compiled. In several instances, *G6PD* is also affected. The largest one identified so far (deletion IP-48) also eliminates  $\psi$ -*NEMO*. See text for details

In addition to the recurrent event driven by *MER67B* sequences causing IP in most patients, a high density of repetitive sequences, located in each LCR, gives a genome structure-destabilizing effect predisposing the IP locus to generate novel rearrangements (Fig. 2.2) that eliminate *NEMO*, and sometimes also *G6PD* and  $\psi$ -*NEMO*. In several instances NAHR, causing both benign and pathological alleles [11, 15], and NHEJ (non-homologous end-joining) and Alu–Alu-mediated recombination events, producing either recurrent or nonrecurrent deletions, have been reported [13]. Indeed, the local architecture of the locus with a high frequency of micro-/macro-homologies, tandem repeats, and repeat/repetitive sequences increases its vulnerability to the production of de novo genomic rearrangements through different mechanisms [11, 13, 15]. These events, occurring during both meiosis and mitosis, reveal that the region is prone to generate complex human genomic rearrangements. Taken together, these findings indicate that IP belongs to the class of pathological conditions also known as “genomic disorders” and that the *NEMO*/IP locus must be considered a region of genome instability linked to inherited disease [13].

The recurrent *NEMO* rearrangement in IP results in synthesis of a truncated version of NEMO (aa 1–133 [8]), which, if stable, should only be able to interact with the IKK catalytic subunits but not with its other partners (see Chap. 1). As a consequence, the NF- $\kappa$ B activation process is totally abolished in response to classical inducers of the canonical pathway. Among those inducers is TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine that has a dual function in triggering either death by apoptosis or survival, this latter fate prevailing only if specific proteins under NF- $\kappa$ B control are synthesized (see Sect. 1.3.3). Accordingly, IP cells are very sensitive to TNF- $\alpha$ -induced programmed cell death, a feature that has important consequences in development of the disease (see below).

Besides the DNA rearrangements affecting the *NEMO* locus, other mutations such as nonsense or frameshift mutations have been reported (Fig. 2.3). Usually, they also result in synthesis of very truncated forms of NEMO devoid of activity. One notable exception is a micro-deletion that removes three nucleotides encoding

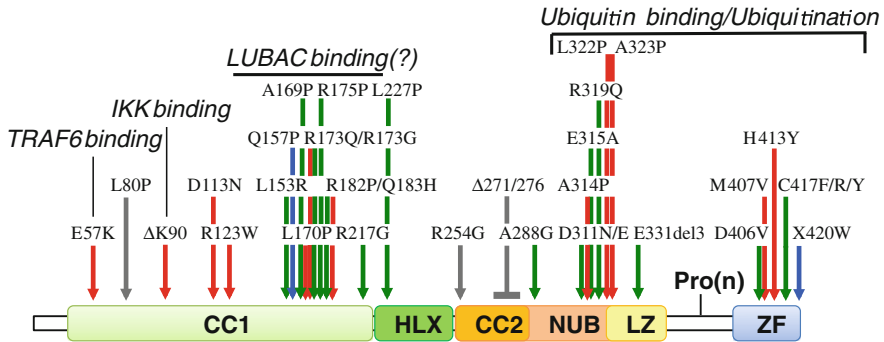


**Fig. 2.3** NEMO truncations resulting from nonsense and frameshift mutations. *Red dumbbell bars* and *red dotted dumbbell bars* indicate nonsense mutations causing IP and EDA-ID, respectively. *Blue bars* and *dotted blue bars* indicate frameshift of splicing mutations causing IP and EDA-ID, respectively. The *gray bar* indicates an EDA-ID-related N-terminal truncation of NEMO resulting from a translational reinitiation occurring after a missense mutation. Compiled from Refs. [39, 51, 52]. See text for details

121 amino acid K90 ( $\Delta K90$ ). Mutation  $\Delta K90$  has been found associated with a severe  
 122 form of IP, something not necessarily surprising since it perturbs the interaction of  
 123 NEMO with the catalytic subunits of IKK [16]. The published structure of the  
 124 NEMO/IKK interaction domain has confirmed that aa K90 establishes itself a  
 125 contact with the 732 carbonyl of IKK1/IKK2 [17]. Actually, a mere deletion of one  
 126 aa occurring at this location should be sufficient to disturb contact points between  
 127 neighboring amino acids E89, F92, and L93 and residues D738, T735, and F734 of  
 128 IKK2, respectively.

129 More interestingly, few missense mutations of *NEMO* have also been identified  
 130 in IP patients, suggesting that “discrete” molecular abnormalities may be sufficient  
 131 to generate a full-blown disease (Fig. 2.4). Among them is mutation A323P, which  
 132 causes a severe form of IP with CNS abnormalities [18]. It has been shown that this  
 133 mutation affects many NF- $\kappa$ B signaling pathways, such as the ones regulated by  
 134 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS, or PMA/ionomycin. Introduction of a proline at this position  
 135 does not destabilize the protein but rather impairs its ubiquitination, as shown in  
 136 TRAF6-dependent pathways, or its ability to interact with ubiquitinated partners by  
 137 affecting the NUB domain. Another mutation producing a mild form of IP, E57K,  
 138 has been shown to perturb the interaction between NEMO and TRAF6, suggesting  
 139 the existence of a dual mode of interaction between NEMO and TRAF6 [19].  
 140 On one hand, the NUB domain may recognize polyubiquitinated chains of active  
 141 TRAF6, and on the other hand, the N-terminus of NEMO may directly contact  
 142 TRAF6. In contrast, the interaction with IKK is not affected.

143 As said above, chromosome X linkage is an additional parameter that greatly  
 144 impacts upon the phenotype developed by IP patients. X-inactivation skewing, i.e.,  
 145 inactivation of one chromosome X favored over the other, is often detected. It  
 146 reveals mechanisms of counterselection that affect cells carrying the *NEMO*  
 147 mutation. This process is particularly striking in blood cells [20]. In most cases,  
 148 their genotype is more than 95 % wild type, instead of 50 % in case of a normal  
 149 X-inactivation process, demonstrating a specific disappearance of the mutated cells



**Fig. 2.4** NEMO missense mutations and short internal deletions of NEMO found in pathology. Red arrows indicate IP-related missense mutations, green arrows indicate EDA-ID-related missense mutations, blue arrows indicate OL-EDA-ID-related missense mutations, and gray arrows indicate ID-related missense mutation. A short internal deletion of NEMO associated with ID is also indicated with a gray bar. Compiled from Refs. [39, 51, 52]. Formally and putatively (question mark) demonstrated molecular defects are also indicated. See text for more details

in this compartment. This elimination process is unfortunately not always as efficient in other cell types or even within the same tissue and can be variable, impacting on the final manifestations of the disease. As a striking example, IP patients carrying the recurrent DNA rearrangement of *NEMO*, therefore the very same genetic defect, can exhibit a phenotype ranging from mild dermatosis, without any additional problems, to the most severe form of the disease including abnormalities of the teeth, eyes, and CNS.

### 2.1.1.3 Pathophysiology

The sequence of events causing IP dermatosis results from an intricate combination of X-linked inactivation-related processes, NF- $\kappa$ B signaling in the skin, and sensibility of NEMO (-) cells to apoptosis. Using various mouse models of the disease, several molecules and cell types participating in IP dermatosis have been identified.

*Nemo* invalidation in the whole mouse generates a phenotype very similar to the phenotype of IP patients [21, 22]. In particular, males die from liver apoptosis at day E12, whereas females survive until birth but, soon after, develop a dermatosis displaying features typical of IP. Similar skin abnormalities have also been observed after invalidating *nemo* or *ikk2* specifically in the epidermis (*nemo*<sup>epKO</sup> and *ikk2*<sup>epKO</sup>) using conditional recombination [23, 24]. This demonstrates that keratinocyte dysfunction is enough to trigger the disease.

The molecular/cellular circuitry involved in skin defect development has been identified to some extent. First, it has been shown that, in both *nemo*<sup>epKO</sup> and *ikk2*<sup>epKO</sup>, several cytokines exhibit an abnormal expression in the skin. This occurs at very early stages (P2/P3), before detecting visible abnormalities. For instance, an



174 increase of IL-1 $\beta$  synthesis is specifically observed in the epidermis. Since such  
175 increase cannot be detected when *ikk2* KO keratinocytes are cultured ex vivo, this  
176 indicates a cell non-autonomous event. Its nature remains unknown, but it might be  
177 linked to the colonization of skin after birth or some cell fragility (necrosis?) caused  
178 by NEMO absence. Later on, at P4/P7, an accumulation of TNF- $\alpha$  is detected in the  
179 dermis. This second event is crucial for the development of the dermatosis process  
180 since crossing the mice with *tnfr-1* KO mice completely inhibit skin manifestations. It  
181 may involve the production of IL-24 by *Nemo* (-) keratinocytes inducing  
182 STAT3-dependent synthesis of cytokines and chemokines [25]. This would allow  
183 recruitment of immune cells in the skin, among them macrophages [26], dendritic  
184 cells, and neutrophils. Importantly, B and T lymphocytes have been shown to be  
185 dispensable [24]. The eosinophilic infiltration of the skin resulting in eotaxin accu-  
186 mulation during the vesicular stage and is a feature of IP [27] has not been studied.

187 From these observations, it has been proposed that the mosaic status of the  
188 neonatal skin/epidermis of IP females, composed of cells expressing either wild  
189 type or mutant NEMO, is the trigger of the whole dermatosis process. Mutant cells,  
190 most likely keratinocytes, would start to over-express pro-inflammatory cytokines  
191 such as IL-1 $\beta$  just after birth, and IL-1 $\beta$  would induce TNF- $\alpha$  synthesis by  
192 neighboring wild-type cells. This cytokine would in turn both induce an inflam-  
193 matory process and act on mutant NEMO-expressing cells, causing their death and  
194 clearance. This latter event may explain the final atrophic stage of IP dermatosis  
195 linked to lesion disappearance. If true, this means that the genetic defect initiating  
196 the process in the skin would also be responsible for its shutoff. A paradox is also  
197 that an intact NF- $\kappa$ B signaling pathway in surrounding wild-type cells is required  
198 for skin abnormalities development.

199 It is noteworthy that elimination of NEMO KO cells in the epidermis of IP  
200 patients at young ages is not always complete and can resume later on. In some  
201 adult IP patients, the skin disease, with its various stages, can be detected again at  
202 the same location as the original lesions following episodes of infection [28].  
203 A similar recurrence has been observed using a mouse system allowing inducible  
204 *NEMO* inactivation in the skin of adult mice. Upon NEMO deletion in the ker-  
205 atinocytes, all the events recapitulating the IP dermatosis occurred [23].

206 In contrast to what starts to be deciphered concerning the skin abnormalities in  
207 IP patients, very little is still known concerning the events occurring in the eyes or  
208 the CNS. Recently, analysis of the eyes of *Nemo* (-) mice has revealed retinal  
209 arteriolar abnormalities, including luminal narrowing, endothelial cell hypertrophy,  
210 and basement membrane thickening. Surprisingly, neither obvious vaso-occlusion  
211 nor neovascularization was observed [29]. Some progress has also been made  
212 regarding the primary molecular/cellular event(s) causing CNS abnormalities in IP  
213 patients. Since the manifestations of the disease at this level are very diverse, it has  
214 been difficult to imagine a single primary defect although micro-vascular ischemia  
215 may be a trigger (Hennel et al. 2003). Supporting this vascular origin of the disease  
216 in the brain, Schwaninger and colleagues [30] have recently reported that NEMO  
217 plays a key function in blood-brain barrier integrity by controlling vascular per-  
218 meability. Mice specifically invalidated for *Nemo* in the brain vessels exhibit



219 abnormalities such as degenerated microvessels caused by endothelial cell death  
220 with only remnants of the extracellular matrix (the so-called string vessels) and  
221 edema. Importantly, string vessels have also been observed in the brain of an IP  
222 individual and in mice modeling IP. In addition, invalidating *Nemo* in the brain  
223 vasculature results in epilepsy, a hallmark of IP.

#### 224 2.1.1.4 Treatment

225 Given the extended phenotypic effect of a lack of function of NF- $\kappa$ B in IP patients,  
226 it is hard to imagine treating the primary cause, an absence of NEMO or its lack of  
227 activity. Instead, efforts are made to attenuate consequences of the disease.  
228 A genetic counseling can also be proposed frequently. Indeed, as explained above, a  
229 large number of IP patients (approximately 70–80 %) carry the same DNA rear-  
230 rangement. This allows an easy prenatal testing in case of familial transmission  
231 although current figures suggest that this mode of transmission only concerns half  
232 of the patients. If testing is possible and IP identified the genetic counseling, it  
233 requires to explain carefully to the parents the difficulty in fully anticipating the  
234 spectrum and extent of abnormalities that will ensue (see Sect. 2.1.1.2).

235 It has been shown that teeth problems can benefit from orthodontics. Concerning  
236 the eyes, ophthalmologic examinations are performed frequently during infancy and  
237 early childhood to monitor any deleterious change [31]. CNS abnormalities rep-  
238 resent the most challenging issue. Epilepsia almost affects half of the patients with  
239 such abnormalities, seizures usually starting early after birth. It has been reported  
240 that standard treatment protocols are not always effective. An attempt to treat one IP  
241 patient with glucocorticoid has been reported [32]. The cognitive function, espe-  
242 cially learning ability, of IP patients can also be surveyed in order to propose some  
243 reeducational training [33].

244 Skin anomalies are usually not specifically treated, mostly because of an  
245 incomplete knowledge of the mechanisms/components involved. As said above,  
246 TNF- $\alpha$  plays a key role in mouse models of the disease, and anti-TNF- $\alpha$  treatments  
247 are available for humans. Nevertheless, it is still uncertain whether inhibiting a  
248 process that results in elimination of mutated cells would provide some benefits.  
249 Since even a small pool of surviving NEMO (-) cells can re-initiate the disease,  
250 keeping those cells alive at young ages with an anti-TNF- $\alpha$  treatment may transform  
251 the disease in a chronic one, considering also that skin abnormalities in IP display  
252 similarities with psoriasis.

#### 253 2.1.2 Anhidrotic Ectodermal Dysplasia 254 with Immunodeficiency (EDA-ID)

255 As explained above, incontinentia pigmenti is caused by lack-of-function mutations  
256 of NEMO and affects females. Hypomorphic mutations of *NEMO* that do not

completely inhibit NF- $\kappa$ B activation also exist. They have been found to cause another X-linked pathology, anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (EDA-ID) (OMIM # 300291) [34–37]. In this case, the disease affects exclusively males, although in rare occasions affected female exhibit very mild signs of IP. It is characterized by a severe immunodeficiency associated with the impaired development of skin appendages (hair, teeth, and sweat glands).

### 2.1.2.1 Clinical Features

On the immunodeficiency side, patients suffer from recurrent and life-threatening bacterial and viral infections [38, 39]. The most frequent pathogens are Gram-positive and Gram-negative pyogenic bacteria, such as *S. pneumoniae* and *S. aureus*. Chronic atypical mycobacterial infections are frequently observed. They are associated with the poor prognosis since they progress insidiously and are almost inevitably disseminated when the disease is diagnosed. Some patients also suffer from fungal and viral diseases, including HSV encephalitis. All this is caused, for a large part, by impaired functioning of innate immunity receptors that are well-known NF- $\kappa$ B inducers, such as TLR4 that recognizes LPS from Gram-negative bacteria and other TLRs (see Chap. 1).

Adaptive immunity is also perturbed in EDA-ID patients, but a homogenous clinical and molecular picture is still difficult to draw. A defect in specific antibody production is often observed, with decreased IgG and increased IgA synthesis, and some patients also exhibit a hyper-IgM syndrome. These B-cell defects may be linked to impaired costimulation by CD40. In some rare patients, a T cell impairment has also been reported, and some have claimed that it may explain high sensitivity to infections by mycobacteria. More consistently found is a problem of NK cell activation, despite a normal cell count and proper development [40]. It has been proposed that this impairment may explain recurrent infections of EDA-ID patients with viruses, such as herpesvirus and papillomaviruses. Additionally, a reduced response to virus exposure might result from defective interferon (IFN) synthesis. Indeed, as mentioned above (see Chap. 1), NEMO is an essential component of the pathway specifically responsible for IFN class 1 production.

In a substantial fraction of EDA-ID patients, gut inflammation/colitis has been reported. This does not seem to be caused by mycobacteria or pathogenic bacteria. It is uncertain whether this relates instead to impaired Nod2 signaling and therefore presents similarities to Crohn's disease. The role played by NEMO in homeostasis of the intestinal epithelium (see Sect. 2.1.2.3) may also be evoked.

EDA-ID patients also exhibit an impaired development of skin appendages. This results in sparse hair, missing or scanty eyebrows and lashes, severe oligodontia, and absent or reduced sweating. This observation provided the first demonstration, through a genetic analysis but subsequently confirmed biochemically, that the ectodysplasin (*eda*)/*eda* receptor (EDAR) signaling pathway, which is specifically dedicated to formation of hair, teeth, and sweat glands and whose mutations are associated with EDA in humans [41, 42], is connected to IKK/NF- $\kappa$ B activation

299 through NEMO. Connecting eda/EDAR to the NF- $\kappa$ B pathway requires the adaptor  
300 EDARADD (EDAR-associated death domain), whose mutations can cause EDA in  
301 humans [43, 44], but also TRAF6 and TAB2/TAK1 that act upstream of IKK [45].  
302 A participation of TRAF2 is also suspected since EDARADD contains a  
303 TRAF2-binding sequence in addition to a TRAF6-binding sequence [44].

304 In rare cases, EDA-ID can be found associated with osteopetrosis, which is  
305 characterized by defective RANK signaling and excessive bone formation, and  
306 lymphedema, which is caused by impaired VEGFR3 signaling and development of  
307 lymphatic vessels [46, 47]. The syndrome is called OL-EDA-ID. Whereas NF- $\kappa$ B is  
308 a well-known player in the RANK signaling pathway and is necessary for proper  
309 osteoclast function [48], it is still unclear how exactly NEMO/IKK participates in  
310 the development of lymphatic vessels. A role of NF- $\kappa$ B in the survival and adhesion  
311 properties of endothelial cells composing blood vessels, a developmentally related  
312 tissue, is well established. In the lymphatic system, NF- $\kappa$ B might be activated  
313 through VEGFR3 [47] and a lack of activation caused by a NEMO mutation would  
314 be detrimental. Alternatively, the expression of VEGFR3 itself may be both directly  
315 and indirectly regulated by NF- $\kappa$ B. Indeed, it has been shown that Prox1, a  
316 lymphatic-specific transcription playing a key role in lymphangiogenesis through  
317 VEGFR3 synthesis, is upregulated during inflammation with an involvement of  
318 NF- $\kappa$ B [49]. Moreover, the promoter of VEGFR3 contains several NF- $\kappa$ B-binding  
319 sites also used during inflammation. A similar mechanism of dual regulation may  
320 operate during development. Alternatively, it has been reported that increased  
321 VEGF-C synthesis during TNF- $\alpha$ -induced lymphangiogenesis requires NF- $\kappa$ B  
322 providing another possible level of regulation for NF- $\kappa$ B by acting a step above on  
323 the ligand of VEGFR3 [50].

#### 324 2.1.2.2 Genetic and Molecular Basis

325 NEMO mutations causing EDA-ID are less deleterious than the ones causing IP,  
326 allowing male survival. They provide an opportunity to learn more about the  
327 functions in vivo of the various domains of NEMO since in this case only one  
328 chromosome X, which carries the mutation, is expressed. This contrasts with the  
329 female situation in which the effect of a mutation has to be considered as potentially  
330 moderated by X-inactivation skewing processes (see Sect. 2.1.1.2). Nevertheless, it  
331 must be stressed that they represent hypomorphic mutations that may not fully  
332 reveal the complete function of a given molecular element. This information can be  
333 sometimes obtained by comparing EDA-ID-associated mutations with  
334 IP-associated ones. Also worth noting, the occurrence of hypomorphic sets of  
335 similar mutations introduces variabilities in NEMO activity that may explain the  
336 phenotype heterogeneity of EDA-ID patients.

337 In contrast to *NEMO* mutations causing IP, which usually result in severe  
338 truncations of the NEMO protein, frameshift or nonsense mutations causing  
339 EDA-ID often only remove the NEMO ZF. The distinction between IP and  
340 EDA-ID remains nevertheless far from clear-cut since similar truncations affecting

the NEMO ZF can also produce IP (Fig. 3.2). Interestingly, blunt deletions of this domain caused by missense deletions result in most cases in EDA-ID, whereas frameshift mutations that append extra amino acid sequences of various lengths at the C-ter of NEMO are more frequently found in IP patients. One explanation may be that extra-polypeptide sequences will impact more severely, by steric hindrance, the overall activity of the C-terminus of NEMO.

The C-terminal part of NEMO is composed of two domains with affinity to polyubiquitin chains, and the ZF represents one of them. The deletions affecting it and causing EDA-ID or IP, as discussed above, impact on the interaction of NEMO with numerous ubiquitinated partners and impair NF- $\kappa$ B activation in several distinct pathways (see Chap. 1). The same has been demonstrated for a set of EDA-ID-associated missense mutations (D406V, M407V, C417R/Y/F) [39, 51, 52]. The other domain with affinity for ubiquitin is the NUB domain and is very often found mutated with amino acids substitutions in EDA-ID patients [39, 51, 52]. This provides very useful information concerning the identity of the ubiquitin-interacting amino acids. Again, the impact of such mutations is supposed to be broad.

Another large set of missense mutations causing EDA-ID is located in the intermediate domain. It has been shown that this domain is required for interaction with LUBAC, more specifically Sharpin, suggesting that functions linked to linear ubiquitination could be the impaired ones. In at least one case, this has been formally demonstrated [53].

It has been reported that an EDA-ID-linked mutation, A288G, located in the CC2 region of NEMO, affects its oligomerization and impairs NF- $\kappa$ B activation in response to TNF- $\alpha$  and LPS [54]. Worth noting, this Gly residue appears near Lys 285, which is modified through K63- and/or linear-linked polyubiquitination, suggesting that this process may also be affected.

Finally, the mutation associated with OL-EDA-ID, X420W, which appends 27 aa at the C-terminus of NEMO, has been shown to strongly destabilize the protein [35]. Nevertheless, it is still unclear whether a simple quantitative defect of NEMO expression is responsible for OL-EDA-ID since other mutations are also associated with reduced NEMO expression [55] without generating osteopetrosis or lymphedema. Most probably, the appended sequence perturbs the ZF function of an already low expressed protein. This hypothesis will be difficult to assess in the mouse since a mutation eliminating the *Nemo* stop codon in this organism would not add the same extra C-terminal sequence as the human one and its length would be much longer. More puzzling, OL-EDA-ID has also been reported to be caused by a Q157P mutation, in a region of NEMO where many other mutations have been shown to cause either EDA-ID or IP.

This last situation confirms the difficulty in establishing in several instances a clear link between a specific kind of mutations and the final phenotype in NEMO-mutated patients. All these observations provide a quite unique and fascinating example of how an X-linked abnormality affecting a pathway with wide-spread functions, such as the NF- $\kappa$ B pathway, can affect human physiology with a high level of complexity and diverse outcomes.

### 2.1.2.3 Treatment

EDA-ID patients with suspected infection should be treated with early empirical intravenous antibiotic administration since they do not show increased plasma C-reactive protein concentration and do not mount a fever due to impaired TLR signaling. Usually, patients are supplemented with intravenous or subcutaneous IgG because of their B-cell switching defect. Multidrug antimycobacterial therapy can also be applied in case of mycobacteria dissemination in the organism. Very often, infections of EDA-ID patients can be life-threatening, and the recommended procedure to restore some protective functions is allogenic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) [56–58]. This therapeutic approach remains challenging and is not always successful. This is mostly due to the fact that the defects also include non-hematopoietic tissues. For instance, it has been shown that in patients presenting gut inflammation before transplantation, the problem can be exacerbated by a restored immune system. In mice presenting a well-functioning immune system, a *Nemo* invalidation in the intestinal epithelium leads to severe chronic intestinal inflammation [59]. One may imagine that in transplanted EDA-ID patients correction of the immune compartment but absence of correction of the gut compartment may worsen the situation.

EDA is also by itself a concern, especially when sweating is severely impaired. Because NEMO is the defective component, it is hard to imagine acting at this level. This is unfortunate since treating EDA patients whose condition is caused by *eda* deficiency might be possible in the future. It has been shown in *tabby* mice, a spontaneous mutant strain defective in murine *eda*, that injection of EDAR agonists can be used to restore to some extent hair follicle and sweat gland formation [60]. Since the *eda*/EDAR signaling pathway appears highly restricted to skin appendage development, there might be room for modulating its activity without too much adverse consequences.

### 2.1.3 *NEMO-Related Immunodeficiency (NEMO-ID)*

Several male patients suffering from a pure immunodeficiency syndrome not associated with EDA have been reported as mutated in *NEMO* [55, 61–65] (Fig. 2.4). They did not exhibit any specific types of infection that would distinguish them from EDA-ID patients. It is difficult at this stage to fully understand why their *NEMO* mutations do not generate EDA, especially when the same mutation in different families can produce different outcomes at the tooth level for instance [64]. Some immune functions may be more sensitive to specific weak mutations of *NEMO* than the *eda*/EDAR pathway. Alternatively, mutations affecting the expression level of the protein may be more deleterious for immunity than for skin appendage development. For instance, a frameshift mutation of *NEMO* located at amino acid Ala37 and compensated by re-initiation of translation at nearby Met38 produced a less expressed pseudofull length protein causes

426 immunodeficiency without any signs of EDA [55]. It will be quite interesting to  
 427 solve this issue since two mutations causing only ID are short deletions ( $\Delta 271$ –276  
 428 and  $\Delta 353$ –373) [62, 65] in domains that have not been found associated with any  
 429 specific functions so far.

## 430 2.2 IKK2-Related Genetic Disease (Severe Combined 431 Immunodeficiency)

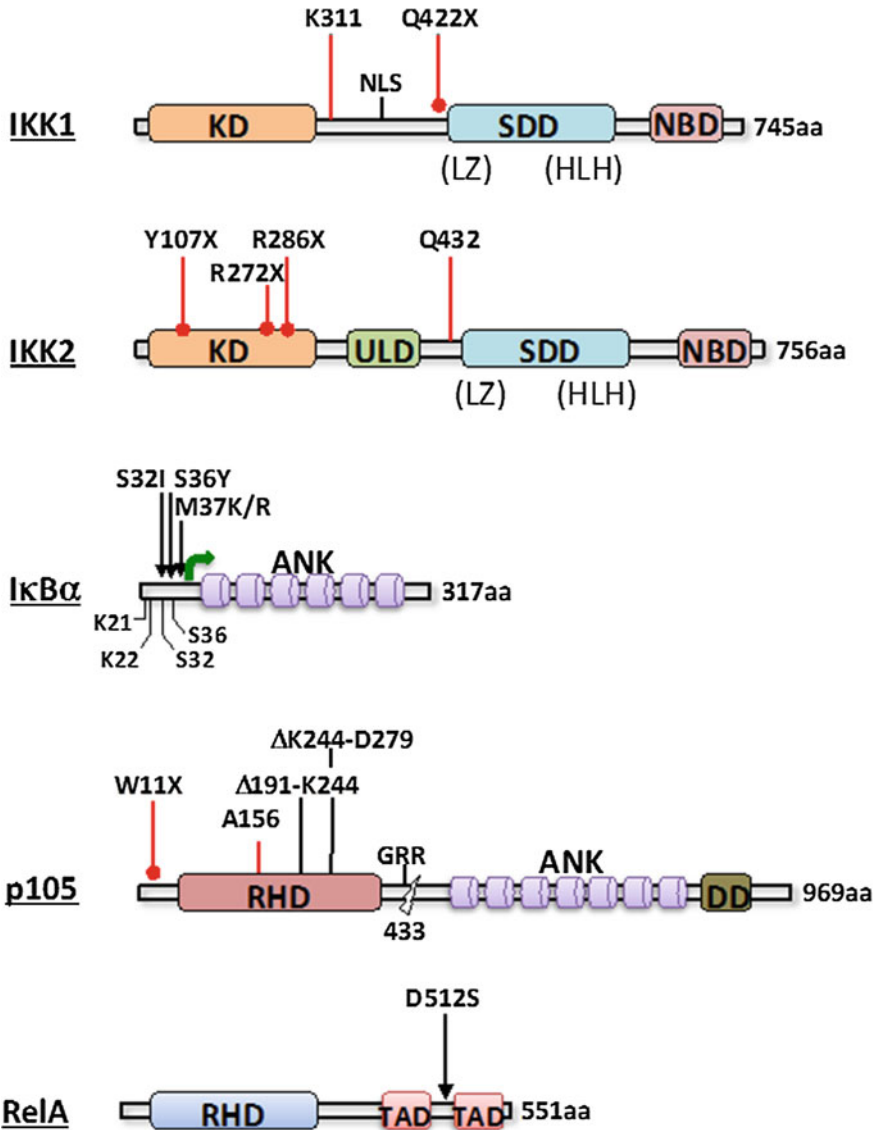
432 As the subunit of the IKK complex with the strongest catalytic activity IKK2  
 433 represents a key player in the activation process of NF- $\kappa$ B (see Chap. 1).  
 434 Nevertheless, its absence is not as detrimental as the absence of NEMO. Indeed,  
 435 residual IKK activation can still occur due to the ability of IKK1 to compensate to  
 436 some extent for the lack of IKK2 activity.

437 A severe combined immunodeficiency (SCID) characterized by recurrent  
 438 infections and hypogammaglobulinemia/agammaglobulinemia, but normal B- and  
 439 T-cell counts were recently identified in several individuals [66–69]. The first ones  
 440 and the most extensively characterized presented a common genetic origin  
 441 (Northern Cree ancestry), but no consanguinity [66]. Homozygosity mapping  
 442 revealed a candidate in a 11.6 Mbp region on chromosome 8. After sequencing the  
 443 40 genes located at this locus, only one was shown to exhibit in four distinct cases  
 444 an homozygous duplication (c.1292dupG) in exon 13 of *IKBKKG*, the gene encoding  
 445 IKK2. This frameshift mutation starting at Q432 was shown to produce a very  
 446 unstable truncated IKK2 protein (Fig. 2.5) as revealed by Western blotting.  
 447 Unexpectedly, the expression level of other IKK components, IKK1 and NEMO,  
 448 appeared also reduced.

449 Other IKK2 SCID patients were more recently identified carrying homozygous  
 450 missense mutations (Y107X, R272X, and R286X) in *IKKBK* that result in large  
 451 truncations of IKK2 [67–69] (Fig. 2.5). Similar to the mutation reported by  
 452 Pannicke et al., these truncations resulted in a lack of IKK2 expression. When  
 453 expression of NEMO and IKK1 was examined, conflicting observations were made.  
 454 Mousallem et al. [68] observed a reduction in NEMO expression but not in IKK1  
 455 expression and Nielsen et al. [69] a reduction in neither of the two. The cause of  
 456 such variability remains difficult to understand.

457 In line with the severity of the disease, many immune defects were identified in  
 458 IKK2 SCID patients. They result from a wide range of impaired cell functions.

459 Although the development of B cells is not affected, many signs of their per-  
 460 turbed differentiation are observed. Cells are almost exclusively naive, with a  
 461 normal proportion of CD38<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> transitional cells but a lack of  
 462 CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> class-switched-memory cells and CD38<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> plasmablasts.  
 463 When patient-derived B cells are stimulated with CD40L/IL-21, which are usually  
 464 provided by follicular helper T cell, they do not proliferate and differentiate into



**Fig. 2.5** Mutations of IKK1, IKK2, IκBα, p105, and RelA. The proteins with their functional domains (see Chap. 1) are shown with the positions of the mutations identified in humans. *Red bars* above the protein structures indicate frameshift mutations, *red bars with a dot* indicate nonsense mutations, and *black bars with arrow* indicate missense mutations. A *curved green arrow* indicates a translation re-initiation site. Residues involved in IκBα degradation are indicated below its structure. The cleavage site of p105 used to generate p50 is also shown



465 plasmablasts. In addition, they do not produce immunoglobulins (Igs). In contrast,  
 466 proliferation is still observed when induced by the B-cell receptor or the cytosine–  
 467 guanine dinucleotide polymer CpG, through TLR9, but Ig production is impaired.

468 Something similar is observed with the T cells. Most CD4 and CD8 cells, whose  
 469 abundance is normal, express naive antigens such as CD45RA or CD27 despite the  
 470 exposure of patients to various germs. Moreover, there is an absence of  
 471 CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs and, more surprisingly, of  $\gamma\delta$ T cells. Expression of  
 472 activation markers such as CD25 and CD69 is reduced upon exposure of  
 473 IKK2 SCID T cells to CD3/CD28, and proliferation of the cells is moderately to  
 474 severely impaired, depending on the patients. In addition, if a little response is  
 475 observed to soluble or plate-bound, anti-CD3 antibodies phytohemagglutinin  
 476 mitogenic responses are only moderately reduced. Therefore, the overall activation  
 477 capacity of T cells derived from IKK2 SCID patients appears reduced to some  
 478 extent but not abolished.

479 The number of NK cells in IKK2 SCID patients is reduced and their activation  
 480 impaired, as shown by decreased CD107a degranulation and IFN $\gamma$  synthesis [66].

481 Importantly, several signaling pathways participating in innate immunity were  
 482 also shown to be affected in IKK2 SCID patients. In fibroblasts, among the most  
 483 perturbed pathways are the ones responding to TNF- $\alpha$ , LPS (TLR4) and flagellin  
 484 (TLR5). In contrast, the IL-1 $\beta$  signaling pathway appears less impaired. As a  
 485 consequence, target genes of NF- $\kappa$ B are differentially affected, depending on the  
 486 stimulus used, and more or less sensitive to a lack of IKK2 activity.

487 Although reported in only a single case [67], very mild signs of EDA such as  
 488 conical teeth may affect IKK2 SCID patients. As explained above (see Sect. 2.2),  
 489 eda activates NF- $\kappa$ B through the canonical pathway, as demonstrated through the  
 490 discovery of the EDA-ID pathology caused by hypomorphic mutations of NEMO.  
 491 This would confirm the role of IKK in this developmental pathway. To explain the  
 492 weakness of the phenotype, some compensation by the catalytic activity of IKK1  
 493 may prevent generation of a phenotype as severe as the one caused by *NEMO*  
 494 mutations.

### 495 2.3 IKK1-Related Genetic Disease (Cocoon Syndrome)

496 IKK1 participates in the canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation as one of the two  
 497 catalytic subunits of IKK (see Chap. 1). Nevertheless, its contribution to the kinase  
 498 activity of this complex appears less essential than the one of IKK2. The situation is  
 499 different in the non-canonical pathway where it plays a critical function as the  
 500 kinase inducing the processing of p100. NF- $\kappa$ B-independent functions of IKK have  
 501 also been proposed, such as control of epidermis development. This last function  
 502 may explain the overall aspect of IKK1 KO mice (see Chap. 1).

Two cases of fetal encasement malformations occurring in a consanguineous Finnish family were recently reported [70]. Among the numerous abnormalities detected in the fetuses at 12–13 weeks of gestation were defective face, with an abnormal cyst in the cranial region and a large defect in the craniofacial area, an omphalocele and a lobulation defect in the lungs. Poorly developed skeletal muscles were observed as well as seemingly absent limbs, which were bound to the trunk and encased under the skin.

This limb encasement bearing striking homology with the phenotype observed in IKK1 KO mice convinced the authors to sequence the *IKBKA* gene in the two fetuses. An homozygous missense mutation (c.1264C→T) was detected in exon 12, generating a large truncation of IKK1 removing all sequences after its catalytic domain (aa 422–745) including the domains participating in dimerization with IKK2 and interaction with NEMO (Fig. 2.5). This deletion resulted in a strongly reduced expression of the protein. Since a similar pathologic case was previously reported in the literature [71], but not genetically characterized, and qualified as “Cocoon fetus,” the term Cocoon syndrome has been proposed by Lahtela et al. [70] to be used for this IKK1-related inherited disease.

More recently, an homozygous splice mutation of IKK1 was identified in a female patient born to a consanguineous family [72]. This mutation is supposed to truncate even further the IKK1 protein than in the Finnish family (Fig. 2.5), but no data regarding its effect on the stability of the protein is available. Again, the phenotype was highly severe and complex with face abnormalities (wide cranial suture and anterior fontanel, bilateral cleft lip and palata, bilateral microphthalmia, etc.), various skeletal abnormalities and extremities exhibiting syndactyly and popliteal webs.

The molecular/cellular basis of the Cocoon syndrome remains poorly defined. Most likely, intermingled defective functions of IKK1 generate this very complex phenotype.

Craniofacial and skeletal abnormalities may reflect the role played by IKK1 as a repressor of fibroblast growth factor (FGF) members [73]. Analyzing the transcriptome of two patients, Lahtela et al. [70] observed a severe reduction in numerous mRNAs, among them the one coding for matrix metalloproteinase 14 (MMP-14), but how their defective expression relates to impaired IKK1 activity remains unclear.

Skin abnormalities, which were first observed after invalidating the *Ikk1* gene in the mouse, are unlikely to reflect NF- $\kappa$ B dysfunction. Besides being very different from the one observed in incontinentia pigmenti, clearly caused by impaired NF- $\kappa$ B activation in the epidermis, they are also characterized by a lack of keratinocyte differentiation which cannot be corrected by activating NF- $\kappa$ B [74]. Actually, as a whole, the cocoon syndrome displays several similarities with a limb pterygium syndrome (LPS) called lethal-type popliteal pterygium syndrome (LPPS)/Bartsocas-Papas syndrome (BPS) (MIM # 263650) [75]. Interestingly, this specific syndrome has been demonstrated to be caused by mutations of *RIPK4* [76, 77], which codes for a member of the RIP kinase family originally proposed to be an NF- $\kappa$ B activator in PKC $\beta$ -dependent pathways [78]. Nevertheless, the original data

548 were obtained by performing overexpression experiments, which can often generate  
549 artefacts. More importantly, popliteal pterygium syndrome can be also caused by  
550 mutations of *IRF6*, which encodes an inducible transcription factor located in the  
551 cytoplasm [79]. It remains to be determined whether IRF6 activation, which  
552 requires a phosphorylation event, is dependent upon IKK1 and/or RIPK4 kinase  
553 activity, acting sequentially or in parallel. Since forced expression of RIPK4 in the  
554 mouse epidermis corrects the skin defect of *Ripk4(-/-)* mice but not of *Ikk1(-/-)*  
555 mice, the former hypothesis is the most likely. Irrespective of the exact molecular  
556 relationship existing between IKK1, RIPK4, and IRF6, it has been shown that this  
557 module acts on periderm formation [80, 81]. Periderm is a barrier covering the  
558 developing epidermis during embryogenesis that is used transiently to prevent  
559 adhesion between adhesion competent epithelia. In case of dysfunction, adhesion of  
560 multiple soft tissue occurs. This explains the fusion between hind limbs and body  
561 wall in modified mice and humans suffering from Cocoon syndrome.

562 Since this chapter is supposed to deal with NF- $\kappa$ B-related diseases, one may be  
563 frustrated by the lack of info concerning the NF- $\kappa$ B field generated by the study of  
564 the first identified IKK1-related pathology. Unfortunately, as explained above, the  
565 great severity of the cocoon syndrome and its paucity precludes investigation of  
566 NF- $\kappa$ B-related functions of IKK1 in immunity or other processes. Nevertheless,  
567 since this disease is caused by pseudo-KO mutations, it cannot be excluded that  
568 hypomorphic mutations of IKK1 would generate in humans a less severe condition  
569 revealing other functions of this enzyme.

## 570 2.4 I $\kappa$ B $\alpha$ -Related Genetic Disease (Autosomal-Dominant 571 EDA-ID)

572 I $\kappa$ B $\alpha$  is the main I $\kappa$ B species regulating the canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation  
573 and the direct target of the IKK complex (see Chap. 1). Its phosphorylation by IKK  
574 induces its degradation by the proteasome and the release of active NF- $\kappa$ B dimers.

575 In several instances, heterozygous mutations of I $\kappa$ B $\alpha$  impairing its degradation  
576 by IKK have been reported to cause a syndrome (autosomal-dominant  
577 (AD) EDA-ID, [MIM # 612132]) that share clinical similarities with *NEMO*-re-  
578 lated EDA-ID [82–86]. So far, all these mutations modify the serine residues  
579 (Ser32, Ser36) that are phosphorylated by IKK upon cell stimulation, the residues  
580 nearby the DSGLDS phosphorylation motif, such as Met37, or delete the  
581 N-terminus of I $\kappa$ B $\alpha$  (Q9X, W11X, E14X) (Fig. 2.5). In these latter cases,  
582 re-initiation of translation occurs at Met37 and thus also eliminates the  
583 phospho-acceptor sites. Because of a lack of phosphorylation, I $\kappa$ B cannot be  
584 degraded and acts as a dominant-negative protein by accumulating and sequestering  
585 NF- $\kappa$ B species such as RelA, c-rel, or p50 in the cytoplasm. This explains why a  
586 heterozygous mode of transmission is sufficient to trigger the disease.

587 Clinically, AD-EDA-ID shares many similarities with EDA-ID but differences  
588 also exist.  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -mutated patients, such as NEMO-mutated patients, exhibit broad  
589 susceptibility to infections, especially those involving pyogenic bacteria. They are  
590 also infected by environmental mycobacteria and less frequently by parasites,  
591 viruses, and fungi. An impaired cellular response to TLR ligands, IL-1 $\beta$ , IL-18, and  
592 TNF- $\alpha$ , is observed. T- and B-cell numbers are normal, but hypogammaglobulinemia  
593 is observed with no production of specific antibodies.  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -mutated patients  
594 also present a severe impairment in TCR signaling with reduced cell proliferation.  
595 Several of them were shown to express low numbers of memory CD4 and CD8 T  
596 cells and no  $\gamma\delta$  T cells. This contrasts with EDA-ID-related NEMO patients who are  
597 usually not strongly affected in T-cell functions. The difference is likely caused by  
598 the fact that NEMO mutations generating EDA-ID are hypomorphic, therefore with  
599 remaining NEMO activity, whereas  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mutations are true dominant mutations  
600 that abolish  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  degradation upon cell stimulation, blocking more severely the  
601 NF- $\kappa\text{B}$  activation process.

602 Recently, Mooster et al. [87] have generated a murine model of AD-EDA-ID by  
603 introducing in the mouse *Ikb $\alpha$*  gene a S32I mutation. The overall phenotype  
604 mimicked the human pathology, with defective responses to TNF- $\alpha$  or TLRs, but an  
605 additional effect of the mutation was observed. Defective secondary lymphoid  
606 organogenesis was noticed with a lack of lymph nodes, Peyer's patches, and splenic  
607 marginal zones. This suggested an effect of the mutation on the non-canonical  
608 pathway of NF- $\kappa\text{B}$  activation. Accordingly, stimulation of lymphoid tissue inducer  
609 cells and MEFs with  $\beta$ -lymphotoxin was severely impaired because of both  
610 defective  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  degradation and very reduced p100 amount. The observation that  
611  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mutants interfere with proper activation of the non-canonical pathway of NF-  
612  $\kappa\text{B}$  activation may have an important clinical impact. Indeed, this may explain why  
613 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), which is often used to  
614 treat EDA-ID patients, is poorly effective in cases of AD-EDA-ID. Most likely,  
615 only replacing hematopoietic cells may not be sufficient to fully correct the immune  
616 deficiency of AD-EDA-ID patients since lymphoid organogenesis is affected as  
617 well. It remains to be firmly established whether AD-EDA-ID patients indeed  
618 present defective lymphoid organogenesis. In support of this tonsils and cervical  
619 lymph nodes have been noted to be absent in at least one patient.

620 Mutations of both *NEMO* and *Ikb $\alpha$*  as a cause of EDA-ID in humans confirm  
621 in vivo the participation of these two components in the same signaling pathways.  
622 Nevertheless, how NF- $\kappa\text{B}$  signaling is impaired in each case is biochemically quite  
623 distinct. In *NEMO*-mutated patients generating EDA-ID, the overall catalytic  
624 activity of IKK is reduced but not abolished. Therefore, the various substrates of  
625 IKK, among them the members of the  $\text{I}\kappa\text{B}$  family of inhibitors, are putatively  
626 affected to the same extent. In the case of mutations affecting  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , degradation of  
627 the other  $\text{I}\kappa\text{B}$  inhibitors is still properly controlled. The similitude between *NEMO*-  
628 and *Ikb $\alpha$* -related EDA-IDs indicates that  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  is indeed a prime target of IKK in  
629 many distinct tissues, among them the hematopoietic compartment and the skin  
630 appendages. It also confirms that other properly regulated  $\text{I}\kappa\text{B}$ /NF- $\kappa\text{B}$  complexes  
631 cannot overcome its function in controlling the activity of specific NF- $\kappa\text{B}$  subunits.



## 2.5 P105-Related Genetic Disease (Common Variable Immunodeficiency)

P105 is the precursor of subunit p50 that forms with RelA the main dimeric species controlled by the canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation.

It has been shown that common variable immunodeficiency (CVID), a heterogenous syndrome characterized by recurrent infections and low antibody levels, can be caused by mutations of *NFKB1*, the gene encoding p105 [88]. In one large family including affected cases over three generations, a large range of highly variable immune response abnormalities was observed. Patients could present an infection-only phenotype or a much more severe condition with lymphoproliferation, lung disease, autoimmune cytopenia, and enteropathy. Moderate to severe hypogammaglobulinemia was also observed.

A genetic linkage study first identified an 18.7-Mbp region on 4q24 as carrying the mutation [89]. Upon whole exome sequencing, a heterozygous mutation of the splice donor site of exon 8 was found, causing aberrant in-frame splicing from exon 7 to exon 9. Elimination of the 159 coding nucleotides of exon 8 results in an internal deletion of 53 aa (Asp191 to Lys244) located in the Rel homology domain (RHD) of p105 (see Fig. 2.5). Patients derived EBV-transformed B cells exhibited a reduction in the amount of both p105 and p50 to approximately 50 %, indicating a severe destabilization caused by the mutation. Only traces of truncated p105 but not of truncated p50 were detected. Consequently, upon PMA/ionomycin treatment, a 50 % reduction in p50 nuclear translocation was observed. From this, it could be concluded that CVID in this family was caused by haploinsufficiency of p50.

Subsequent targeted next-generation sequencing/whole exome sequencing identified two other families with CVID caused by *NFKB1* mutations. Like with the first studied family, a high variability of immune defects was observed. In both cases, the syndrome was associated with haploinsufficiency of p50 also. In the first one, a heterozygous in-frame skipping of exon 9 was found, again introducing a short deletion (Lys244 to Asp279) in the RHD of p105/p50 proteins and their destabilization. In the second one, a heterozygous frameshift mutation affecting amino acid Ala156 of the RHD produced a severely truncated and undetectable p105 protein.

Several individuals of a same family exhibiting a complex syndrome including bone and joints defects, ectodermal dysplasia, hypergammaglobulinemia, and sterile inflammation were also recently reported as displaying a heterozygous mutation in *NFKB1*. This mutation introduces a stop codon (W11E) at the beginning of the coding sequence of p105/p50 [90]. Because of the very short size of the protein produced, this should result in a 50 % reduced expression of the protein like in cases described above. How haploinsufficiency of p50 in this case may generate such complex phenotype, especially involving bones, remains unclear.

## 2.6 RelA-Related Genetic Disease (High Bone Mass Syndrome)

RelA forms with p50 the prototypic and widely expressed NF- $\kappa$ B dimer that is induced following IKK activation. It contains, in contrast to p50, a potent trans-activation domain (TAD).

A male patient bearing a heterozygous missense mutation of *RELA* substituting in the RelA protein Asp512 with a serine residue was recently identified [91] (Fig. 2.5). He died at very young age from unknown cause precluding any analysis of its immune system. Upon autopsy, bone abnormalities were detected with a high bone mass (HBM) syndrome. In this specific case, HBM would result from increased bone formation rather than more usual osteopetrosis caused by impaired number or function of osteoclasts.

The mutation is located in the linker sequence between TAD1 and TAD2, the two subdomains of RelA TAD. Since induction of RelA transcriptional activity requires phosphorylations of serines and threonines at neighboring residues (Thr505, Ser529, and Ser536), interference in this process may be caused by appearance at aa 512 of a new serine residue. More difficult to understand is the very restricted phenotype of this patient (but again the cause of death was not defined), which concerns exclusively bones with a peculiar form of osteopetrosis and results from a heterozygous mutation. One can only speculate on a possible bone-related gene-specific effect involving either impaired p50/RelA (or even c-rel/RelA) heterodimers or RelA/RelA homodimers [92, 93].

## References

1. Landy SJ, Donnai D (1993) Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J Med Genet* 30(1):53–59
2. Berlin AL, Paller AS, Chan LS (2002) Incontinentia pigmenti: a review and update on the molecular basis of pathophysiology. *J Am Acad Dermatol* 47(2):169–187
3. Happle R (1985) Lyonization and the lines of Blaschko. *Hum Genet* 70(3):200–206
4. Bergendal B (2014) Orofacial manifestations in ectodermal dysplasia—a review. *Am J Med Genet A* 164A(10):2465–2471
5. O’Doherty M, Mc Creery K, Green AJ, Tuwir I, Brosnahan D (2011) Incontinentia pigmenti—ophthalmological observation of a series of cases and review of the literature. *Br J Ophthalmol* 95(1):11–16
6. Meuwissen ME, Mancini GM (2012) Neurological findings in incontinentia pigmenti; a review. *Eur J Med Genet* 55(5):323–331
7. Smahi A, Hyden-Granskog C, Peterlin B, Vabres P, Heuertz S, Fulchignoni-Lataud MC, Dahl N, Labrune P, Le Marec B, Piussan C et al (1994) The gene for the familial form of incontinentia pigmenti (IP2) maps to the distal part of Xq28. *Hum Mol Genet* 3(2):273–278
8. Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuertz S, Munnich A, Israël A, Heiss NS, Klauck SM, Kioschis P et al (2000) Genomic rearrangement in NEMO impairs NF- $\kappa$ B activation and is a cause of incontinentia pigmenti. *Nature* 405(6785):466–472

9. Fusco F, Mercadante V, Miano MG, Ursini MV (2006) Multiple regulatory regions and tissue-specific transcription initiation mediate the expression of NEMO/IKK $\gamma$  gene. *Gene* 383:99–107
10. Martini G, Ursini MV (1996) A new lease of life for an old enzyme. *BioEssays* 18(8):631–637
11. Fusco F, Paciolla M, Pescatore A, Lioi MB, Ayuso C, Faravelli F, Gentile M, Zollino M, D'Urso M, Miano MG et al (2009) Microdeletion/duplication at the Xq28 IP locus causes a de novo IKBKG/NEMO/IKK $\gamma$  exon4\_10 deletion in families with Incontinentia Pigmenti. *Hum Mutat* 30(9):1284–1291
12. Fusco F, D'Urso M, Miano MG, Ursini MV (2010) The LCR at the IKBKG locus is prone to recombine. *Am J Hum Genet* 86(4):650–652
13. Fusco F, Paciolla M, Napolitano F, Pescatore A, D'Addario I, Bal E, Lioi MB, Smahi A, Miano MG, Ursini MV (2012) Genomic architecture at the Incontinentia Pigmenti locus favours de novo pathological alleles through different mechanisms. *Hum Mol Genet* 21(6):1260–1271
14. Aradhya S, Bardaro T, Galgóczy P, Yamagata T, Esposito T, Patlan H, Ciccodicola A, Munnich A, Kenwick S, Platzer M et al (2001) Multiple pathogenic and benign genomic rearrangements occur at a 35 kb duplication involving the NEMO and LAGE2 genes. *Hum Mol Genet* 10(22):2557–2567
15. Conte MI, Pescatore A, Paciolla M, Esposito E, Miano MG, Lioi MB, McAleer MA, Giardino G, Pignata C, Irvine AD et al (2014) Insight into IKBKG/NEMO locus: report of new mutations and complex genomic rearrangements leading to incontinentia pigmenti disease. *Hum Mutat* 35(2):165–177
16. Fusco F, Bardaro T, Fimiani G, Mercadante V, Miano MG, Falco G, Israël A, Courtois G, D'Urso M, Ursini MV (2004) Molecular analysis of the genetic defect in a large cohort of IP patients and identification of novel NEMO mutations interfering with NF- $\kappa$ B activation. *Hum Mol Genet* 13(16):1763–1773
17. Rushe M, Silvian L, Bixler S, Chen LL, Cheung A, Bowes S, Cuervo H, Berkowitz S, Zheng T, Guckian K et al (2008) Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site. *Structure* 16(5):798–808
18. Sebban-Benin H, Pescatore A, Fusco F, Pascuale V, Gautheron J, Yamaoka S, Moncla A, Ursini MV, Courtois G (2007) Identification of TRAF6-dependent NEMO polyubiquitination sites through analysis of a new NEMO mutation causing incontinentia pigmenti. *Hum Mol Genet* 16(23):2805–2815
19. Gautheron J, Pescatore A, Fusco F, Esposito E, Yamaoka S, Agou F, Ursini MV, Courtois G (2010) Identification of a new NEMO/TRAF6 interface affected in incontinentia pigmenti pathology. *Hum Mol Genet* 19(16):3138–3149
20. Parrish JE, Scheuerle AE, Lewis RA, Levy ML, Nelson DL (1996) Selection against mutant alleles in blood leukocytes is a consistent feature in Incontinentia Pigmenti type 2. *Hum Mol Genet* 5(11):1777–1783
21. Makris C, Godfrey VL, Krähn-Sentfleben G, Takahashi T, Roberts JL, Schwarz T, Feng L, Johnson RS, Karin M (2000) Female mice heterozygous for IKK $\gamma$ /NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5(6):969–979
22. Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G, Addicks K, Israël A, Rajewsky K, Pasparakis M (2000) NEMO/IKK $\gamma$ -deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5(6):981–992
23. Nenci A, Huth M, Funteh A, Schmidt-Supprian M, Bloch W, Metzger D, Chambon P, Rajewsky K, Krieg T, Haase I, Pasparakis M (2006) Skin lesion development in a mouse model of incontinentia pigmenti is triggered by NEMO deficiency in epidermal keratinocytes and requires TNF signaling. *Hum Mol Genet* 15(4):531–542
24. Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gillitzer R, Israel A et al (2002) TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417(6891):861–866

- 765 25. Kumari S, Bonnet MC, Ulvmar MH, Wolk K, Karagianni N, Witte E, Uthoff-Hachenberg C,  
766 Renauld JC, Kollias G, Toftgard R et al (2013) Tumor necrosis factor receptor signaling in  
767 keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice.  
768 *Immunity* 39(5):899–911
- 769 26. Stratis A, Pasparakis M, Rupec RA, Markur D, Hartmann K, Scharffetter-Kochanek K,  
770 Peters T, van Rooijen N, Krieg T, Haase I (2006) Pathogenic role for skin macrophages in a  
771 mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 116  
772 (8):2094–2104
- 773 27. Jean-Baptiste S, O’Toole EA, Chen M, Guitart J, Paller A, Chan LS (2002) Expression of  
774 eotaxin, an eosinophil-selective chemokine, parallels eosinophil accumulation in the  
775 vesiculobullous stage of incontinentia pigmenti. *Clin Exp Immunol* 127(3):470–478
- 776 28. Bodak N, Hadj-Rabia S, Hamel-Teillac D, de Prost Y, Bodemer C (2003) Late recurrence of  
777 inflammatory first-stage lesions in incontinentia pigmenti: an unusual phenomenon and a  
778 fascinating pathologic mechanism. *Arch Dermatol* 139(2):201–204
- 779 29. Oster SF, McLeod DS, Otsuji T, Goldberg MF, Luty GA (2009) Preliminary ocular  
780 histopathological observations on heterozygous NEMO-deficient mice. *Exp Eye Res* 88  
781 (3):613–616
- 782 30. Ridder DA, Wenzel J, Müller K, Töllner K, Tong XK, Assmann JC, Stroobants S, Weber T,  
783 Niturad C, Fischer L et al (2015) Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the  
784 neurovascular unit. *J Exp Med* pii: jem.20150165
- 785 31. Chen CJ, Han IC, Tian J, Muñoz B, Goldberg MF (2015) Extended follow-up of treated and  
786 untreated retinopathy in incontinentia pigmenti: analysis of peripheral vascular changes and  
787 incidence of retinal detachment. *JAMA Ophthalmol* 133(5):542–548
- 788 32. Wolf DS, Golden WC, Hoover-Fong J, Applegate C, Cohen BA, Germain-Lee EL,  
789 Goldberg MF, Crawford TO, Gauda EB (2015) High-dose glucocorticoid therapy in the  
790 management of seizures in neonatal incontinentia pigmenti: a case report. *J Child Neurol* 30  
791 (1):100–106
- 792 33. Pizzamiglio MR, Piccardi L, Bianchini F, Canzano L, Palermo L, Fusco F, D’Antuono G,  
793 Gelmini C, Garavelli L, Ursini MV (2014) Incontinentia pigmenti: learning disabilities are a  
794 fundamental hallmark of the disease. *PLoS ONE* 29 9(1):e87771
- 795 34. Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA,  
796 Wara DW, Emmal SA et al (2000) A novel X-linked disorder of immune deficiency and  
797 hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in  
798 *IKK- $\gamma$*  (NEMO). *Am J Hum Genet* 67(6):1555–1562
- 799 35. Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C,  
800 Kenwick S, Dupuis-Girod S, Blanche S et al (2001) X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia  
801 with immunodeficiency is caused by impaired NF- $\kappa$ B signaling. *Nat Genet* 27(3):277–285
- 802 36. Aradhya S, Courtois G, Rajkovic A, Lewis RA, Levy M, Israël A, Nelson DL (2001) Atypical  
803 forms of incontinentia pigmenti in male individuals result from mutations of a cytosine tract in  
804 exon 10 of NEMO (*IKK- $\gamma$* ). *Am J Hum Genet* 68(3):765–771
- 805 37. Jain A, Ma CA, Liu S, Brown M, Cohen J, Strober W (2001) Specific missense mutations in  
806 NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol*  
807 2(3):223–228
- 808 38. Puel A, Picard C, Ku CL, Smahi A, Casanova JL (2004) Inherited disorders of NF-  
809  $\kappa$ B-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol* 16(1):34–41
- 810 39. Kawai T, Nishikomori R, Heike T (2012) Diagnosis and treatment in anhidrotic ectodermal  
811 dysplasia with immunodeficiency. *Allergol Int* 61(2):207–217
- 812 40. Orange JS, Brodeur SR, Jain A, Bonilla FA, Schneider LC, Kretschmer R, Nurko S,  
813 Rasmussen WL, Köhler JR, Gellis SE et al (2002) Deficient natural killer cell cytotoxicity in  
814 patients with *IKK- $\gamma$* /NEMO mutations. *J Clin Invest* 109(11):1501–1509
- 815 41. Mikkola ML (2009) Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med*  
816 *Genet A* 149A(9):2031–2036
- 817 42. Sadier A, Viriot L, Pantalacci S, Laudet V (2014) The ectodysplasin pathway: from diseases to  
818 adaptations. *Trends Genet* 30(1):24–31



- 819 43. Heaton DJ, Emmal SA, Ferguson BM, Tucker AS, Justice MJ, Sharpe PT, Zonana J,  
820 Overbeek PA (2001) Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in  
821 development. *Nature* 414(6866):913–916
- 822 44. Yan M, Zhang Z, Brady JR, Schilbach S, Fairbrother WJ, Dixit VM (2002) Identification of a  
823 novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A receptor that is mutated  
824 in crinkled mice. *Curr Biol* 12(5):409–413
- 825 45. Morlon A, Munnich A, Smahi A (2005) TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF- $\kappa$ B  
826 activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptor Edaradd. *Hum Mol Genet* 14  
827 (23):3751–3757
- 828 46. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA,  
829 Alitalo K, Finegold DN (2000) Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in  
830 primary lymphoedema. *Nat Genet* 25(2):153–159
- 831 47. Irrthum A, Karkkainen MJ, Devriendt K, Alitalo K, Vikkula M (2000) Congenital hereditary  
832 lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *Am J Hum Genet*  
833 67(2):295–301
- 834 48. Leibbrandt A, Penninger JM (2008) RANK/RANKL: regulators of immune responses and  
835 bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 1143:123–150
- 836 49. Flister MJ, Wilber A, Hall KL, Iwata C, Miyazono K, Nisato RE, Pepper MS, Zawieja DC,  
837 Ran S (2010) Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3  
838 mediated by NF- $\kappa$ B and Prox1. *Blood* 115(2):418–429
- 839 50. Du Q, Jiang L, Wang X, Wang M, She F, Chen Y (2014) Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes  
840 the lymphangiogenesis of gallbladder carcinoma through nuclear factor- $\kappa$ B-mediated  
841 upregulation of vascular endothelial growth factor-C. *Cancer Sci* 105(10):1261–1271
- 842 51. Hanson EP, Monaco-Shawver L, Solt LA, Madge LA, Banerjee PP, May MJ, Orange JS  
843 (2008) Hypomorphic nuclear factor- $\kappa$ B essential modulator mutation database and  
844 reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. *J Allergy Clin*  
845 *Immunol* 122(6):1169–1177
- 846 52. Fusco F, Pescatore A, Bal E, Ghouli A, Paciolla M, Lioi MB, D’Urso M, Rabia SH,  
847 Bodemer C, Bonnefont JP et al (2008) Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update  
848 and a report of 13 novel mutations. *Hum Mutat* 29(5):595–604
- 849 53. Zak DE, Schmitz F, Gold ES, Diercks AH, Peschon JJ, Valvo JS, Niemistö A, Podolsky I,  
850 Fallen SG, Suen R et al (2011) Systems analysis identifies an essential role for  
851 SHANK-associated RH domain-interacting protein (SHARPIN) in macrophage Toll-like  
852 receptor 2 (TLR2) responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(28):11536–11541
- 853 54. Vinolo E, Sebban H, Chaffotte A, Israël A, Courtois G, Véron M, Agou F (2006) A point  
854 mutation in NEMO associated with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency  
855 pathology results in destabilization of the oligomer and reduces lipopolysaccharide- and tumor  
856 necrosis factor-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 281(10):6334–6348
- 857 55. Puel A, Reichenbach J, Bustamante J, Ku CL, Feinberg J, Döffinger R, Bonnet M,  
858 Filipe-Santos O, de Beaucoudrey L, Durandy A et al (2006) The NEMO mutation creating the  
859 most-upstream premature stop codon is hypomorphic because of a reinitiation of translation.  
860 *Am J Hum Genet* 78(4):691–701
- 861 56. Fish JD, Duerst RE, Gelfand EW, Orange JS, Bunin N (2009) Challenges in the use of  
862 allogeneic hematopoietic SCT for ectodermal dysplasia with immune deficiency. *Bone*  
863 *Marrow Transpl* 43(3):217–221
- 864 57. Permaul P, Narla A, Hornick JL, Pai SY (2009) Allogeneic hematopoietic stem cell  
865 transplantation for X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency: case report and  
866 review of outcomes. *Immunol Res* 44(1–3):89–98
- 867 58. Abbott JK, Quinones RR, de la Morena MT, Gelfand EW (2014) Successful hematopoietic  
868 cell transplantation in patients with unique NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) mutations.  
869 *Bone Marrow Transpl* 49(11):1446–1447
- 870 59. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A,  
871 Neufert C, Madison B et al (2007) Epithelial NEMO links innate immunity to chronic  
872 intestinal inflammation. *Nature* 446(7135):557–561

- 873 60. Kowalczyk-Quintas C, Schneider P (2014) Ectodysplasin A (EDA)—EDA receptor signalling  
874 and its pharmacological modulation. *Cytokine Growth Factor Rev* 25(2):195–203
- 875 61. Tobin E, Rohwedder A, Holland SM, Philips B, Carlson JA (2003) Recurrent ‘sterile’  
876 verrucous cyst abscesses and epidermodysplasia verruciformis-like eruption associated with  
877 idiopathic CD4 lymphopenia. *Br J Dermatol* 149(3):627–633
- 878 62. Orange JS, Levy O, Brodeur SR, Krzewski K, Roy RM, Niemela JE, Fleisher TA, Bonilla FA,  
879 Geha RS (2004) Human nuclear factor kappa B essential modulator mutation can result in  
880 immunodeficiency without ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 114(3):650–656
- 881 63. Niehues T, Reichenbach J, Neubert J, Gudowius S, Puel A, Horneff G, Laiñka E, Dirksen U,  
882 Schroten H, Döffinger R et al (2004) Nuclear factor κB essential modulator-deficient child  
883 with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol*  
884 114(6):1456–1462
- 885 64. Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, Vinolo E, Ku CL, Puel A, Frucht DM,  
886 Christel K, von Bernuth H, Jouanguy E et al (2006) X-linked susceptibility to mycobacteria is  
887 caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med* 203  
888 (7):1745–1759
- 889 65. Ku CL, Dupuis-Girod S, Dittrich AM, Bustamante J, Santos OF, Schulze I, Bertrand Y,  
890 Couly G, Bodemer C, Bossuyt X et al (2005) NEMO mutations in 2 unrelated boys with  
891 severe infections and conical teeth. *Pediatrics* 115(5):e615–e619
- 892 66. Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, Henneke P, Rensing-Ehl A, Rizzi M, Janda A, Hese K,  
893 Schlesier M, Holzmann K et al (2013) Deficiency of innate and acquired immunity caused by  
894 an IKBKB mutation. *N Engl J Med* 369(26):2504–2514
- 895 67. Burns SO, Plagnol V, Gutierrez BM, Al Zahrani D, Curtis J, Gaspar M, Hassan A, Jones AM,  
896 Malone M, Rampling D et al (2014) Immunodeficiency and disseminated mycobacterial  
897 infection associated with homozygous nonsense mutation of IKKβ. *J Allergy Clin Immunol*  
898 134(1):215–218
- 899 68. Mousallem T, Yang J, Urban TJ, Wang H, Adeli M, Parrott RE, Roberts JL, Goldstein DB,  
900 Buckley RH, Zhong XP (2014) A nonsense mutation in IKBKB causes combined  
901 immunodeficiency. *Blood* 124(13):2046–2050
- 902 69. Nielsen C, Jakobsen MA, Larsen MJ, Müller AC, Hansen S, Lillevang ST, Fisker N,  
903 Barington T (2014) Immunodeficiency associated with a nonsense mutation of IKBKB. *J Clin*  
904 *Immunol* 34(8):916–921
- 905 70. Lahtela J, Nousiainen HO, Stefanovic V, Tallila J, Viskari H, Karikoski R, Gentile M,  
906 Saloranta C, Varilo T, Salonen R et al (2010) Mutant CHUK and severe fetal encasement  
907 malformation. *N Engl J Med* 363(17):1631–1637
- 908 71. Stevenson RE, Saul RA, Collins J, Davis WM, Lanford C (1987) Cocoon fetus—fetal  
909 encasement secondary to ectodermal dysplasia. *Proc Greenwood Genet Center* 6:10–15
- 910 72. Leslie EJ, O’Sullivan J, Cunningham ML, Singh A, Goudy SL, Ababneh F, Alsubaie L, Ch’ng  
911 GS, van der Laar IM, Hooeboom AJ et al (2015) Expanding the genetic and phenotypic  
912 spectrum of popliteal pterygium disorders. *Am J Med Genet A* 167A(3):545–552
- 913 73. Sil AK, Maeda S, Sano Y, Roop DR, Karin M (2004) IκB kinase-α acts in the epidermis to  
914 control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature* 428(6983):660–664
- 915 74. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M (2001) IKKα controls formation of the  
916 epidermis independently of NF-κB. *Nature* 410(6829):710–714
- 917 75. Bartsocas CS, Papas CV (1972) Popliteal pterygium syndrome. Evidence for a severe  
918 autosomal recessive form. *Med Genet* 9:222–226
- 919 76. Mitchell K, O’Sullivan J, Missero C, Blair E, Richardson R, Anderson B, Antonini D,  
920 Murray JC, Shanske AL, Schutte BC et al (2012) Exome sequence identifies RIPK4 as the  
921 Bartsocas-Papas syndrome locus. *Am J Hum Genet* 90(1):69–75
- 922 77. Kalay E, Sezgin O, Chellappa V, Mutlu M, Morsy H, Kayserili H, Kreiger E, Cansu A,  
923 Toraman B, Abdalla EM et al (2012) Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form  
924 of popliteal pterygium syndrome. *Am J Hum Genet* 90(1):76–85

- 925 78. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002) RIP4 (DIK/PKK), a novel  
926 member of the RIP kinase family, activates NF- $\kappa$ B and is processed during apoptosis. *EMBO*  
927 *Rep* 3(12):1201–1208
- 928 79. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de  
929 Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A et al (2002) Mutations in IRF6 cause Van der Woude and  
930 popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32(2):285–289
- 931 80. De Groot P, Tran HT, Fransen M, Tanghe G, Urwyler C, De Craene B, Leurs K, Gilbert B,  
932 Van Imschoot G, De Rycke R et al (2015) A novel RIPK4-IRF6 connection is required to  
933 prevent epithelial fusions characteristic for popliteal pterygium syndromes. *Cell Death Differ*  
934 22(6):1012–1024
- 935 81. Richardson RJ, Hammond NL, Coulombe PA, Saloranta C, Nousiainen HO, Salonen R,  
936 Berry A, Hanley N, Headon D, Karikoski R et al (2014) Periderm prevents pathological  
937 epithelial adhesions during embryogenesis. *J Clin Invest* 124(9):3891–3900
- 938 82. Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Döffinger R, Cancrini C, Bonnet M, Puel A,  
939 Chable-Bessia C, Yamaoka S, Feinberg J et al (2003) A hypermorphic I $\kappa$ B $\alpha$  mutation is  
940 associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell  
941 immunodeficiency. *J Clin Invest* 112(7):1108–1115
- 942 83. Janssen R, van Wengen A, Hoeve MA, ten Dam M, van der Burg M, van Dongen J, van de  
943 Vosse E, van Tol M, Bredius R, Ottenhoff TH et al (2004) The same I $\kappa$ B $\alpha$  mutation in two  
944 related individuals leads to completely different clinical syndromes. *J Exp Med* 200(5):559–  
945 568
- 946 84. McDonald DR, Mooster JL, Reddy M, Bawle E, Secord E, Geha RS (2007) Heterozygous  
947 N-terminal deletion of I $\kappa$ B $\alpha$  results in functional nuclear factor  $\kappa$ B haploinsufficiency,  
948 ectodermal dysplasia, and immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 120(4):900–907
- 949 85. Giancane G, Ferrari S, Carsetti R, Papoff P, Iacobini M, Duse M (2013) Anhidrotic ectodermal  
950 dysplasia: a new mutation. *J Allergy Clin Immunol* 132(6):1451–1453
- 951 86. Schimke LF, Rieber N, Rylaarsdam S, Cabral-Marques O, Hubbard N, Puel A, Kallmann L,  
952 Sombke SA, Notheis G, Schwarz HP et al (2013) A novel gain-of-function *IKBA* mutation  
953 underlies ectodermal dysplasia with immunodeficiency and polyendocrinopathy. *J Clin*  
954 *Immunol* 33(6):1088–1099
- 955 87. Mooster JL, Le Bras S, Massaad MJ, Jabara H, Yoon J, Galand C, Heesters BA, Burton OT,  
956 Mattoo H, Manis J et al (2015) Defective lymphoid organogenesis underlies the immune  
957 deficiency caused by a heterozygous S32I mutation in I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Exp Med* 212(2):185–202
- 958 88. Fliegaut M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K, Winzer S, Bulashevskaya A,  
959 Scerri T, Leung E (2015) Haploinsufficiency of the NF- $\kappa$ B1 subunit p50 in common variable  
960 immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 97(3):389–403
- 961 89. Finck A, Van der Meer JW, Schäffer AA, Pfannstiel J, Fieschi C, Plebani A, Webster AD,  
962 Hammarström L, Grimbacher B (2006) Linkage of autosomal-dominant common variable  
963 immunodeficiency to chromosome 4q. *Eur J Hum Genet* 14(7):867–875
- 964 90. Oberle EJ, Verbsky JW, Routes J, Hintermeyer M, Worthey E, Dasu T, Bengtson C,  
965 Buzzell A (2014) A172: metaphyseal chondrodysplasia, ectodermal dysplasia, short stature,  
966 hypergammaglobulinemia, and spontaneous inflammation without infections in an extended  
967 family due to mutation in *NFKB1A*. *Arthritis Rheumatol* 66(Suppl 11):S224–S225
- 968 91. Frederiksen AL, Larsen MJ, Brusgaard K, Novack DV, Knudsen PJ, Schröder HD, Qiu W,  
969 Eckhardt C, McAlister WH, Kassem M et al (2015) Neonatal high bone mass with first  
970 mutation of the NF- $\kappa$ B complex: Heterozygous de novo missense (p.Asp512Ser) *RELA*  
971 (*Rela*/p65. *J Bone Miner Res*. doi:10.1002/jbmr.2590 (July 14)
- 972 92. Hoffmann A, Leung TH, Baltimore D (2003) Genetic analysis of NF- $\kappa$ B/Rel transcription  
973 factors defines functional specificities. *EMBO J* 22(20):5530–5539
- 974 93. Tsui R, Keams JD, Lynch C, Vu D, Ngo KA, Basak S, Ghosh G, Hoffmann A (2015) I $\kappa$ B $\beta$   
975 enhances the generation of the low-affinity NF $\kappa$ B/RelA homodimer. *Nat Commun* 6:7068



# Chapter 5

## Lessons Learned from Studying NF- $\kappa$ B-Related Genetic Diseases

Gilles Courtois, Alessandra Pescatore, Jérémie Gautheron, Francesca Fusco, Anna Senegas and Matilde Valeria Ursini

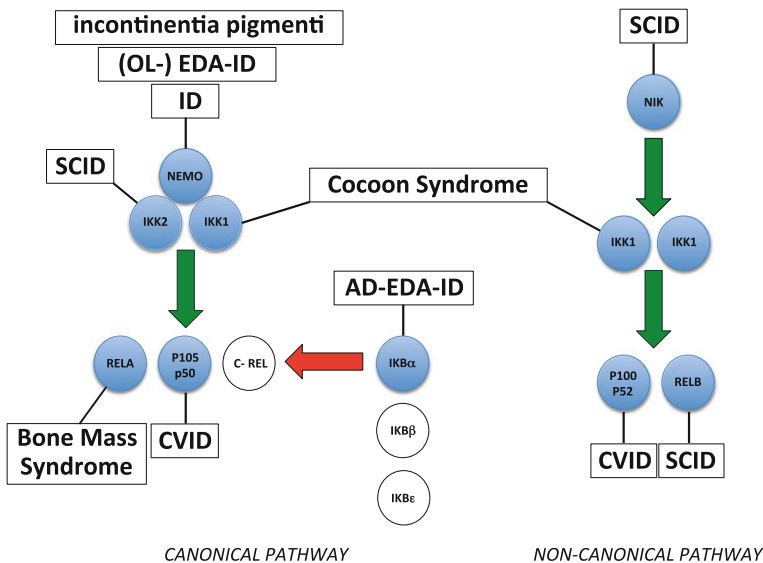
**Abstract** The inherited diseases caused by impaired NF- $\kappa$ B signaling display a broad range of abnormalities affecting the immune and vascular systems, the skin, the bones, and the central nervous system (CNS). On one side, this allows to compare these abnormalities with those observed in mouse strains affected for the same components and, on the other, to assign specific defects in humans to discrete molecular impairment. All these information should contribute to the design and validation of the therapeutic treatments.

**Keywords** ■■■

Since its discovery in 1986 [1], NF- $\kappa$ B has been one of the most studied transcription factors, due to its central role in inflammation, immunity, control of cell death, or proliferation, and the molecular characterization of its various modes of activation has been accomplished with an unprecedented amount of details. Although some components might still be missing in the core signaling machinery or, more likely, in specific inducing pathways, an extensive biochemical characterization of NF- $\kappa$ B regulators through in vitro or cell assays has been achieved. In addition, studies with cells have provided glimpses of pathways and genes that may be under NF- $\kappa$ B control.

Following the identification of NF- $\kappa$ B components, mice have been engineered to perturb their function and to determine their physiological relevance at the organismal level. This has been a way to formally demonstrate the importance of previously identified NF- $\kappa$ B-dependent pathways in a complex cell environment and to analyze how these pathways would react in situ to modified conditions to trigger various physiological processes.

The third stage of the rocket has been the identification of inherited diseases in humans, the topic of this book (Fig. 5.1). Clearly, defining how NF- $\kappa$ B functions in the human body brings invaluable information when treatments are envisioned. On one hand, any confirmation of observations previously made in the mouse validates this animal as an adequate model system and fuels basic or translational research. On the other, differences between humans and mice bring new questions regarding basic biological processes and can suggest new experimental avenues not anticipated from



**Fig. 5.1** An overview of the genetic diseases caused by mutations of NF- $\kappa$ B components. (OL-) EDA-ID: anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (associated or not with osteopetrosis and lymphedema), ID: immunodeficiency, SCID: severe complex immunodeficiency, AD-EDA-ID: autosomal dominant EDA-ID, and CVID: complex variable immunodeficiency. *Green arrow* indicates a positive effect, whereas a *red arrow* indicates a negative effect. Mutations of *c-rel*, *I $\kappa$ B $\beta$* , and *I $\kappa$ B $\epsilon$*  in humans have not been identified so far

36 mouse studies. All this is especially relevant in the case of the NF- $\kappa$ B pathway since  
 37 a fierce controversy has recently emerged regarding the use of mice to study the  
 38 inflammation processes and to translate this knowledge to humans [2–6].

39 In this chapter, we will try to answer the following questions: What have we  
 40 learned at this stage regarding the data generated from human genetics? Can they be  
 41 compared to mouse data? Did they reveal new functions of NF- $\kappa$ B? What are the  
 42 outstanding issues remaining regarding NF- $\kappa$ B functions in humans?

43 First, from what is summarized in the previous chapters, any person working in  
 44 the NF- $\kappa$ B field of research will recognize his/her favorite pathway. Indeed, several  
 45 observed defects could have been easily predicted from the molecular and cellular  
 46 knowledge of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. For instance, NF- $\kappa$ B is a key player in  
 47 immunity, and indeed most NF- $\kappa$ B-related genetic diseases are associated with  
 48 immunodeficiencies, sometimes severe and with life-threatening consequences. The  
 49 broad range of identified defects ranging from perturbed innate immunity to diverse  
 50 abnormalities of T and B cells and even autoimmunity fits quite well with the  
 51 distinct established functions of each mutated component. In this specific case,  
 52 study of immune defects and attempts to correct them using established mouse  
 53 strains will certainly be of great benefit. Subtle differences are nevertheless worth  
 54 noting and will require a careful re-evaluation in the mouse. For instance,  $\gamma\delta$  T cells  
 55 were shown to be absent in IKK2 SCID patients [7], NK cell defects were observed

56 in NIK-mutated patients [8], and a negative effect of RelB on TCR signaling  
57 through the canonical pathway of NF- $\kappa$ B has been detected [9].

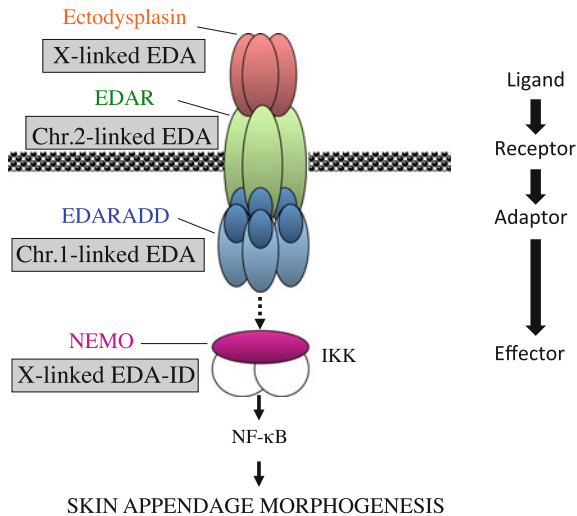
58 The tight relationship existing between deregulated NF- $\kappa$ B functions and  
59 immune defects, confirmed in humans, strongly suggests that the genetic charac-  
60 terization of inherited immunodeficiencies will continue to be a treasure trove for  
61 identifying patients with impaired NF- $\kappa$ B activation. In particular, CVID, with its  
62 estimated incidence of 1/10,000–50,000 and a genetic basis elucidated in only 10 %  
63 of patients, will represent a rich source of additional mutants of NIK, p100, p105, or  
64 even RelA but, more importantly, may allow identification of the first c-rel-, I $\kappa$ B $\beta$ -,  
65 or I $\kappa$ B $\epsilon$ -mutated patients. The genetic basis of SCID syndromes is more fully  
66 understood, but new patients bearing mutations of NF- $\kappa$ B components will also be  
67 identified.

68 Second, skin defects have been observed in several instances emphasizing the  
69 critical role played by NF- $\kappa$ B in skin homeostasis. Early studies in mice have  
70 revealed that activation of NF- $\kappa$ B in the skin induced by invalidation of I $\kappa$ B $\alpha$  was  
71 associated with inflammation [10, 11]. The same was observed when a constitu-  
72 tively active version of IKK2 was expressed in the epidermis [12]. Quite remark-  
73 ably, a similar inflammatory phenotype is observed in IP, the disease caused by  
74 *NEMO* mutations showing in this case impaired NF- $\kappa$ B activation. This indicates  
75 the exquisite sensitivity of skin to perturbation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.  
76 IP-related *NEMO* mutations were especially instrumental in this respect by  
77 revealing cross talks between mutant and wild-type cells not previously reported in  
78 the mouse because of the unique mosaic biological system studied. In many  
79 pathological situations, cells with impaired activity are indeed surrounded by  
80 wild-type cells of the same type. Although complex, this system is also based on the  
81 inactivation of the sole component of the canonical pathway that totally inhibits  
82 NF- $\kappa$ B activation.

83 In addition, analysis of *NEMO*-related pathologies have revealed a lack of skin  
84 appendage development in EDA-ID patients caused by hypomorphic *NEMO*  
85 mutations or autosomal dominant *IKBA* mutations and therefore impaired NF- $\kappa$ B  
86 signaling. This represents some kind of triumph in the full dissection of a develop-  
87 mental process through the exclusive identification of its components by human  
88 genetics (Fig. 5.2). Only later on, an additional player in this pathway, TRAF6, was  
89 identified when mice were carefully examined for skin appendage abnormalities [13].

90 Also worth mentioning here is the IKK-1-related skin phenotype of Cocoon  
91 syndrome that, most likely, does not involve NF- $\kappa$ B but provides another demon-  
92 stration that studying a human genetic disease, and in this specific case establishing  
93 its relationship to other genetic diseases, can help understanding a phenotype  
94 observed first in the mouse. As explained in Sect. 2.3, the skin phenotype (and other  
95 defects) of *IKK1*-mutated patients most likely reflect the contribution of this kinase  
96 in a pathway regulating periderm formation.

97 Third, another new function of NF- $\kappa$ B in humans has been revealed following  
98 the identification of *NEMO* as the gene causing EDA-ID. In very rare occasions,  
99 EDA-ID patients bearing *NEMO* mutations were found to also exhibit osteopet-  
100 rosis, characterized by excessive bone mass, and lymphedema, a syndrome



**Fig. 5.2** The ectodysplasin/EDAR signaling pathway. Genetic identification of mutated loci causing a lack of skin appendage development in humans allows reconstitution of a complete signaling pathway. Not included in the figure is I $\kappa$ B $\alpha$ , the negative regulator of NF- $\kappa$ B, which has been shown to also cause anhidrotic ectodermal dysplasia when bearing a mutation inhibiting its phosphorylation by IKK. The *dark blue ovals* represent interacting death domains (DDs) of EDAR and EDARADD

101 involving the lymphatic system. The occurrence of osteopetrosis is not so surprising  
 102 because of the well-established participation of NF- $\kappa$ B in the receptor activator of  
 103 NF- $\kappa$ B (RANK) pathway that control bone resorption [14]. Interestingly, a bone  
 104 mass syndrome has also been associated with a *RELA* mutation (see Sect. 2.6), but  
 105 its etiology remains uncertain. In contrast, the lymphedema defect found in  
 106 OL-EDA patients was unpredicted. Although it is still unclear at this stage how  
 107 NF- $\kappa$ B dysfunction causes lymphedema (see the hypothesis evoked in Sect. 2.1.2.2)  
 108 and how the *NEMO* mutations causing OL-EDA-ID can be distinguished at the  
 109 functional level from the ones causing only EDA-ID, this also strengthens the  
 110 notion that analyzing NF- $\kappa$ B-related inherited diseases can provide new information  
 111 regarding NF- $\kappa$ B functions.

112 Fourth, elucidating the basis of the CNS abnormalities found in approximately  
 113 30 % of IP patients is likely to provide important new information regarding the  
 114 role played by NF- $\kappa$ B in the brain. As evoked in Sect. 2.1.1.3, it remains uncertain  
 115 how NF- $\kappa$ B functions in the brain, in particular in non-neuronal cells. A recent  
 116 publication from Schwaninger's laboratory [15] has demonstrated that NEMO  
 117 fulfills a specific protective role in blood vessels and proposed that dysfunction at  
 118 this level may be a trigger of the IP-related CNS abnormalities. It will be essential  
 119 to test this exciting hypothesis in more details since it may inspire new therapeutic  
 120 avenues.

121 Finally, the role of NF- $\kappa$ B in the developing liver represents an interesting issue  
122 re-activated by the human data. In the mouse, an important function of NF- $\kappa$ B is to  
123 protect the liver cells from death during embryogenesis. This has been revealed by  
124 using several distinct modes of NF- $\kappa$ B inhibition such as invalidation of RelA,  
125 IKK2, or NEMO. In each case, TNF- $\alpha$ -induced liver apoptosis results in death of  
126 the animals, which occurs at different time points because of more or less efficient  
127 inhibition of NF- $\kappa$ B signaling. In humans, the early disappearance of male IP  
128 fetuses has been attributed to the same cause, but so far no formal demonstration of  
129 this has been provided. The discovery of patients lacking IKK2 but surviving is  
130 striking in this respect since it indicates that either NF- $\kappa$ B signaling is not important  
131 in human liver development, in contrast to mouse, or compensation by IKK1  
132 subunit may occur, again something not operating in the mouse. Pannicke et al. [7]  
133 have proposed that this observation restrains the pessimistic view, mostly inferred  
134 from mouse studies, that using IKK2 inhibitors in therapeutics may be too dele-  
135 terious. Nevertheless, the key function of IKK2 in human immunity will remain an  
136 issue.

137 Among the important questions that identification of more NF- $\kappa$ B-related patients  
138 may help solving is how the three I $\kappa$ Bs differentially influence NF- $\kappa$ B activity. As  
139 said above, patients mutated in *IKBA* suffer from an autosomal dominant form of  
140 EDA-ID caused by mutations of phosphorylation sites. Most likely, this results from  
141 a broad negative effect on NF- $\kappa$ B induction. It can not be excluded that more subtle  
142 effects, immunity-associated, would be seen in the case of similar mutations, for-  
143 mally possible, affecting *IKBB* or *IKBE*. The effect of specifically inhibiting the  
144 degradation of I $\kappa$ B $\beta$  or I $\kappa$ B $\epsilon$  in the mouse has not been performed so far.

145 Moreover, the key question relative to the function specificity of NF- $\kappa$ B subunits  
146 should benefit from the discovery of more *RELA*-mutated patients and novel  
147 *C-REL*-mutated patients. Again, immune defects can be predicted, but not only if  
148 we consider the first *RELA*-mutated patient identified.

149 Finally, identification of hypomorphic/missense mutations of *IKKA* may reveal  
150 its true function in immunity. As shown in Fig. 5.1, IKK1 is supposed to be an  
151 essential participant in the non-canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation. Its partners  
152 in these pathways (NIK, p100, and RelB) have all been associated with SCID or  
153 CVID syndrome and to suffer, at least in the case of p100 and RelB, of autoim-  
154 munity. Would IKK1 hypomorphic mutations produce something similar? It would  
155 also be interesting to see the effect of such mutations on the canonical pathway of  
156 NF- $\kappa$ B activation.

157 Clearly, the identification of NF- $\kappa$ B-related genetic disease provides an alter-  
158 native way to apprehend this essential signal transduction pathway. By comple-  
159 menting studies made in the mouse and validating in humans concepts elaborated in  
160 this animal system or various cell systems, it allows the first drawing of integrated  
161 functions of NF- $\kappa$ B in humans. Not only this will help in the development of  
162 adapted treatments for rare diseases linked to NF- $\kappa$ B but this can also be considered  
163 as a very useful information source for ameliorating the consequences, or some-  
164 times even the primary cause, of more widely occurring pathologies such as cancer  
165 or inflammatory/immune diseases.



## References

166

167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206

1. Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5):705–716
2. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L et al (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(9):3507–3512
3. Takao K, Miyakawa T (2015) Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(4):1167–1172
4. Warren HS, Tompkins RG, Moldawer LL, Seok J, Xu W, Mindrinos MN, Maier RV, Xiao W, Davis RW (2015) Mice are not men. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(4):E345
5. Shay T, Lederer JA, Benoist C (2015) Genomic responses to inflammation in mouse models mimic humans: we concur, apples to oranges comparisons won't do. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(4):E346
6. Takao K, Hagihara H, Miyakawa T (2015) Reply to Warren et al. and Shay et al.: commonalities across species do exist and are potentially important. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(4):E347–E348
7. Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, Henneke P, Rensing-Ehl A, Rizzi M, Janda A, Hese K, Schlesier M, Holzmann K (2013) Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *N Engl J Med* 369(26):2504–2514
8. Willmann KL, Klaver S, Doğu F, Santos-Valente E, Gancarz W, Bilic I, Mace E, Salzer E, Conde CD, Sic H et al (2014) Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat Commun* 5:5360
9. Sharfe N, Merico D, Karanxha A, Macdonald C, Dadi H, Ngan B, Herbrick JA, Roifman CM (2015) The effects of RelB deficiency on lymphocyte development and function. *J Autoimmun* (pii: S0896-8411(15)30040-30048)
10. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D (1995) Constitutive NF- $\kappa$ B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I $\kappa$ B $\alpha$ -deficient mice. *Genes Dev* 9(22):2736–2746
11. Klement JF, Rice NR, Car BD, Abbondanzo SJ, Powers GD, Bhatt PH, Chen CH, Rosen CA, Stewart CL (1996) I $\kappa$ B $\alpha$  deficiency results in a sustained NF- $\kappa$ B response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol* 16(5):2341–2349
12. Page A, Navarro M, Garin M, Pérez P, Casanova ML, Moreno R, Jorcano JL, Cascallana JL, Bravo A, Ramirez A (2010) IKK $\beta$  leads to an inflammatory skin disease resembling interface dermatitis. *J Invest Dermatol* 130(6):1598–1610
13. Naito A, Yoshida H, Nishioka E, Satoh M, Azuma S, Yamamoto T, Nishikawa S, Inoue J (2002) TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(13):8766–8771
14. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM (2006) RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12(1):17–25
15. Ridder DA, Wenzel J, Müller K, Töllner K, Tong XK, Assmann JC, Stroobants S, Weber T, Nitrud C, Fischer L (2015) Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit. *J Exp Med* 212(10):1529–1549

# **Annexe 7**

Manuscrit

**“Vascular abnormalities in the brain of mice modeling Incontinentia pigmenti”**

Senegas *et al.* (en cours de soumission)

***Vascular abnormalities in the brain of mice  
modeling incontinentia pigmenti***

Anna Senegas<sup>1</sup>, Alice Gentil Dit Maurin<sup>1#</sup>, Alessandra Pescatore<sup>2#</sup>, Olivier Montigon<sup>3</sup>, Chantal Rémy<sup>3</sup>, Emmanuel Barbier<sup>3</sup>, Marie-Odile Fauvarque<sup>1</sup>, Marc Schmidt-Supprian<sup>4</sup>, Manolis Pasparakis<sup>5</sup>, Matilde Valeria Ursini<sup>2#</sup>, Annie Andrieux<sup>3#</sup>, Eric Denarier<sup>3#§</sup>, Gilles Courtois<sup>1#§</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1038/Gen&Chem/BIG, CEA Grenoble, Grenoble, France

<sup>2</sup>International Institute of Genetics and Biophysics, CNR, Naples, Italy

<sup>3</sup>INSERM U1216, Grenoble Institute of Neurosciences, Grenoble, France

<sup>4</sup>Hematology and Oncology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany

<sup>5</sup>Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany

# equal contributions

§ corresponding authors : [eric.denarier@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:eric.denarier@univ-grenoble-alpes.fr)  
[gilles.courtois@inserm.fr](mailto:gilles.courtois@inserm.fr)

Incontinentia pigmenti (IP) is a rare inherited disease caused by lack-of-function mutations of *NEMO*, an X chromosome-linked gene encoding a protein playing an essential role in the activation of NF- $\kappa$ B transcription factors. While lethality is observed in males suffering from IP early during embryogenesis females survive but exhibit a severe dermatosis which can variably be associated with abnormalities of the eyes, teeth and central nervous system (CNS). To try to get more insights into the ill-defined pathophysiological cause(s) of the cerebral abnormalities of IP patients we examined the brain of *Nemo +/-* female mice, a model of the disease, using magnetic resonance imaging and iDISCO technic. Here, we show that a substantial fraction of the animals exhibits various brain defects such as cavitations, hemorrhagic infarcts and corpus callosum atrophy which may have a common vascular origin. This demonstrates that *Nemo +/-* female mice, which had been previously shown to provide a faithful model for investigating the skin defects of IP patients, represent also a valuable model for dissecting IP-related CNS abnormalities.

**Keywords :** NF- $\kappa$ B, incontinentia pigmenti, brain, neurovascular system.

## ***INTRODUCTION***

The NF- $\kappa$ B signaling pathway plays essential functions in inflammation, immunity and control of cell growth and death (1,2). Dimers of the NF- $\kappa$ B family of transcription factors are maintained in the cytoplasm of resting cells through their association with I $\kappa$ B proteins. Upon cell stimulation, I $\kappa$ Bs are phosphorylated by the kinase complex IKK, triggering their recognition and degradation by the 26S proteasome (1,2). This results in NF- $\kappa$ B translocation in the nucleus and transcription of its target genes. A key component of IKK, which contains two related catalytic subunits, IKK-1 and IKK-2, is the regulatory subunit NEMO that behaves as an ubiquitin-binding protein allowing recruitment of IKK to upstream activators modified by ubiquitination (3).

Incontinentia pigmenti (IP) (OMIM #308300) is an X-linked genodermatosis (4,5) caused by lack-of-function mutations of *NEMO* (6). In males, lethality is observed during the embryonic life, most often before the second trimester. In females, survival occurs but soon after birth a complex set of skin abnormalities evolving along a specific sequence is observed. In addition, IP patients can exhibit abnormalities at the level of the eyes, teeth and central nervous system (CNS). In this latter case, which concerns approximately thirty percent of the patients, abnormalities include seizures, microcephaly and motor

impairment, representing the most debilitating and/or life-threatening side of the disease (7,8). The brain lesions appear heterogeneous (brain infarcts, necrosis, corpus callosum atrophy etc...), even in the patients showing the same recurrent genomic rearrangement of the *NEMO* locus, precluding any obvious explanation for their origin (7,8). Nevertheless, vascular problems represent one of the favored possibilities. In 2000, *Nemo* KO mice were reported to exhibit male lethality, due to extensive hepatic apoptosis around embryonic stage E12 (9,10). In surviving females, skin abnormalities very similar to the ones observed in human patients were detected. This provided demonstration that they could represent a faithful model to study the IP pathology. Nevertheless, nothing was reported concerning the other tissues that can be potentially affected in IP patients, more specifically the CNS. Here we have particularly examined this compartment in *Nemo +/-* female mice and observed defects suggesting that vascular defects may be a primary trigger for the CNS manifestations of the disease.

## **RESULTS**

### ***Brain abnormalities in *Nemo +/-* mice detected with magnetic resonance imaging (MRI).***

In order to detect putative morphologic defects in the brain of *Nemo +/-* female mice the animals were sacrificed at P7, their head recovered and fixed and their brains analyzed using T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging (MRI) protocols (See Mat. Meth.). Upon analysis of approximately one hundred and fifty samples (mostly through T1-weighted protocols) three subsets of brains were defined. In the first one, representing thirty to forty percent of the samples, a careful analysis did not reveal any visible differences with wild-type P7 brains, besides an overall reduction of the brain volume, involving no specific region, that correlated well with the delayed development of the animals as measured by their weight (**Fig. 1**). In a second subset, representing around fifty percent of brains, small and not specifically located abnormalities were detected. They involved entorhinal cortex areas and the superior region of the hippocampus and appeared most of the time upon T1-weighted analysis as dark and irregular traces with limited extension (**Fig. 2**). Finally, approximately ten percent of the brains (therefore representing around fifteen samples) presented with obvious abnormalities never detected in any wild-type brain (**Fig. 3, Fig. S1**). Again, their locations were not specific and their nature quite heterogeneous. Among defects that we observed

were cavitations, corpus callosum atrophy and hemorrhagic infarcts. Importantly, when we analyzed the P7 brains of a different murine strain specifically invalidated for *Nemo* in neurons, astrocytes and oligodendrocytes, by expressing cre recombinase under nestin promoter (Nestin-cre), no difference with controls was seen neither in males, which are hemizygotously invalidated, nor females, which are mosaically invalidated (**Fig. S2**). This suggests that these cell types are not the ones triggering the defects.

To gain more information about the time at which brain abnormalities may occur, more specifically addressing the question of their putative relationship with the skin inflammatory process beginning at P4, we also carried out MRI analysis of pre-birth (E18) *Nemo +/-* brains. Despite limitations imposed by the number of samples required for an exhaustive survey we observed in at least three occurrences abnormalities bearing similarities with the ones observed at P7 and again not observed in littermates with a wild-type phenotype (**Fig. 4**). This suggests that lesions can occur before birth.

#### ***Examination of the vascular system of *Nemo +/-* mice using iDISCO.***

The random occurrence of brain abnormalities in *Nemo +/-* mice fits quite well with the mosaic status of animals carrying a mutation of a gene located on the X chromosome. In humans, a large variability of the phenotype is also a hallmark of the disease. The lesions in the mouse bear also great similarities with the ones observed in humans. For instance, defects such as cavitations or hemorrhagic infarcts have been reported in humans. Since vascular defects have been proposed to be the possible underlying cause and invalidation of *Nemo* in neurons, astrocytes and oligodendrocytes does not generate any brain lesions (see above) we focused our analysis on this compartment in *Nemo +/-* mice. To do so we took advantage of recently developed technics that allow antibody-based examination of brain structures and cellular content/activity after treating the samples with chemicals inducing their transparency to light (11,12).

We first examined samples that exhibited lesions upon MRI using antibodies that detected morphological changes (anti-NeuN, anti-Tuj1), inflammation (anti-GFAP, anti-Iba1) or cell death (anti-active caspase 3). XXX

We then performed a whole-scale analysis of the vascular system of ten *Nemo +/-* brains showing or not visible abnormalities and ten wild-type brains. In this case, endothelial cells composing the vessels were detected using anti-CD31/PECAM-1

antibodies whereas the extra-cellular matrix was detected using anti-collagen IV antibodies. The specificity of the labeling is demonstrated in **Fig. S3**. As shown in **Fig. 5A** this analysis allowed to study the complete brain vasculature at a high level of resolution. Several kind of abnormalities were observed. On a sample previously analyzed through MRI and showing diffuse signal in the anterocortical region we detected vascular structures that may represent neovascularization foci (**Fig. 5B**). Upon careful examination we also noticed that Nemo +/- brains exhibited in specific area such as XX cortex or XX, a higher proportion of interrupted microvessels, as revealed by the lack of collagen IV and CD31 co-staining, with collagen IV staining only remaining visible (**Fig. 5B and C**). This kind of abnormalities is reminiscent of structures called « string vessels », supposed to originate from atrophied vessels with only persistent extracellular matrix (13).

## ***DISCUSSION***

The phenotype of IP patients is highly complex, due to the numerous and various tissue-specific NEMO/N- $\kappa$ B functions combined to the linkage of *NEMO* to chromosome X. More specifically, patients present with a highly variable mosaic status that arises from counter-selection processes operating in each organ with different timings and levels. In several cases, this counter-selection eliminate the vast majority of NEMO (-) cells, such as in blood cells where the X-inactivation process is qualified as « skewed » since more than ninety-nine percent of cells are usually wild-type (14) or in the liver where presence of NEMO (-) cells is very detrimental (15). This contrasts with the skin situation in which the dermatosis process starts after birth as a direct consequence of impaired cross-talks occurring between wild-type and NEMO (-) mutant cells in the epidermis after experiencing a new environment, the same defects eventually causing the slow elimination of NEMO (-) cells (16). More complex and nebulous is the situation concerning the CNS abnormalities of IP patients, a major concern for their quality of life. First of all, defects are only detected in a subset of patients, around thirty percent according to the most recent statistics. Second, their range is highly variable, even among patients sharing the same genetic defect, the frequent genomic rearrangement of *NEMO* that affects approximately seventy to seventy-five percent of patients. Finally, it has been difficult so far to establish for sure which kind of cell type (s) is (are) the initiator(s) of the

abnormalities. In particular, distinction between neuronal or non-neuronal components has been a challenge because based on the use of MRI only. A mouse model of the disease has been available for some time but only used to study the skin manifestations of IP. We used it here to see whether they may exhibit CNS abnormalities similar to the ones observed in human and if so, which primary defect might be the trigger.

For practical reasons, we decided to first focus our analysis on P7 mice, using the appearance and evolution of skin lesion as a quick way to grossly classify the animals as moderately or severely affected and their small size as advantageous for preparing a large number of brains through direct fixation after head recovery. This was also motivated by the fact that a large portion of the mice die around P8-P10. Doing so, we have found that a fraction of the analyzed brain exhibit various abnormalities visible through MRI. Interestingly, a part of them may represent (or originate from) defective blood vessels. Indeed, using the recently developed iDISCO technic, we have observed anomalies suggestive of neovascularization and degeneration. Neovascularization is interesting in the context of IP since it is a recurrent feature of ocular problems (17), with eyes and brain sharing a common developmental origin. Degeneration, which is detected through atrophied microvessels (« string » vessels) may reflect apoptosis of endothelial cells, something not necessarily surprising considering the function of NEMO/NF- $\kappa$ B signaling in protection against cell death.

Analysis of a mosaic system with high variability like the *Nemo +/-* one, which is supposed to be the most genetically similar to the human situation, presents limitations, mostly concerning the number of samples to survey for deducing significant information. This, combined with obvious technical limitations, made our analysis of the onset of lesions by MRI restricted to E18 samples. We were nevertheless able to show at this pre-birth stage some lesions, suggesting that brain defects may affect the life of *Nemo +/-* females at early ages. It is worth noting that a small fraction of animals disappear during their first days of life.

Also not properly examined because of the limitation mentioned above were epilepsy-like signs which would require the analysis of a very large number of mice with the adequate technology. In rare occasions we noticed among the *Nemo +/-* mice some signs of spasms and in one strongly affected case the subsequent MRI analysis revealed a major brain defect. As shown in **Fig. S4**, a remarkable ventricle enlargement, associated with periventricular neuropil dissociation was observed. Noteworthy, ventricle



enlargement/hydrocephaly has been reported in few IP patients (7, 8). Since this was assayed with a specific protocol for fixing the brain, revealing more easily the ventricles, but on a low number of samples, a relationship between the specific behavior of this mouse coupled to such kind of abnormality can not be established for sure.

Having demonstrated that *Nemo* +/- female mice show signs of IP-related CNS abnormalities will have a clear impact for testing various approaches aimed at attenuating them. First of all, genetic strategies using available mouse strains to cross them with *Nemo* +/- animals can be envisioned. For instance, analyzing the involvement of cytokines such as TNF- $\alpha$  or components of death pathways (apoptosis- or necroptosis-related) in amplifying the deleterious effects of impaired blood circulation in the brain may allow identification of secondary mediators that may be targeted pharmacologically. Acting on the primary cause of the disease (the absence or inactivity of NEMO) seems unrealistic at this stage given the involvement of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in so many critical physiological processes. It is further dismissed when considering the unpredictable final impact of X-inactivation.

While this work was in progress, Ridder *et al.* have reported vascular abnormalities in *Nemo* +/- female mice, with increased string vessels formation, and using the elegant specific invalidation of *Nemo* in the brain vessels demonstrated major blood-brain-barrier dysfunctions, more precisely cerebral hypoperfusion, brain endothelial cell death and albumin and IgG extravasation (19). In this second system, epilepsy was detected, reinforcing the notion that the mere impairment of NEMO in brain blood vessel might be sufficient enough to generate all IP-related abnormalities in the brain. Here we also observed string vessels in *Nemo* +/- mice but also more expansive lesions through MRI, a technic that was not used by Ridder *et al.* who only analyzed a limited number of animals. It therefore remains to be determined whether primary defects originating at the level of blood vessels is exacerbated by surrounding impaired neighboring cells, providing another layer for attenuating the consequences of NEMO dysfunction in the brain of IP-patients.

## ***MATERIAL AND METHODS***

**Mice.** C57BL/6 *Nemo* +/- female mice were produced by crossing *XNemofl/XNemofl* females (10) with either C57BL/6 *Xcre/Y* males (cre-deleter strain (19)) or C57BL/6 nestin-cre strain (20). All animal procedures were performed according to a protocol approved by XXX.

**Magnetic resonance imaging.** Animals were sacrificed at P7 by decapitation and heads fixed overnight at 4°C in 6% PFA/PBS after removing the skin and the eyes. Then they were stored at 4°C in Fomblin oil (XXX).

**Immunological analysis.** Samples were treated essentially according to Belle *et al.* (12). The brains were extracted from the head skull and incubated XX.

## **FIGURE LEGENDS**

Fig. 1. **Reduced brain size in P7 *Nemo +/-* mice associated with a general developmental delay.** **A.** Brain volume vs Body weight in P7 *Nemo +/-* mice without detectable brain lesion versus P7 wild-type mice. N=10. **B.** Total brain/Body ratios in P7 *Nemo +/-* mice without detectable brain lesion versus P7 wild-type mice. N=10.

Fig. 2. ***Nemo +/-* brains exhibiting minor abnormalities.** **A.** Six *Nemo +/-* brains are shown with abnormalities indicated by an arrow (T1-weighted analysis) **B.** A sample analyzed with T1- and T2- weighted protocols identifying in both cases the same lesion.

Fig. 3. ***Nemo +/-* brains exhibiting major abnormalities.** Eight *Nemo +/-* brains are shown with various abnormalities indicated by an arrow. In each case the equivalent region of a wild-type brains is included as a control. The anteroposterior extension of the lesions is shown for four cases in **Fig. S1**.

Fig. 4. **Brain abnormalities at E18.** Embryos were prepared and analyzed (T2-weighted analysis) as described in the Materials and Method section. Three distinct samples are shown.

Fig.5. **Blood vessels abnormalities in *Nemo +/-* brains.** **A.** 3D iDISCO analysis of P7 mouse brain microvessels with anti-collagen IV and anti-CD31. Enlarged areas showing the microvessels are shown on the right **B.** Comparative study of a *Nemo +/-* brain using distinct protocols. The sample was examined with MRI (T1-weighted) and two coronal (#10 and 11, 10  $\mu\text{m}$ ), one axial and one sagittal sections are shown with thick black arrows pointing to abnormalities (Left panels). A 3D iDISCO analysis was subsequently performed with anti-collagen IV and anti-CD31 antibodies (Middle panel), indicating lesions as vessel abnormalities (Thick white arrows). The same abnormalities, and another one (thin white arrow), were also detectable on serial sections (1  $\mu\text{m}$ ) produced by light-sheet analysis before reconstituting the 3D image. **C.** Area exhibiting a large proportion of string vessels in the brain of a P7 *Nemo +/-* mouse.

Supplementary Figs :

**Fig. S1. MRI abnormalities extending over large regions.** Antero-posterior analysis (coronal sections) of samples #29 (A), #84 (B), #120 (C) and #209 (D) are shown. In the #29 case, a saggital analysis is also shown.

**Fig. S2. Absence of brain abnormalities in samples derived from Nestin-cre/Nemo mice.** Six distinct sections of a brain derived from a P7 Nestin-cre/Nemo male mouse (Nemo -) (A) and a P7 Nestin-Cre/Nemo female mouse (Nemo +/-) (B) are shown with the equivalent ones from a wild-type brain. The analysis was performed with 10 males and 6 females.

**Fig. S3. Specificity of anti-CD31 and anti-collagen IV staining using the iDISCO procedure.** Portions of a P7 brain treated with iDISCO were examined using confocal microscopy.

**Fig. S4. Ventricle enlargement in a mouse showing a quiver phenotype.** Four distinct MRI section of the brain of a Nemo +/- mouse exhibiting a peculiar phenotype are shown. In each case, the similar section of a wt brain is provided on the left. The enlargement extends on the integrality of the ventricule.

## REFERENCES

- 1) Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663
- 2) Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* 132(3):344-362
- 3) Hinz M, Scheidereit C (2014) The I $\kappa$ B kinase complex in NF- $\kappa$ B regulation and beyond. *EMBO Rep* 15(1):46-61
- 4) Landy SJ, Donnai D (1993) Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J Med Genet* 30(1):53-59
- 5) Berlin AL, Paller AS, Chan LS (2002) Incontinentia pigmenti: a review and update on the molecular basis of pathophysiology. *J Am Acad Dermatol* 47(2):169-187
- 6) Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuert S, Munnich A, Israël A, Heiss NS, Klauck SM, Kioschis P et al (2000) Genomic rearrangement in NEMO impairs NF- $\kappa$ B activation and is a cause of incontinentia pigmenti. *Nature* 405(6785):466-472
- 7) Meuwissen ME, Mancini GM (2012) Neurological findings in incontinentia pigmenti; a review. *Eur J Med Genet* 55(5):323-331
- 8) Minić S, Trpinac D, Obradović M (2013) Systematic review of central nervous system anomalies in incontinentia pigmenti. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Feb 13;8:25.
- 9) Makris C, Godfrey VL, Krähn-Senftleben G, Takahashi T, Roberts JL, Schwarz T, Feng L, Johnson RS, Karin M (2000) Female mice heterozygous for IKK $\gamma$ /NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5(6):969-979
- 10) Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G, Addicks K, Israël A, Rajewsky K, Pasparakis M (2000) NEMO/IKK $\gamma$ -deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5(6):981-992
- 11) Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M (2014) iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159(4):896-910.
- 12) Belle M, Godefroy D, Dominici C, Heitz-Marchaland C, Zelina P, Hellal F, Bradke F, Chédotal A (2014) A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Rep* 9(4):1191-1201.
- 13) Brown WR (2010) A review of string vessels or collapsed, empty basement membrane tubes. *J Alzheimers Dis.* 21(3):725-739.
- 14) Parrish JE, Scheuerle AE, Lewis RA, Levy ML, Nelson DL (1996) Selection against mutant alleles in blood leukocytes is a consistent feature in Incontinentia Pigmenti type 2. *Hum Mol Genet* 5(11):1777-1783.
- 15) Coleman R, Genet SA, Harper JI, Wilkie AO (1993) Interaction of incontinentia pigmenti and factor VIII mutations in a female with biased X inactivation, resulting in haemophilia. *J Med Genet* 30(6):497-500.
- 16) Sebban H, Courtois G (2006) NF- $\kappa$ B and inflammation in genetic disease. *Biochem Pharmacol* 72(9):1153-1160.
- 17) Chen CJ, Han IC, Tian J, Muñoz B, Goldberg MF (2015) Extended Follow-up of Treated and Untreated Retinopathy in Incontinentia Pigmenti: Analysis of Peripheral Vascular Changes and Incidence of Retinal Detachment. *JAMA Ophthalmol.* 133(5):542-548.
- 18) Ridder DA, Wenzel J, Müller K, Töllner K, Tong XK, Assmann JC, Stroobants S,

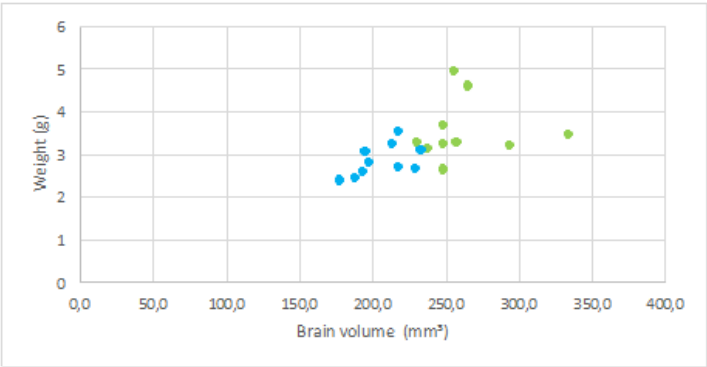
Weber T, Niturad C, Fischer L, Lembrich B, Wolburg H, Grand'Maison M, Papadopoulos P, Korpos E, Truchetet F, Rades D, Sorokin LM, Schmidt-Supprian M, Bedell BJ, Pasparakis M, Balschun D, D'Hooge R, Löscher W, Hamel E, Schwaninger M (2015) Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit. *J Exp Med.* 212(10):1529-1549.

19) Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23(24):5080-5081.

20) Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet.* 23(1):99-103.

Fig. 1

A



B

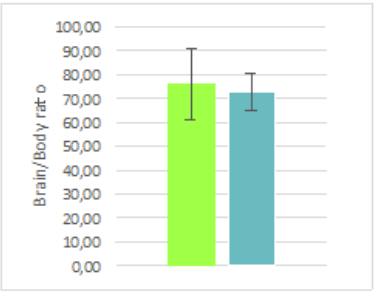
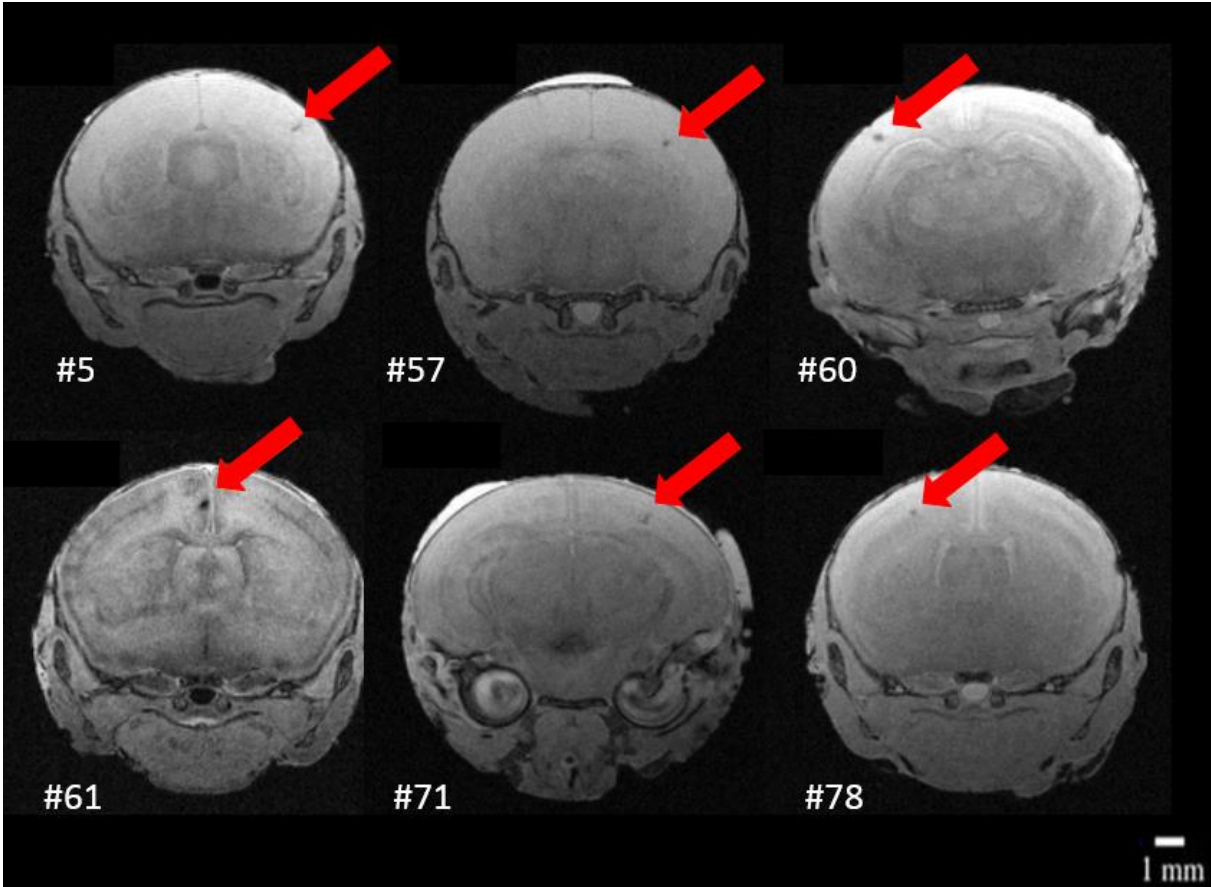


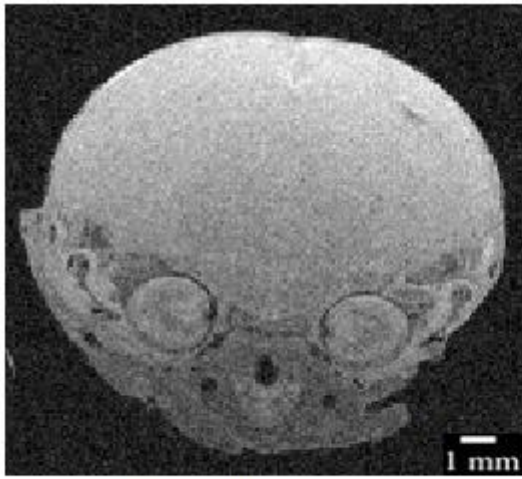
Fig. 2

A

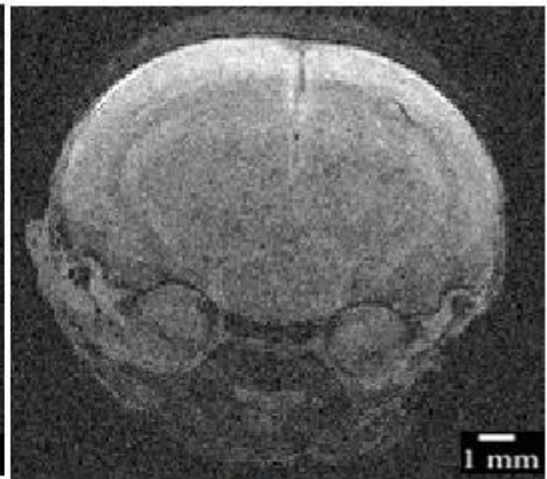




**B**



T1-weighted analysis



T2-weighted analysis

Fig. 3

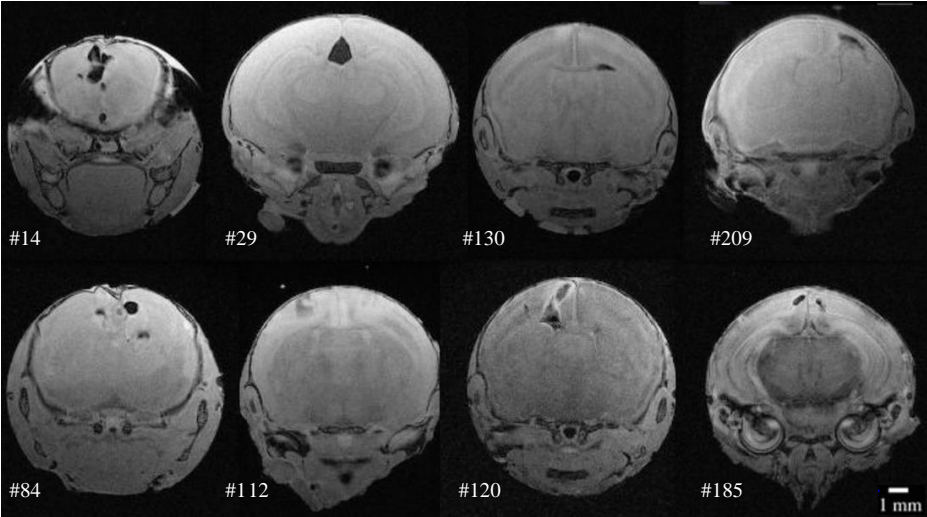


Fig. 4

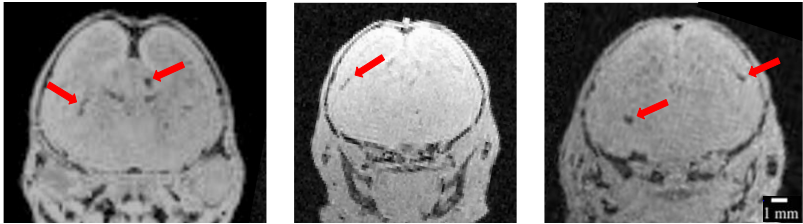
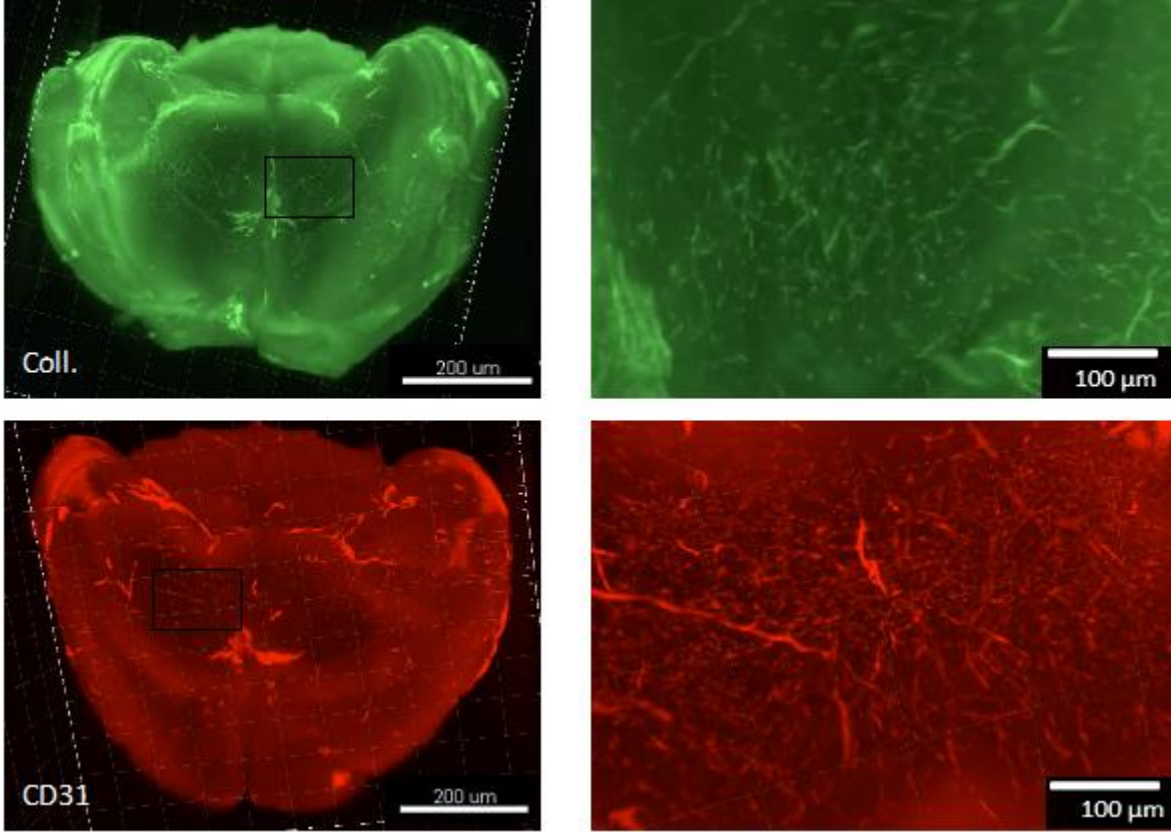
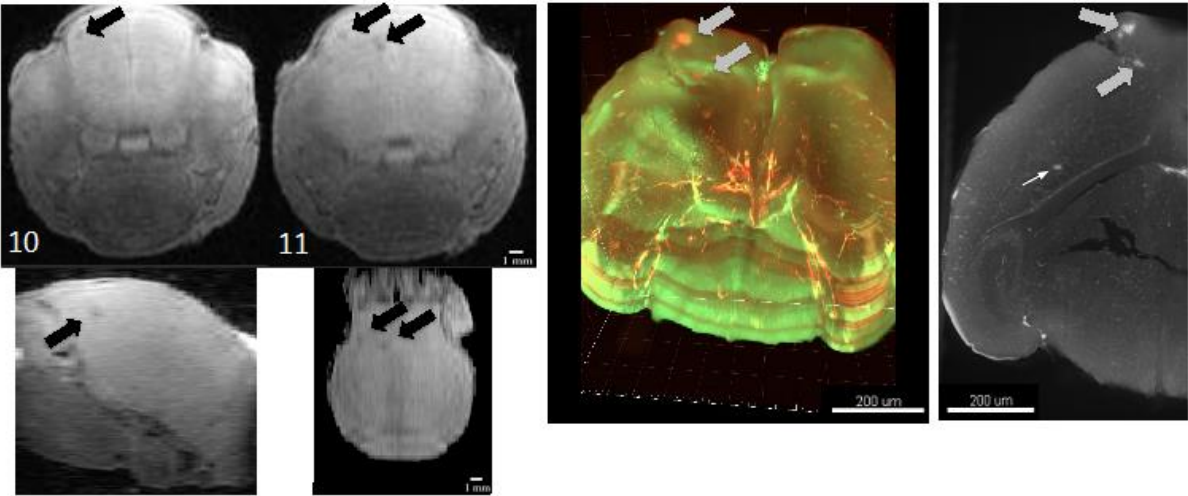


Fig. 5

A



**B**



**C**

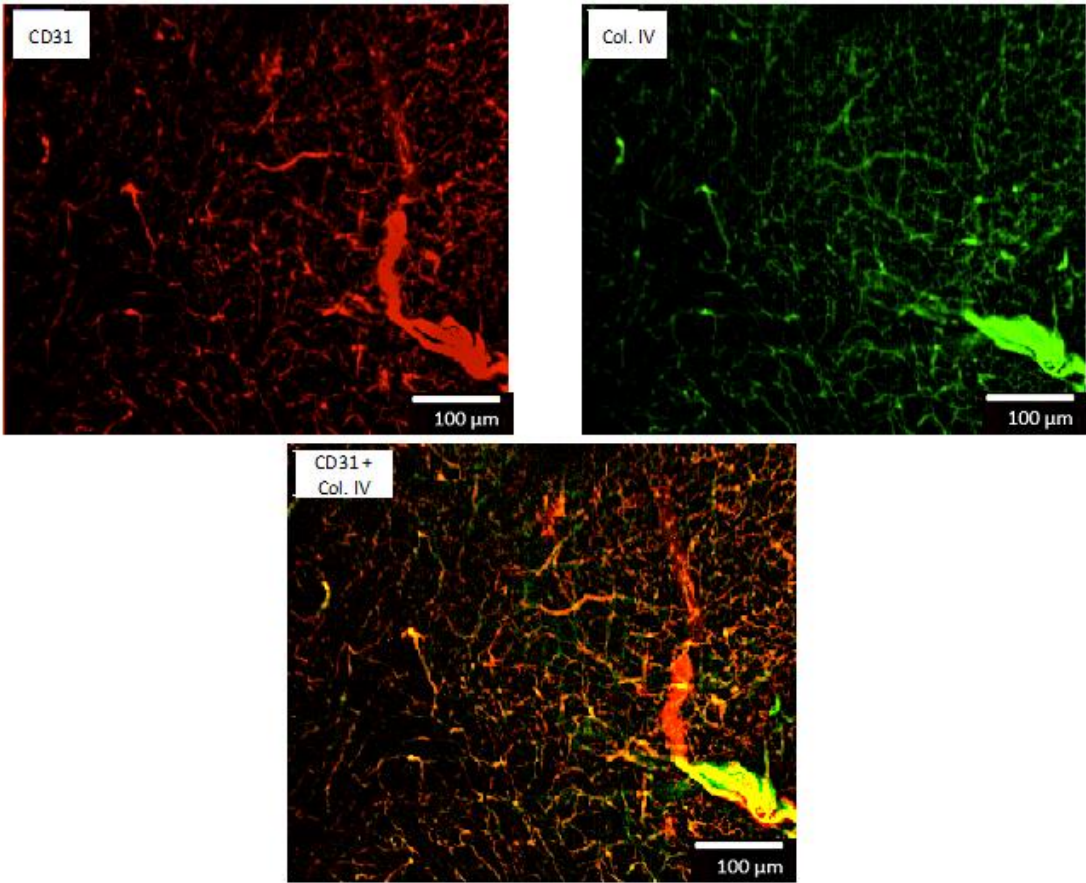
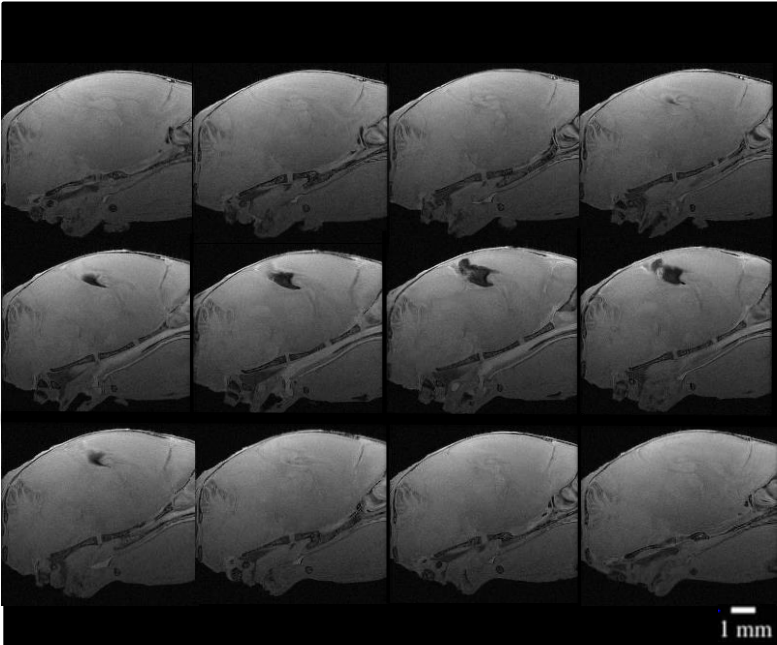
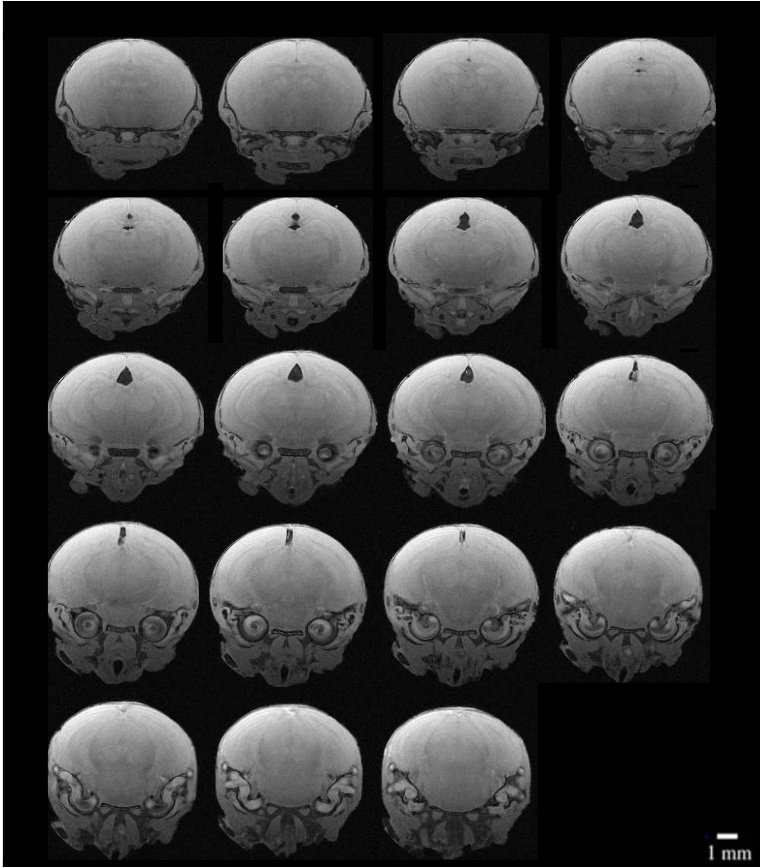
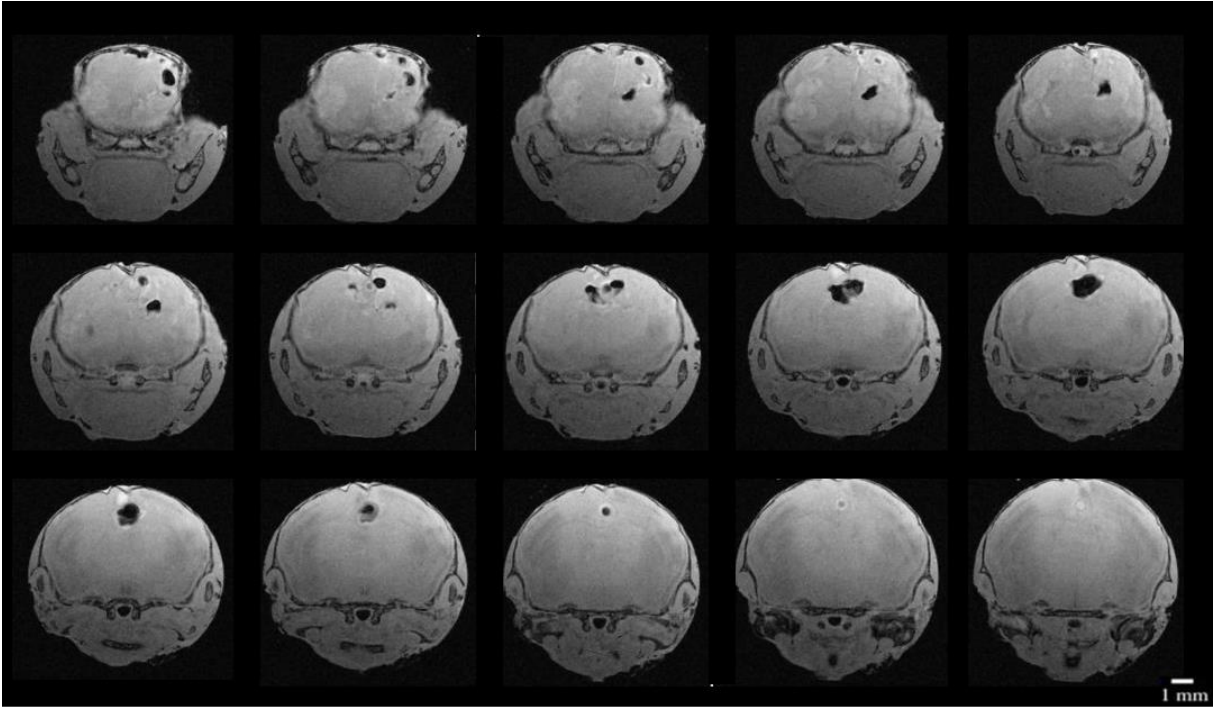


Fig. S1

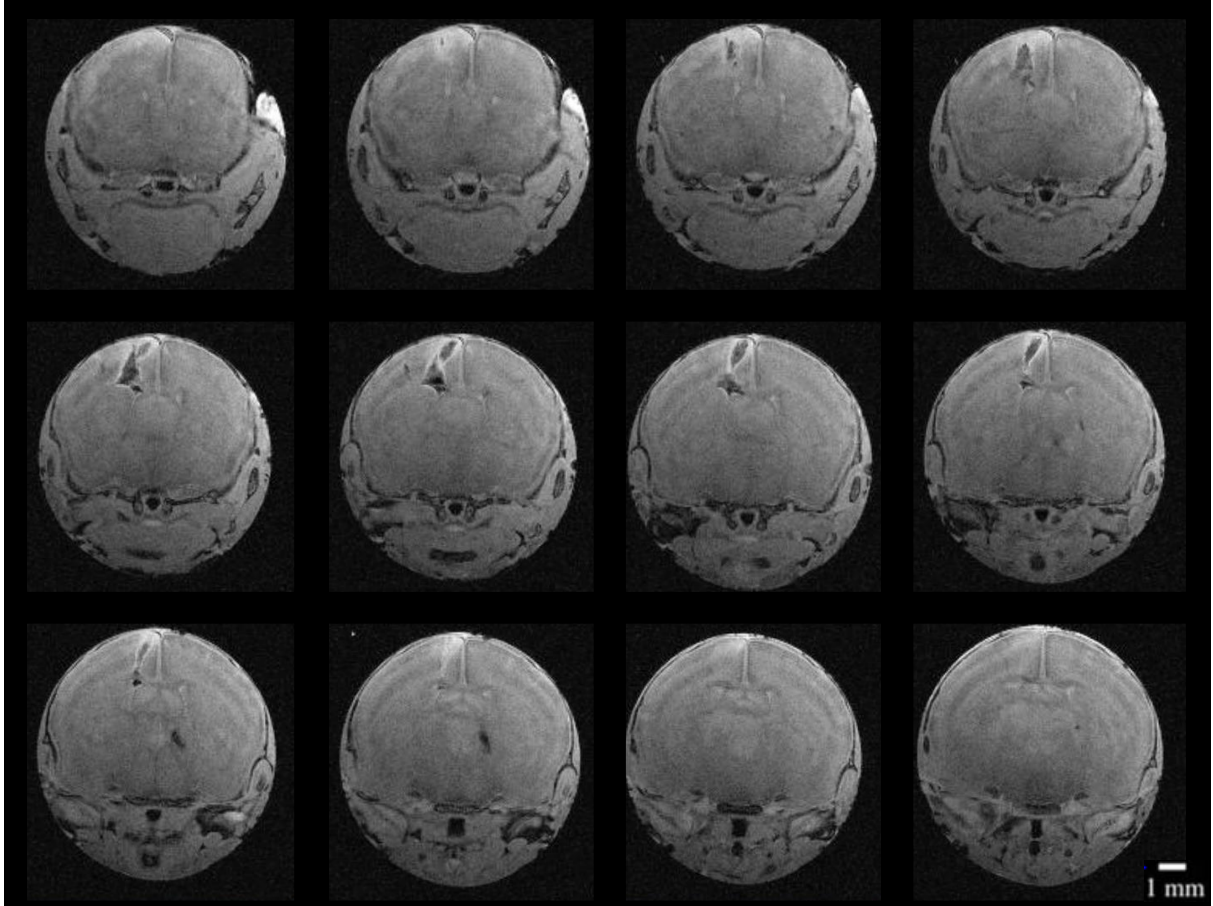
A



B



C





D

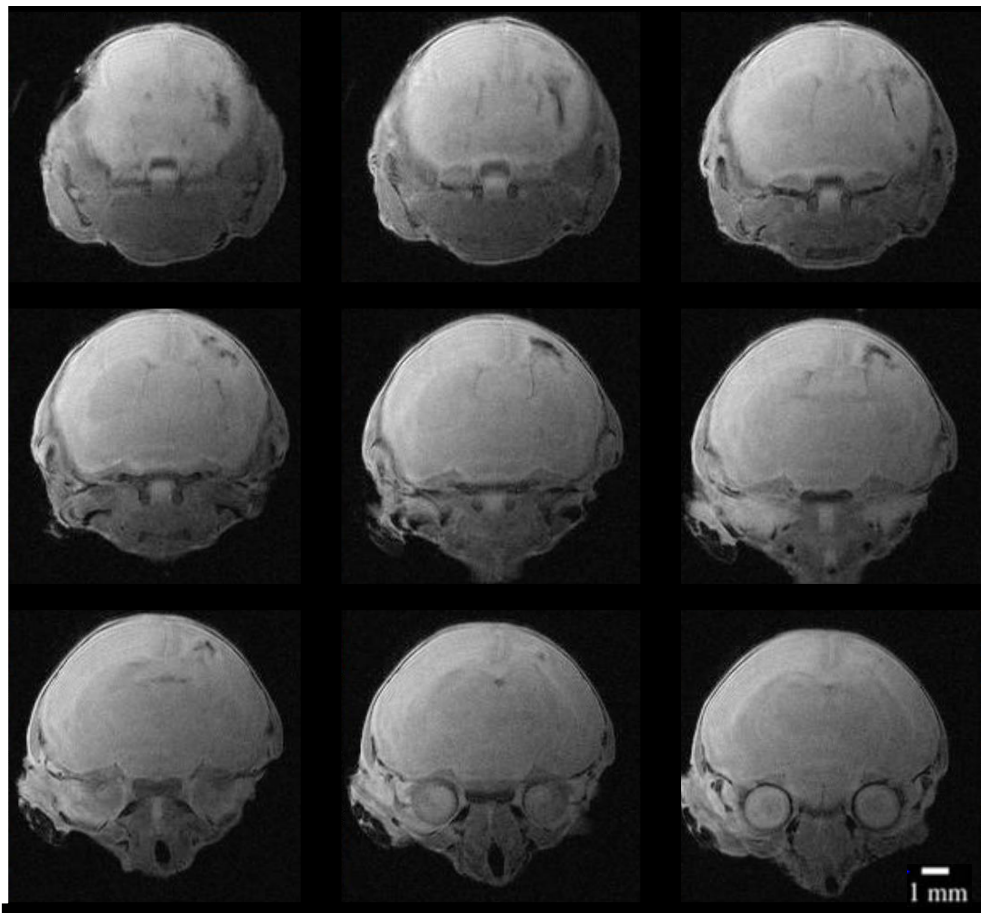
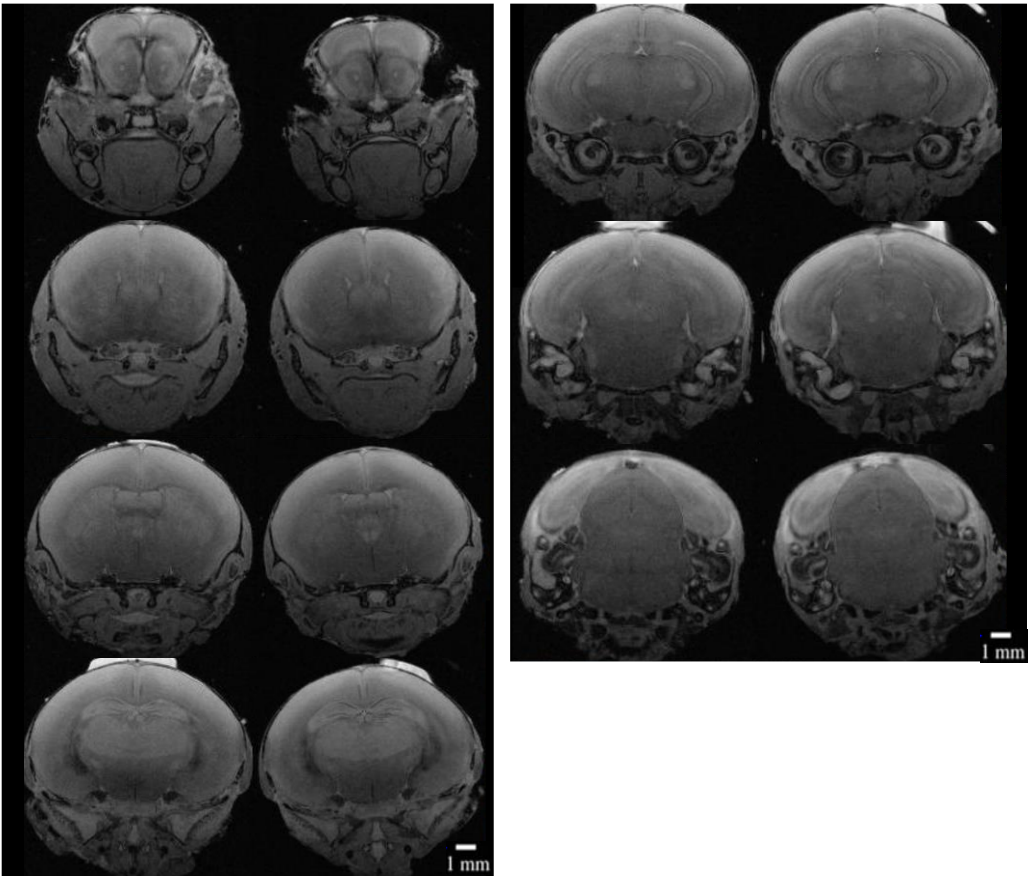


Fig. S2

A



B

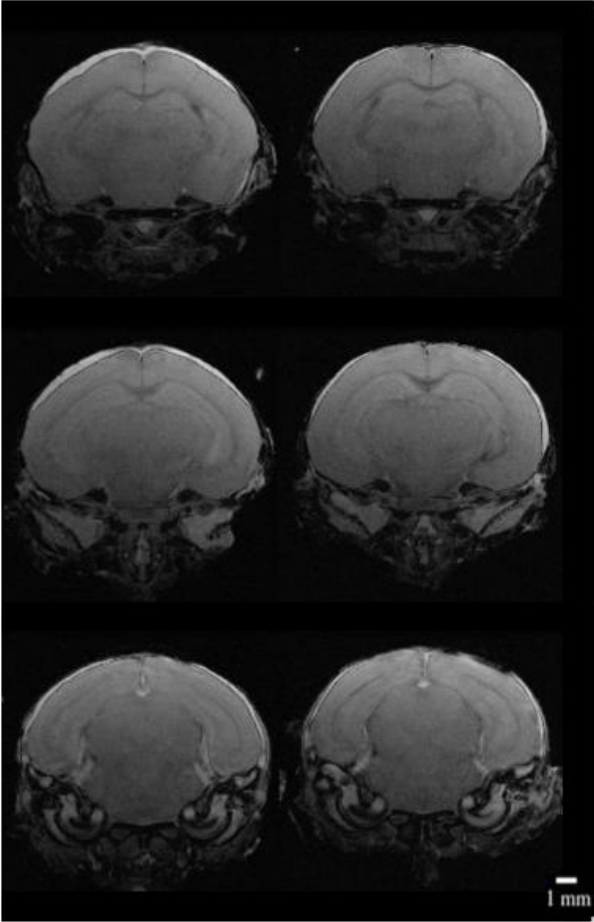
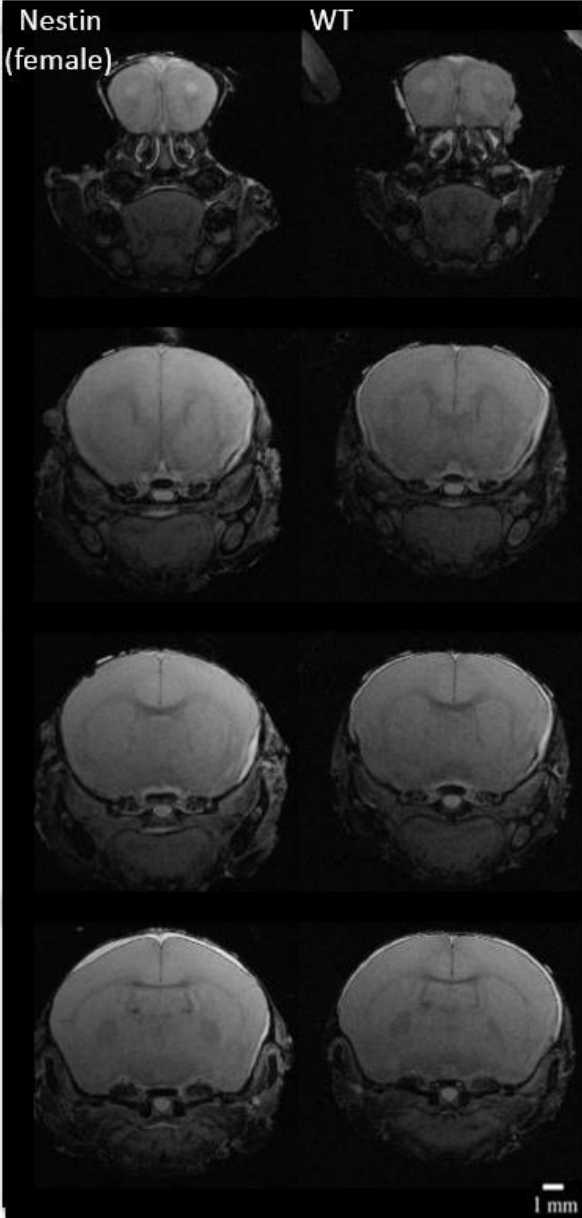


Fig. S3

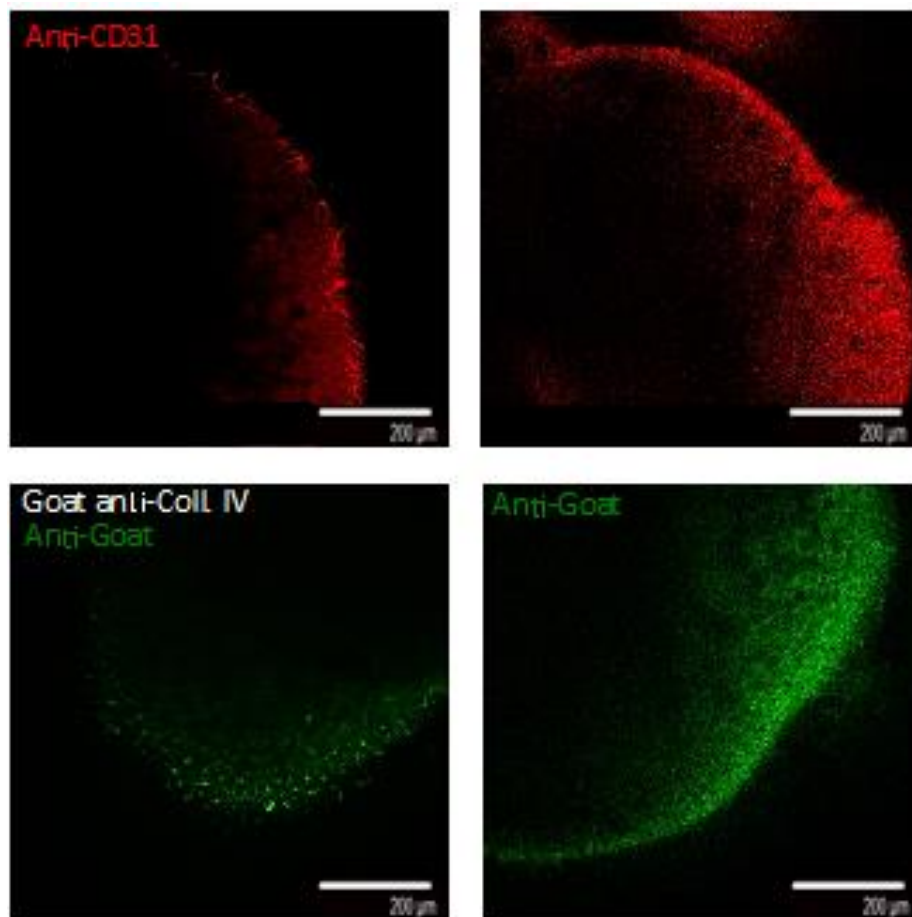
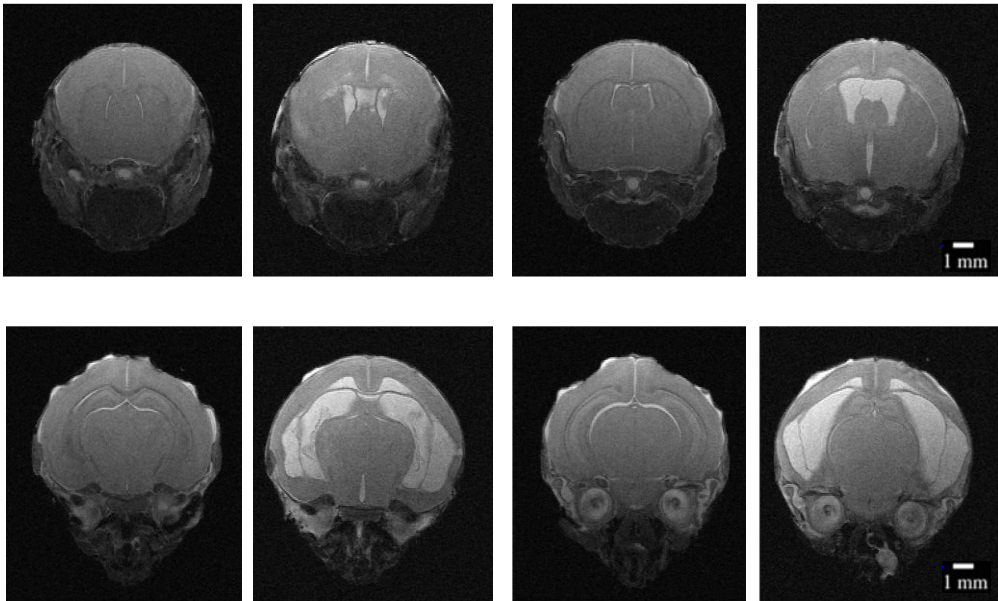


Fig. S4





## RESUMÉ :

Incontinentia pigmenti (IP, OMIM # 308300) est une maladie génétique liée au chromosome X qui est létale chez les garçons. Chez les filles, une dermatose débute peu après la naissance et évolue selon une séquence complexe d'événements associant de l'inflammation, de l'hyperprolifération cellulaire et de l'apoptose. En dehors de ce problème cutané, les patientes IP peuvent aussi souffrir d'anomalies oculaires, dentaires et cérébrales. Les défauts cérébraux affectent environ 30% des patientes et se caractérisent par de l'épilepsie et des troubles cognitifs et moteurs. Le gène causant IP code pour la protéine NEMO, un composant essentiel de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, qui régule les processus immunitaires, inflammatoires, ainsi que la prolifération et la mort cellulaire. Chez approximativement 70% des patientes IP, le même réarrangement chromosomique élimine presque intégralement le gène *NEMO*, générant une perte d'activation de la voie NF- $\kappa$ B. L'inactivation du gène *Nemo* chez la souris (femelles *Nemo +/-*) fournit un modèle pour l'étude de la dermatose associée à IP en récapitulant les événements cutanés observés chez les patientes.

Dans le but de mieux définir les anomalies cérébrales des patientes IP ainsi que leur origine qui reste obscure, nous avons analysé le cerveau des souris *Nemo +/-*. Nous montrons ici, en utilisant un protocole d'IRM adapté à des cerveaux de sept jours (P7), que des anomalies sont détectées dans une fraction des échantillons. Ces anomalies sont hétérogènes et localisées de manière aspécifique, comme chez l'homme. Elles incluent des zones hémorragiques diffuses, des cavités et de l'atrophie du corps calleux. Cela démontre l'utilité du système murin *Nemo +/-* pour étudier également les défauts cérébraux des patientes IP. De manière intéressante, ces lésions cérébrales peuvent être détectées avant la naissance, au jour 18 du développement, et ne sont pas causées par un dysfonctionnement neuronal, astrocytaire ou des oligodendrocytes. Utilisant une approche immunitaire couplée à une analyse *in toto* de cerveaux P7 rendus transparents (Technique 3DISCO), nous avons détecté des anomalies vasculaires qui suggèrent que ce compartiment serait à l'origine des défauts cérébraux des patientes IP.

**Mots clés:** Incontinentia pigmenti, NEMO, NF- $\kappa$ B

## ABSTRACT:

Incontinentia pigmenti (IP, OMIM # 308300) is an X-linked genetic disease which is lethal in boys. In girls, it causes a skin disease that begins soon after birth and evolves along a complex sequence of events involving inflammation, cell hyperproliferation and apoptosis. IP patients can also suffer from ocular, dental and brain anomalies. Brain defects affect about 30% of patients and are characterized by epilepsy and cognitive/motor disorders. The IP-causing gene encodes the protein NEMO, an essential component of the signaling pathway NF- $\kappa$ B that regulates immunity, inflammation, proliferation and cell death process. In approximately 70% of IP patients, the same chromosomal rearrangement eliminates almost completely the NEMO gene, generating a loss of activation of the NF- $\kappa$ B pathway. Inactivation of the gene in *Nemo* mice (*Nemo +/-* females) provides a model for the study of the cutaneous events observed in IP patients.

In order to better define the IP brain anomalies of patients and their origin, which remains obscure, we analyzed the brains of *Nemo +/-* mice. We show here, using a MRI protocol adapted for brain of seven days (P7), that anomalies are detected in a fraction of the samples. These anomalies are heterogeneous and localized in a non-specific manner, as in humans. They include diffuse hemorrhagic areas, cavities and atrophy of the corpus callosum. This demonstrates the usefulness of the murine system *Nemo +/-* to also study the IP patient's brain defects. Interestingly, these brain lesions can be detected before birth, at day 18 of development, and are not caused by a neuron, astrocyte or oligodendrocyte dysfunction. Using an immune approach coupled to an *in toto* analysis of P7 brain after treating them by chemicals to induce their transparency (iDISCO technique) we detected vascular anomalies, suggesting that this compartment causes the brain defects in IP patients.

**Key words:** Incontinentia pigmenti, NEMO, NF- $\kappa$ B